**Szent István Egyetem**
**Kertészettudományi Kar**
**Szőlészeti és Borászati Intézet**
**Borászati Tanszék**

# BORÉLESZTŐK METABOLIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA STRESSZKÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A CUKORTARTALOMRA

DOI: 10.54598/000130

**Oláhné Horváth Borbála**

doktori (PhD) értekezés

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

A Szent István Egyetem Kertészettudományi Doktori Iskola Tanácsa 2020. szeptember 22-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

**Elnöke**

Bisztray György Dénes PhD

**Tagjai**

Maráz Anna, CSc

Kovács Tamás, PhD

Nguyen Duc Quang, PhD

Váczy Kálmán Zoltán, PhD

**Opponensek**

Kun-Farkas Gabriella, PhD

Bene Zsuzsanna, PhD

**Titkár**

Varga Zsuzsanna, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK ..... 1
JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ..... 4
1. BEVEZETÉS ..... 6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ..... 9
2.1. Az alkoholos erjedést befolyásoló tényezők ..... 12
2.1.1. A cukortartalom ..... 12
2.1.1.1. Természetes édes borok ..... 15
2.1.1.2. Tokaji borkülönlegességek ..... 16
2.1.2. A hőmérséklet ..... 17
2.1.3. A nitrogén ellátottság ..... 19
2.1.4. Az alkohol tartalom ..... 22
2.1.5. Egyéb gátló anyagok ..... 23
2.2. Borászati jelentőségű élesztőgombák nagy cukortartalmú mustok erjesztésében ..... 25
2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* ..... 25
2.2.2. *Saccharomyces bayanus var. uvarum* ..... 28
2.2.3. *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)* ..... 30
2.2.4. Egyéb nem-*Saccharomyces* fajok ..... 36
2.3. A starterkultúra használat és kialakulása ..... 39
2.3.1. Az új fajélesztők forrásai: hagyományos szelekció és genetikai módosítás ..... 40
2.3.2. Mono, oligo- és multistarterek ..... 41
2.4. A metabolomika mint megközelítésmód ..... 43
3. ANYAG ÉS MÓDSZER ..... 45
3.1. Alkalmazott élesztő törzsek ..... 45
3.2. Alkalmazott tápközegek ..... 48

3.3. Analitikai módszerek ..... 50
3.3.1. Hagyományos módszerek ..... 50
3.3.2. Enzimatikus, spektrofotometriás módszerek ..... 50
3.3.3. Nagy műszeres analitika ..... 51
3.4. Mikrobiológiai módszerek ..... 51
3.4.1. Kísérleti erjesztések ..... 51
3.4.2. Növekedés vizsgálatok szilárd táptalajon (Drop-teszt) ..... 52
3.4.3. Hagyományos vizsgálati módszerek ..... 53
3.4.4. Molekuláris biológiai módszerek ..... 54
3.5. Statisztikai módszerek ..... 55
3.6. Érzékszervi vizsgálati módszerek ..... 56
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK ..... 57
4.1. Erjesztési képességre irányuló előzetes kísérletek ..... 57
4.2. Sejtszaporodás nyomon követése eltérő stressz körülmények között ..... 60
4.2.1. Erjedési hőmérséklet stressz ..... 61
4.2.2. Kiindulási cukortartalom okozta stressz ..... 66
4.2.3. Az erjedési hőmérséklet és a kiindulási cukortartalom kombinált hatása a növekedésre ..... 68
4.2.4. Közepes szénláncú zsírsav stressz ..... 77
4.3. Anyagcsere termékek nyomon követése, metabolikus profil vizsgálat ..... 81
4.3.1. Intracelluláris glicerin menedzsment ..... 81
4.3.2. Metabolikus profil vizsgálat eltérő kiindulási cukor koncentráció mellett ..... 85
4.3.2.1. Cukor fogyasztási dinamika ..... 85
4.3.2.2. Az extrém cukortartalom hatása a vizsgált metabolitokra ..... 87
4.3.2.3. Nitrogén hasznosítás ..... 99
4.3.2.4. Többváltozós metabolit profil vizsgálat ..... 104
4.4. Félüzemi léptékű kevert kultúrás kísérleti erjesztés ..... 107

4.5. Új tudományos eredmények ..... 114
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ..... 115
6. ÖSSZEFOGLALÁS ..... 118
7. SUMMARY ..... 120
8. MELLÉKLET ..... 122
M1. IRODALOMJEGYZÉK ..... 122
M2. A dolgozat kísérleteinek törzs használata ..... 138
M3. A statisztikai próbák rövid leírása és feltétel vizsgálata ..... 139
M4. A kombinált stressz vizsgálat kiegészítő eredményei ..... 156
M5. A vizsgált törzsek főkomponens analízisének további ábrái ..... 157
M6. Publikációs jegyzék ..... 158
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ..... 160

## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFN: azonnal felvehető nitrogén

ADY: active dry yeast= aktív szárított élesztő

*B. cinerea: Botrytis cinerea*

BT = Szent István Egyetem, Borászati Tanszék

C-forrás: Carbon- forrás= szén-forrás

Chr. Hansen: Christian Hansen Holding

D: dekánsav

DD: dodekánsav

DE: Németország

DL: detekciós limit

GC: Gas Chromatography= gázkromatográfia

G/F: glükóz-fruktóz arány

ECG: extracelluláris glicerin

FR: Franciaország

H: hexánsav

$H_2S$: hirdogén-szulfid

HOG: High Osmolarity Glycerol= nagy ozmolaritású glicerin

HPLC: High Performance Liquid Chromatography= Nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia

Hsp: heat shock protein= hő sokk fehérje

HU: Magyarország

ICG: intracelluláris glicerin

JP: Japán

MCFA: medium chain fatty acid= közepes szénláncú zsírsav

MS: Mass Spectrometry= tömespektrometria

n.d.: not detected=nem detektált

N: nitrogén

NCAIM: Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi kar, National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms

NCR: Nitrogen Catabolit Repression= Nitrogén katabolit represszió

N-forrás: Nitrogén forrás

NL: Hollandia

NMR: Nuclear Magnetic Resonance= Mágneses magrezonancia

O: oktánsav

OIV: International Organisation of Vine and Wine =Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet

QDA: Quantitative Descriptive Analysis= mennyiségi leíró analízis

QS: Quorum Sensing

QSM: Quorum Sensing molekula

*S. bacillaris: Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)*

*S. cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae*

*S. uvarum: Saccharomyces bayannus var. uvarum*

TKE: telep képző egység

UVAPM: Uvaferm® PM kereskedelmi starter

UVA228: Uvaferm® 228 kereskedelmi starter

YAN: Yeast Assimilable Nitrogen= élesztő által asszimilálható nitrogén

*Z. bailii: Zygosaccharomyces bailii*

# 1. BEVEZETÉS

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 stressztűrésének 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. Továbbá a szintén fejlődő szőlészeti és borászati technológia következtében is felértékelődhet egy-egy tulajdonság.

A fent említett kérdéskörhöz kapcsolódva doktori kutatómunkám során *S. bacillaris* esetén különböző stresszhatások 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.

Célkitűzéseim voltak:

- 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 fent említett három faj és *Zygosaccharomyces bailii* (mint rendkívül toleráns, romlást okozó borélesztő) szaporodási képességeit nyomon követni, nem endogén eredetű, emelkedő közepes szénláncú zsírsavak okozta stressz esetén.

- *S. bacillaris*, *S. cerevisiae* és *S. bayanus var. uvarum* (továbbiakban *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.

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.

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

# 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A borászat egy komoly tradíciókkal rendelkező, azokra nagyban támaszkodó, innovációra mérsékelten nyitott ága az élelmiszeriparnak. A bor, mint végtermék, egy olyan gyorsan fogyó fogyasztási cikk, amit élvezeti termékként definiálhatunk, ezáltal érzékszervi tulajdonságai rendkívül fontosak (Lockshin *et al.*, 2000). Az ágazat és a termék legfontosabb jellemzőit szem előtt kell tartani bármilyen újítás üzemi gyakorlatban való elterjedéséről van szó, hiszen mind fogyasztó, mind termelői oldalról elképzelhető racionális vagy irracionális ellenállás az adott újdonsággal szemben. Egy harmadik tényező Európai Uniós és magyar jogi környezet, ami a hamisítások elkerülése érdekében az élelmiszeripari termékek közt kiemelt figyelmet szentel a bornak, a borkészítésnek, ezáltal részletekbe menően szabályozott a technológia során engedélyezett lépések, segéd- és adalékanyagok köre.

A borászati technológia esszenciális része a must borrá erjesztése, ami során a szőlőmust mint alapanyag összetett változásokon megy át. Elsősorban ennek során alakulnak ki azon fő analitikai paraméterek, ami a végtermék minőségét, érzékszervi tulajdonságait nagyban befolyásolják. Az alkoholos erjedés irányítása a korszerű technológia elengedhetetlen része: a must alapanyag fő beltartalmi paramétereinek ismerete, alkalmanként annak módosítása; a megfelelő élesztő törzs/ek starter kultúraként való használata; az erjedés fizikai paramétereinek kontrollálása (Eperjesi, 2010). Azonban a mikróbás folyamat irányítása pusztán indirekt módon történhet, hiszen nem egyes kémiai reakciókról van szó, hanem összetett energianyerési útvonalakról, vagy még inkább hálózatokról, aminek befolyásolása mindig összetett változást/választ jelent (Noda-Garcia *et al.*, 2018).

Az élelmiszer biotechnológiai folyamatok közt meg kell különböztetni azokat a folyamatokat, ahol a biomassza képzés, vagy egyes erjedési anyagcseretermékek, -termék csoportok ipari körülmények közt történő mikrobás előállítása a cél azoktól, ahol a fermentált élelmiszer előállítása során az erjesztés közege maga a végtermék. A bor erjesztése az utóbbi csoportba tartozik, ami magával vonja, hogy nem az élesztősejtek számára optimális, hanem a végtermék minőségnek szempontjából optimális paramétereket alkalmazza a technológia. Mégis a borászati szempontból jelentős élesztők toleranciája lehetővé teszi, hogy az optimálistól eltérő feltételek ellenére (pH, hőmérséklet, tápanyagok stb.) a mustot hatékonyan borrá erjesszék. A 1. táblázat érzékelteti, mennyire más körülményeket kell biztosítani (milyen kompromisszumok fogadhatók el), ha a cél kiváló minőségű újbor, vagy ipari élesztő szaporítás, tehát jó vitalitású és viabilitású sejttömeg előállítása (Bauer és Pretorius, 2000).

**1. táblázat:** A növekedési kondíciók összehasonlítása a *Saccharomyces cerevisiae* különböző felhasználása esetén (Bauer és Pretorius, 2000 nyomán átszerkesztve)

| Bor erjesztés | Sejttömeg képzés |
|---|---|
| **Kémiai paraméterek** | |
| Magas cukortartalom (>200g/l) | Alacsony cukortartalom (<1g/l fed-batch esetén) |
| Számos esszenciális tápanyag, potenciális korlátozó | Kiegészített közeg, az összes potenciális korlátozó esszenciális tápanyaggal |
| Alacsony és csökkenő oxigén koncentráció | Magas oxigén koncentráció |
| $SO_2$ jelenléte | Nincs $SO_2$ |
| Magas etanol koncentráció | Nincs etanol, vagy nagyon kis mennyiségű |
| Nagy mennyiségű $CO_2$ | Nagyon kis mennyiségű $CO_2$ |
| Toxikus fémek potenciális jelenléte (pl. réz) | Toxikus fémektől mentesített közeg |
| Változó a N-források elérhetősége | Konstans nitrogén elérhetőség |
| **Biológiai paraméterek** | |
| Versengő mikroorganizmusok jelenléte | Steril közeg |
| Potenciális toxinok megjelenése (mikotoxinok, bakteriális toxinok) | Toxin mentes közeg |
| Xenobiotikumok esetleges jelenléte | Xenobiotikum mentes közeg |
| **Fizikai paraméterek** | |
| Nagy sűrűségű közeg (hiper-ozmózisnyomás) | Alacsony sűrűségű közeg |
| Hőmérséklet, az optimális alatti | Hőmérséklet, a növekedéshez optimális |
| Alacsony pH (3,0-3,7) | Optimális pH (5 körüli) |
| Szárítás (ADY) | Nincs szárítás |
| Fagyasztás-felolvasztás (ADY) | Nincs fagyasztás-felolvasztás |
| Növekedési feltételek a fermentáció során változnak (etanol, $CO_2$) | Növekedési feltételek állandó szinten tartása |
| **Élesztő metabolikus aktivitása** | |
| Fermentatív metabolizmus | Respirációs metabolizmus |
| Növekedés nem optimális feltételekkel | Növekedés optimális feltételek mellett |
| **A folyamat jellemző termékei** | |
| Magas etanol koncentráció | Nincs etanol |
| Nincs jelentős biomassza | Nagy arányú biomassza (sejttömeg) |

A stressz kifejezés egy (egy vagy több sejtű) szervezet különböző ingerekre adott nem specifikus válaszát jelenti (Selye és Bajusz, 1960). A borászatban az élesztők az alkoholos erjesztés alatt a számukra optimálistól számottevően eltérő feltételek mellett, több szempontból is stressz körülmények közt kénytelenek szaporodni (Bauer és Pretorius, 2000). A különböző stresszhatások

együttes jelentkezése egy komplex tolerancia választ követel az élesztősejtektől, azonban a borászatban nem elegendő az élesztősejt minimális életképessége, túlélése, hanem számottevő erjesztő képességre is szükség van, mindemellett a képzett metabolitok aránya is fontos. A különböző borélesztő fajok közötti, sőt az fajon belüli variabilitása is számottevő tolerancia szempontból (Rossouw és Bauer, 2016). Mégis a különböző nem optimális környezeti tényezőkkel szembeni általános élesztősejt adaptációs mechanizmus fajonként hasonló: a metabolikus aktivitás csökkentése, tartaléktápanyagok és stressz ellen védő molekulák felhalmozása, valamint a sejtfal megerősítése (Bauer és Pretorius, 2000).

Borászati viszonyok közt fontos szem előtt tartani, hogy az erjesztő élesztő számára az alacsony hőmérséklet, a potenciális N hiány, a magas kiindulási cukortartalom jelentette nagy ozmózisnyomás, majd a cukortartalom erjesztésével egyre emelkedő etanol toxicitása stb. egyidejű „multi-stresszként" jelentkezik. A kombinált stresszhatásra kombinált stresszválaszt kell adnia a sejteknek; egyes stresszhatások felnagyíthatják egymást, vagy leronthatják az egymással szembeni toleranciát, tehát nem feltétlenül proporcionális válaszra kell számítanunk (Perez-Torrado *et al.*, 2016). Ezt a képet tovább árnyalja a kombinált *Saccharomyces* × nem-*Saccharomyces* oligo/multistarterek használata, ahol fajok közti interakciót szintén befolyásolja a környezeti paraméretek jelentette stressz (Ciani *et al.*, 2016). Ha a fent említett stressz kombináció már nem tolerálható az erjesztő élesztő számára, akkor akadozóvá válhat az erjedés, sőt teljesen el is akadhat (Santos *et al.*, 2008), ami egyértelműen elkerülendő.

A fenti megállapításokat szem előtt tartva, a következő alfejezetekben igyekszem áttekinteni azokat a legfontosabb környezeti paramétereket, amik az élesztők alkoholos fermentációját befolyásolják szőlőmust közegben, különös figyelmet szentelve a magas cukortartalom hatásának és az édes borkülönlegességeket jellemző környezetnek. Áttekintem továbbá azokat a borászati jelentőségű élesztőket, amik szerepe az elmúlt két évtizedben számottevően átértékelődött (Fleet, 2008; Ciani *et al.*, 2010).

## 2.1. Az alkoholos erjedést befolyásoló tényezők

A must borrá erjesztése egy olyan komplex folyamat, ahol rendkívül sok tényező befolyásolja a fermentáció végbemenetelét egy időben változó mátrixot alkotva.

A dolgozatban csak az alkoholos erjesztést befolyásoló legfontosabb paraméterekre fókuszálok (akár a szőlő alapanyag, akár a szőlészeti/borászati technológia vonatkozásában), amiket az élesztők szempontjából környezeti paraméterekként definiálhatunk. Ezek közül is a következő alfejezetekben a teljesség igénye nélkül azok szerepelnek, amelyeket a kísérleti munkám során, mint független tényezőt alkalmaztam eltérő szinteken/fokozatokon. Ebből az okból kifolyólag például a pH hatását nem részletezem, holott az erjedést és általában minden mikrobás folyamatot nagyban befolyásoló faktor. A cukortartalmat, nitrogén ellátottságot, erjedési hőmérsékletet és alkohol tartalmat egyesével tekintem át, ugyanakkor hatásukat nem lehet teljes mértékben egymástól elkülöníteni, hiszen egy olyan közegben zajlik az alkoholos erjedés, ahol általában ezen tényezők egyike sem optimális az élesztősejtek számára. A konkrét stresszválaszon túl a borászati szempontból lényeges anyagcseretermékek aránya és összetétele is számottevően megváltozhat, azonban ez nagyban élesztő faj és egyes esetekben törzs függő tulajdonság.

### 2.1.1. A cukortartalom

A szőlőmust teljes érésben 50-50%-ban tartalmaz D-glükózt és D-fruktózt, azon két hexózt, amik az alkoholos erjedés során a szén-forrást (C-forrás) biztosítják az élesztők számára. A teljes érettségben levő szőlő mustjának redukáló cukortartalma 150-250 g/L közt van (Fleet, 2008), de leggyakrabban 180-220 g/l körül mozog. A teljes érést követően a fent említett arány eltolódhat a fruktóz javára, az abszolút cukor mennyiség növekedése mellett (Jackson, 2008). Az élesztőgombák tápanyagigénye szempontjából cukor minden esetben nagy feleslegben van jelen, tehát borerjesztési körülmények közt a C-forrás hiánya sosem limitáló tényezője a fermentációnak (a nitrogén forrással ellentétben). Általános borászati cél, hogy a redukáló cukortartalom számottevő mennyiségét, egyes esetekben teljes egészét, etanollá, szén-dioxiddá és egyéb erjedési melléktermékekké erjessze az élesztő populáció.

A must és később a kierjedt újbor cukortartalmának alakulását sokféle tényező befolyásolja, mint a szőlőfajta cukorgyűjtő képessége, a klimatikus viszonyok, az adott évjárat napos óráinak száma, a tőke terhelés, a szüreti időpont megválasztása stb., amelyek egy része pontosan tervezhető, míg más részére nem, vagy részben van ráhatása a szőlész- borásznak (Jackson, 2008). A tervezett késztermék

tulajdonságait szem előtt tartva érdemes a tervezhető kérdésekben dönteni, mind a szőlészeti, mind a borászati technológiát aszerint alkalmazni.

A természetes édes borok erjesztése jelentős kihívás az élesztőknek, ugyanis itt a magas, esetenként extrém mennyiségű kezdeti cukortartalom lecsökken, de a késztermékben is számottevő mennyiségű marad. Például az egyre emelkedő etanol tartalom mellett a folyamatosan számottevő ozmózisnyomás is nehézséget jelent. Ilyen must közegek esetén még borászati értelemben is extrém, de legalábbis nehéz viszonyok közt kell megfelelő erjesztést véghez vinniük az élesztősejteknek. A természetes édes borok készítése során kétségkívül fontos a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező, toleráns élesztő törzs(ek)et használni, amelynek nagy cukortartalom melletti metabolikus aktivitása a bor minőséget nem befolyásolja kedvezőtlenül.

A világszerte érzékelhető klimatikus változás miatt a teljes érésben tapasztalt cukorkoncentrációk a mustban egyre magasabbra tolódnak (Neumann és Matzarakis, 2014; Godden *et al*., 2015; Teslic *et al*., 2018a). Főként az átlagosnál magasabb hőmérséklet, valamint az emelkedett légköri szén-dioxid koncentráció a felelős a nagyobb mértékű cukor akkumulációért, mivel ezen klimatikus viszonyok közt a szénhidrátok szintézise a preferált a szőlő növényben az egyéb szekunder metabolitokhoz (mint pl. a polifenolokhoz) képest. A mindezzel együtt jelentkező szárazság stressz szintén a bogyókban való cukor akkumulációnak, valamint a szerves savak lebomlásának kedvez (Teslic *et al*., 2018b). Ebből következően hamarabb eléri a szőlő a teljes érést a cukor és szerves sav koncentráció szempontjából, azonban például aroma vagy polifenol vegyületek terén „éretlen" maradhat. A száraz borok készítésének szempontjából ez inkább kedvezőtlen változásokat eredményez, több okból kifolyólag is:

i) A must, majd a kierjedt bor főbb alkotóinak aránya változik meg, hiszen a nagy hőösszeg a szerves savak koncentrációjának csökkenéséhez vezet a cukor akkumulálásával párhuzamosan, így a borharmónia kialakítása esetenként rendkívül nehéz (Neumann és Matzarakis, 2014).

ii) A nagy mennyiségű redukáló cukorból az élesztők nagy mennyiségű etanolt képeznek, ami az általános fogyasztói elvárásoknak nem felel meg, valamint szintén diszharmóniát okozhat (Teslic *et al*., 2018a).

iii) A nagy mennyiségű cukor, ami jelentős ozmózisnyomást is jelent az élesztők számára, ami olykor nem tolerálható, így elhúzódó, vagy elakadó erjesztéshez vezethet, az erjedés során képzett metabolitok arányának eltolódása mellett. Ezen tételek újra erjesztése problémás lehet,

van, hogy az újra erjesztés sem vezet száraz tételhez, ami szintén nem szolgálja az általános fogyasztói elvárást (Malacrino *et al.*, 2005; Santos *et al*., 2008).

Mindezek következtében nemcsak a természetes édes borokban, hanem a száraz borok erjesztése esetén is egyre szélesebb körben lehet szerepe a fent említett erős, toleráns élesztőknek, Jelenleg világszerte a borerjesztések túlnyomó többségében a cél egy száraz tétel, és semmiképp sem jelentős maradék cukortartalom megtartása (Teslic *et al*., 2018a).

A kiindulási cukortartalom jelentette ozmózisnyomás ellen az alkoholos erjesztést végző élesztősejtek komplex választ adnak, amit metabolit arányuk is mutat (Remize *et al*., 2001). A magas ozmolit arány, a vízaktivitás csökkenése, a nagy turgornyomás, a változás a membrán permeábilitásban együttesen a lag fázis számottevő növekedéssel járhat (Ferreira *et al*., 2006). Fontos, hogy borászati szempontból az ozmózisnyomással szembeni tolerancia nem pusztán életképességet, hanem erjesztő képességet és a fermentáció lag fázisának mérsékelt elhúzódását is kell, hogy jelentse. Ezen stresszválasz része glicerin felhalmozása sejten belüli termeléssel és felvétellel egyaránt, aminek egyensúlya és stratégiája különböző fajok esetén eltérő (Li *et al*., 2009; Hubman *et al*., 2011). Általánosságban véve, de az ozmotikus stresszre is érvényes, hogy a stresszválaszok genetikai hátterét nagyon sok kutatás vizsgálta, főként a *S. cerevisiae* esetén, aminek áttekintése meghaladja ezen dolgozat kereteit. Az ozmotikus stressz elsődleges érzékelése a MAPK-HOG (Mitogen-Activated Protein Kinase- High Osmolarity Glycerol) szignál transzdukciós útvonalon történik, ami a leghatékonyabb válasz reakciót teszi lehetővé a nagy ozmózisnyomás ellen (Jimenez-Marti, 2011). Mindez komplex genetikai szabályozást takar, transzkripciós és transzlációs szinten is változást jelent, valamint különböző karrier fehérjék működését is módosítja (Peters és Thevelein, 2014).

A glicerin termelés egyes fajokban fontos ozmotikus regulátornak bizonyult. Míg a *S. cerevisiae* az intracelluláris térben (nagyrészt saját szintézisből származó) glicerint számottevő mértékben felhalmozza, addig a *S. uvarum* a szintézis mellett nagyobb mértékben bocsátja a megtermelt glicerint a sejten kívüli térbe, valamint ezzel párhuzamosan hagyatkozik az extracelluláris térből felvett glicerinre is (Perez-Torrado *et al.*, 2016).

A magas kiindulási cukor jelentette stresszválasz élesen nem elkülöníthető például a hidegstresszre adott választól, mivel például részben hideg-sokk fehérjék (pl. Hsp104p, Hsp12p), valamint trehalóz szintézise is történik (Li *et al*., 2009; Rossouw *et al*., 2013).

Az alábbiakban az ozmotikus stressz szempontjából leginkább érintett két bortípusra térek ki.

#### 2.1.1.1. Természetes édes borok

Természetes édes borként definiálhatunk minden olyan szőlőmustból erjedt borászati terméket, aminek redukáló cukortartalma a végtermékben számottevő, és csak az eredeti mustból származik. A jelenleg érvényes borászati szabályozás szerint a borok édesítése 45 g/l cukortartalomig több eljárással is engedélyezett (szőlőmust sűrítmény, rektifikált mustsűrítmény), de 45 g/l cukortartalom fölött csak természetes édes borok készíthetők. (A likőrborokat a jogi szabályzás nem tekinti bornak, hanem külön kategóriába sorolja) (Commission Regulation (EC) No. 607/2009). A kategória magában foglalja a késői szüretelésű, töppedt, túlérett tételeket, jégborokat, szalmaborokat és botrítizálódott borokat egyaránt (az utóbbival a **2.1.1.2.** alfejezet foglalkozik részletesen). Az erjedést követő maradék cukortartalom széles tartományban mozoghat: min. 45 g/L-től néhány száz g/L-ig egyes botrítizálódott borkülönlegességek esetén, ugyanakkor kiugró értékek is előfordulhatnak, mint 500 g/L felett a Tokaji Esszenciában (Magyar és Soós, 2016).

Tehát nem minden szőlőmust esetében cél a teljes cukortartalom kierjesztése, azonban a magas kiindulási cukor koncentráció és ezzel a magas ozmózisnyomás jelentős kihívás az élesztő biota számára (Malacrinó *et al.*, 2005; Arroyo-Lopez *et al.*, 2009). Jellemző ezen túlérett mustok kiindulási cukortartalmára a fruktóz hangsúly, ami az erjedést követően még hangsúlyosabbá válik, mivel a borélesztők többsége glükofil (Tronchoni *et al.*, 2009; Liccioli *et al.*, 2011). Édes borok erjesztése során csökkenő, de folyamatosan jelenlevő, számottevő redukáló cukor többlet mellett az élesztőknek a fokozatosan emelkedő etanol koncentrációt is tolerálniuk kell. A két tényező együttesen jelentős mértékben befolyásolja az erjedési melléktermék képzését (Ferreira *et al.*, 2006), valamint a kombinált stresszhatás az önállóan vett tolerancia értékeket is lerontja (Santos *et al.*, 2008; Zinnai *et al.*, 2013).

### 2.1.1.2. Tokaji borkülönlegességek

A Tokaji borkülönlegességeket azért különíti el ez az alfejezet a természetes édes boroktól, mert a botrítizálódás során jelentősen megváltozik az alapanyag és az élesztő biota összetétele, ami számottevően befolyásolja az aszúsodott mustok erjesztését. Valamint, azért a Tokaji borkülönlegességeket tárgyalja külön és nem a botrítizálódott borokat általában, mert az aszúsodás és a betöppedés mértéke ezen magyar borkülönlegesség esetén egyedülállóan magas, ami a világ egyéb botrítiszes termékeitől (Sauternes, Ruszti Ausbruch, Trockenbeerenauslese, egyes szalma borok stb.) megkülönbözteti; továbbá olyan egyedülálló körülményeket teremtenek, ami mind az alkalmazott borászati technológiát, mind az alkoholos erjedést befolyásolják (Magyar és Bene, 2006; Ribereau-Gayon *et al*., 2006; Magyar *et al.*, 2008a; Sipiczki *et al*., 2010; Magyar és Tóth., 2011; Magyar és Soós, 2016).

A *Botrytis cinerea* metabolizmusa és a fizikai bekoncentrálódás egyensúlyának következtében az egyéb édes borokhoz képest is extrém magas kiindulási cukortartalmat kell tolerálniuk az erjesztés során domináló élesztőknek, ami a nemes rothadást végző penészgomba glükóz preferenciájának köszönhetően mindig fruktóz túlsúlyos. Bár a bogyóban a cukortartalom többnyire 600 g/l fölött van, az aszúszemek musttal vagy borral való áztatása következtében a kiindulási cukor koncentráció tartomány általában 250-350 g/L közé esik az erjesztés előtt álló, úgynevezett nyers aszúk esetén, de az Esszenciáknak az 500 g/L-t is jóval meghaladhatja (Magyar, 2011).

Mivel azonban nem kizárólag fiziko-kémiai változásról van szó a botrítizálódás során, hanem a *B. cinerea* anyagcseretevékenységéről (a mellette előforduló élesztős és baktériumos tevékenységgel együtt), összetett változáson megy át az alapanyag az aszúsodás során (Magyar, 2011; Kerényi, 2013). Például számottevő *B. cinerea* eredetű glicerin koncentráció található az alkoholos erjesztés kezdetén, ami az élesztősejteket segíti a nagy ozmózisnyomás tolerálásában (Ribereau-Gayon *et al*., 2006).

A cukor- és glicerin tartalmon kívül jelentős mértékben változik a szerves savak mennyisége és összetétele. A betöppedés miatt az abszolút koncentráció emelkedik, azonban a borkősav és almasav tartalmat képes hasznosítani a *B. cinerea*. Bizonyos savakat is termel, amelyek nem voltak eredetileg jelen a bogyóban (pl. glükonsav, glükuronsav, galaktársav), valamint részben az aszúsodást kísérő ecetsav baktériumos tevékenység következtében a glükonsav és az ecetsav koncentráció is emelkedik (Magyar, 2011).

Egyes botrítiszes anyagcseretermékek, feltételezett inhibitorok, befolyásolhatják a későbbi alkoholos erjedést, valamint a *B. cinerea* nitrogén felhasználása következtében a számottevően

lecsökken az élesztők számára felvehető nitrogén koncentráció, ami az egyébként is sok kihívást jelentő erjesztést még nehezebbé teszi (Naumov *et al*., 2002; Mills *et al*., 2002; Nisiotou *et al*., 2007).

Az egészséges bogyó felületén megtalálható élesztő biota erős szelekción megy át az aszúsodás, az aszúszemek tárolása, majd az alacsony hőmérsékleten való erjesztés következtésben (Antunovics *et al*., 2003; Magyar és Soós, 2016). Mindez cukor és hidegtűrő fajok törzseinek dominanciáját jelenti, valamint általában igaz, hogy a spontán alkoholos erjedés kezdetén a biota számottevően átalakult. Nem a normál mustok erjedésére jellemző *Kloeckera/Hanseniaspora,* fajokba tartozó törzsek dominálnak az erjedés elején, hanem *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina), Torulaspora delbrueckii* vagy *Zygosaccharomyces rouxi* stb. (Magyar és Bene, 2006; Rantsiou *et al*., 2013; Magyar és Soós, 2016).

A spontán erjedés későbbi szakaszában felszaporodó *Saccharomyces* biota összetétele is eltér a közönséges borok erjesztésétől. A nagy törzsi változatosság mellett a legfeltűnőbb különbség a *S. uvarum* gyakori előfordulása (Magyar *et al*., 2008a, Naumov *et al*., 2011).

### 2.1.2. A hőmérséklet

Általános mikrobiológiai csoportosítás szerint a borászatban releváns hőmérséklet tartomány (5-28 °C) a mezofil és a pszichrotoleráns mikrobák szaporodásának kedvez. A borászati szakirodalomban az utóbbi csoportot inkább a szinoním kriotoleráns megnevezéssel illetik. Ugyanakkor ezen tartományok és elnevezések használata nem szerencsés, mert nem jól választja szét a borászatilag hidegtűrő és nem hidegtűrő fajokat, valamint általában csak a növekedésre alapozott kategorizálás. Mivel a végtermék minősége magasabb prioritást élvez, mint az élesztők hőmérsékleti optimuma, ezért a sejteknek kisebb-nagyobb mértékben hőmérséklet okozta stressz-szel kell szembesülniük, ami nem csak a sejtszaporodásra, ezzel együtt az erjedés időtartamára, hanem az erjedésben résztvevő élesztő fajok összetételére és az erjedés során képzett metabolitokra is, tehát a végtermék minőségére is hatással vannak (Fleet és Heard, 2003).

A korszerű borászati technológiában alacsonyabbra tolódó erjesztési hőmérsékleti trendek figyelhetők meg, ha a néhány évtizeddel korábbihoz hasonlítunk, ami az alapanyag eredetű primer, valamint az alkoholos erjedés során képzet szekunder illékony komponensek megőrzését célozza. A jelenleg reális tartománytól (2. táblázat) alkalmanként még inkább alacsony tartomány felé térnek el, ezzel fokozatosan még alacsonyabbra tolva az átlagos értékeket, például fehér borok esetén 10-15 °C közé (Ribereau-Gayon *et al*., 2006). Ugyanakkor szem előtt kell tartani, hogy hol van az adott erjesztést végző élesztő elfogadható szaporodási és erjesztési sebességének határa. Az erjesztési

hőmérséklet lejjebb tolódásának oka többek közt a fogyasztói ízlés változása, illetve annak szolgálata, a gyümölcsös, friss illat és íz jegyek felértékelődése. Mindezt a mára széles körben elterjedt koracél tartályos erjesztés, valamint elérhető árú hőmérséklet szabályozó/vezérlő rendszerek teszik lehetővé.

**2. táblázat:** Különböző bortípusok reális erjesztési tartománya (Jackson, 2008 nyomán átszerkesztve)

| Bor típus | Jellemző erjesztési hőmérséklet tartomány (°C) |
|---|---|
| Fehér | 16-18 vagy 20-23 |
| Rozé | 16-18 |
| Siller | 25-28 |
| Vörös | 25-28 |
| Pezsgő | 10-18 |
| Tokaji botrítiszes borkülönlegesség | 10-15 |

A fent említett hőmérséklet intervallumokból felfelé mozdulva értelemszerűen nő az erjesztő élesztők szaporodási sebessége, az erjesztés dinamikája gyorsul, ami kedvező, azonban metabolikus aktivitásuk is módosul (például növekvő acetaldehid, glicerin, ecetsav képzés), ami kedvező vagy kedvezőtlen érzékszervi változást eredményez a végtermékben, valamint a képződő etanol toxikusságát is fokozza (Fleet és Heard, 2003).

Az egyes élesztő fajok hidegtűrése nagyban különbözik, például a *S. uvarum* kritoleráns fajként az egészen alacsony erjesztési hőmérsékletet is képes tolerálni (4-6 °C), továbbá a *S. bacillaris*-t is pszichrofil fajként írták le (Mills *et al*., 2002; Sipiczki, 2003). Ugyanakkor a hőmérsékleti változás számottevően befolyásolja az erjedés lefutást, *S. uvarum* lag fázisának ideje már 24 és 13 °C közt tekintve is jelentősen megnövekszik (Masneuf-Pomarede *et al.*, 2010).

Hideg stressztolerancia vizsgálatok során hideg rezisztens *Saccharomyces* fajokban alacsony hőmérsékletű (12 °C) erjesztés során magasabbnak találták a trehalóz és a szén metabolizmus intermediereinek (glükóz-1-foszfát és trehalóz-6-fozfát) koncentrációját, ami összességében gyors cukor felvételt, azonban *S. cerevisiae*-hez képest lassabb trióz-foszfát képzést jelent (Lopez-Malo *et al*., 2013), ugyanakkor a komplex stresszválasz, a védekezés része a sejten belüli és plazma membrán lipidek megváltozott zsírsav aránya (Torija *et al*., 2003), valamint Hsp fehérje szintézis (Bauer és Pretorius, 2000), melyek egyike sem választható el élesen egyéb stresszválaszoktól.

A hőmérséklet változása módosítja az élesztők gén kifejeződését, az ezáltal képzett fehérjéket, így végsősoron a képzett extracelluláris metabolitokat is, ennek borászati szempontból jelentős következménye a megváltozott cukor felvétel (Rodrigues *et al.*, 2016), nitrogén felvétel (Gobert *et al.*, 2017), etanol képzés (Arroyo-Lopez *et al.*, 2009) stb, Az erjedés hőmérséklete hatással van az erjesztő élesztő teljes metabolit képzésére, amit nehéz külön választani a borászati viszonyok közt jelentkező többi stressztől.

### 2.1.3. A nitrogén ellátottság

Az alkoholos erjedés során borászati viszonyok közt a megfelelő nitrogén ellátottság kulcs kérdés, hiszen a must erjesztés körülményei között a nitrogén, és nem a szén forrás a limitáló szubsztrátja a sejtek energia nyerési folyamatának. Az élesztők által asszimilálható nitrogénnek (yeast assimilable nitrogen= YAN), vagy magyar szóhasználattal olykor azonnal felvehető nitrogénnek (AFN) nevezzük azon szabad alfa aminosavak, amidok és ammónia/ammónium összességét, amit a borélesztők az alkoholos erjedés oxigén szegény körülményei közt képesek hasznosítani (Henschke és Jiranek, 2003; Ribereau-Gayon *et al*., 2006). A szőlőmustok teljes nitrogén tartalmú anyag tartalma az YAN-nél jóval magasabb, azonban az élesztők limitált proteázai, valamint az alkoholos erjedés oxigén szegény körülményei nem teszik elérhetővé az teljes nitrogén mennyiség hasznosítását. A mustok YAN tartalma nagyon széles határok közt mozoghat, a fajta, a klimatikus- és talajviszonyok, a szőlő termesztés technológia, érettségi fok stb. befolyásolja (Henschke és Jiranek, 2003). Az egyes élesztő fajok meghatározott aminosav preferenciával rendelkeznek, ugyanakkor ebben jelentős fajon belüli variabilitás is tapasztalható (Gutiérrez *et al*., 2012). A mustban elérhető aminosavakat csoportosítva preferált, közepes mértékben hasznosított, nem preferált és nem asszimilált nitrogén forrásként (N-forrás) különíthetünk el (Henschke és Jiranek, 2003; Gobert *et al*., 2017).

Összetett N-forrás esetén a különböző nitrogén források intracelluláris térbe való felvételét a nitrogén katabolit represszió (NCR) szabályozza. *S. cerevisiae* esetén, mivel például az aszparagin preferált forrás, jelenléte a mustban/erjedő borban visszaszorítja az egyéb elérhető N-források hasznosítását (Ter Schure *et al*., 2000; Marks *et al*., 2003; Beltran *et al*., 2004). Az erjesztés kezdetén, amikor a preferált N-források jelen vannak a NCR aktív, tehát az elsőként hasznosított N-tartalmú vegyületek permeázai kifejeződnek (a nem preferáltak pedig represszió alatt vannak), majd ahogy ezen vegyületek koncentrációja csökken az extracelluláris térben, az NCR gyengül, amíg egy derepresszált állapotot el nem ér (Ter Schure *et al*., 2000).

Egy konkrét borerjesztéshez szükséges nitrogén mennyisége függ az erjesztés körülményeitől: az erjesztő élesztő törzstől, a kiindulási cukortartalomtól, a hőmérséklettől stb. (3. táblázat) (Gobert *et al*., 2017; Rollero *et al*., 2018.). A jelenleg engedélyezett, széles körben elterjedt szerves és szervetlen tápsó használati gyakorlat azonban, a rendkívüli szélsőségektől eltekintve, fedezi az élesztők általános nitrogén igényét a sejt növekedéshez és az erjesztéshez, ami a biztonságos erjedés lefutás biztosításához 400-500 mg N/L-t jelent. A nem endogén nitrogén adagolás ideje, mennyisége és összetétele befolyásolja a biomassza képzést, a sejtek viabilitását, az erjedés lefutását, valamint a termelt aroma komponensek összességét. (Hernandez-Orte *et al*., 2006; Hazelwood *et al.*, 2008). Jelenleg széles körben elfogadott nézet, hogy a borélesztők nem képesek hasznosítani oxigén szegény körülmények közt az L-prolint, ami a mustban elérhető aminosavak közül jelentős, átlagosan 500 mg/L koncentrációban van jelen (Taillandier *et al*, 2007; Gobert *et al*., 2017; Englezos *et al*., 2018a).

**3. táblázat:** A *S. cerevisiae* aminosav preferenciája különböző erjesztési hőmérsékleten a YAN hasznosítási ráta alapján (Gobert *et al*., 2017 nyomán átszerkesztve)

| YAN | 28 °C | 20 °C |
|---|---|---|
| Alanin | B | C |
| Ammónium | B | B |
| Arginin | C | C |
| Aszparagin | A | A |
| Aszparaginsav | A | B |
| Cisztein | C | C |
| Fenil-alanin | B | A |
| Glicin | C | A |
| Glutamin | A | B |
| Glutaminsav | B | B |
| Hisztidin | C | A |
| Izoleucin | A | B |
| Leucin | A | C |
| Lizin | A | A |
| Metionin | B | A |
| Prolin | C | C |
| Serin | A | C |
| Tirozin | C | B |
| Treonin | A | A |
| Valin | B | C |

A: preferált; B: átmeneti; C: elenyészően hasznosított D: nem hasznosított nitrogén forrás.

Az elmúlt években a borászati kutatás frontvonalában lévő kérdéskör a különböző élesztő fajok abszolút nitrogén igényének és nitrogén preferenciájának leírása, ami a nem-*Saccharomyces* élesztő starterek használatának elterjedésével került előtérbe. Az oligo-/ multistarterek használata esetén fontos vizsgálni az egyidőben használt törzsek komplex direkt vagy indirekt interakcióját is (Ciani és Comitini, 2015; Kemsawasd *et al*., 2015; Rollero *et al*., 2018). Az indirekt interakció része az azonos mátrixból történő nitrogén felvétel, hasonló vagy eltérő preferenciák, a felvételben való versengés, esetleg egymás limitálása (Andorra *et al*., 2012; Medina *et al*., 2012; Taillandier *et al*., 2014; Rollero *et al*., 2018). Ugyanakkor a megfelelő nitrogén felvétel nem csak a sejtek szaporodása miatt elengedhetetlen, hanem nagyban meghatározza a fermentáció során képzett metabolitok mennyiségét és arányát, ami befolyásolja a borminőséget is.

A nem megfelelő N ellátottság a sejten belüli aminosav szintézis elakadásához és ennek eredményeként számottevő hidrogén szulfid felszabaduláshoz, majd végül az erjedés elakadásához vezethet (Jiranek *et al*., 1995). A starter kultúra szelekció egyik alapvető lépése, az alacsony $H_2S$ képzéssel rendelkezzen a starter jelölt, így csökkentve a kellemetlen illat hiba előfordulásának valószínűségét. Megfelelő tápsó adagolási technikával a $H_2S$ képzés okozta illat hiba teljes mértékben elkerülhető.

Az alkoholos fermentáció során elérhető N-forrás mennyisége és összetétele prekurzorként befolyásolja az erjesztő élesztők biogén amin képzését is (Garcia Marino *et al*., 2010; Wang *et al*., 2014). Ugyanakkor a képzett bioaktív komponensek mennyisége és összetétele számos tényező függvénye, sőt jelentős az fajok közötti és fajon belüli diverzitás is mind termelés mind tolerancia szempontjából (Manfroi *et al*., 2009; Lorenzo *et al*., 2017).

Az aromás alkohol képzést szintén befolyásolja a nitrogén ellátottság, illetve ezen belül az aromás aminosavak, mint prekurzorok aránya. Az élesztők az Ehrlich-útvonalon keresztül képzik őket az alkoholos erjedés során, azonban mennyiségük és összetételük nagyban faj függő tulajdonság (Hazelwood *et al*., 2008; Gonzalez *et al*., 2018a). Több szempontból is jelentős triptofánból, tirozinból valamint 2-fenilalaninból képződő triptofol, tirozol és 2-fenil-etanol, mivel potenciális bioaktív tulajdonságúak, a borok íz és illat kialakításában részt vesznek, valamint sejtnövekedést reguláló tulajdonságuk is van (Zupan *et al*., 2013; Avbelj *et al*., 2015; Gonzalez *et al*., 2017).

A N tartalmú anyagok összetétele a mustban befolyásolja, más tényezőkkel együtt, a különböző illó komponensek szintézisét, amiben a fajok közt és fajon belül is változatosság jelentkezik. A N felvétel függ az elérhető N-forrásoktól, az erjedés hőmérsékletétől (Gobert *et al*., 2017), annak dinamikája fajok közt és fajon belül is számottevően eltérhet (Englezos *et al*., 2018a;

Rollero *et al*., 2018), az illó komponensek termelése ennek függvényében történik, ahol szintén számottevő eltéréseket lehet tapasztalni egyes fajok összes és egyes illó komponens termelését tekintve (Andorra *et al.*, 2010; Gobert *et al*., 2017; Englezos *et al*., 2018a,b,c; Rollero *et al*., 2018, Stribny *et al.*, 2015; Prior *et al*., 2019).

### 2.1.4. Az alkohol tartalom

Az alkohol minden élő szervezetre toxikus hatású, azonban annak határértéke, illetve a sejtek toleranciája jelentősen különböző (Bauer és Pretorius, 2000). A borászatban általában fokozatosan emelkedő alkohol szintet kell a sejteknek tolerálniuk, mindemellett csökkenő ozmózisnyomást, valamint növekvő potenciális tápanyaghiányt (Ohta *et al.*, 2016). Különös figyelmet kell fordítanunk azokra a must alapanyagokra, ahol a kiindulási cukortartalom-többlet egyértelműen édes bor készítésére alkalmas, ugyanis itt az ozmózisnyomás abszolút értékben csökken az etanol koncentráció emelkedésével párhuzamosan, de az erjedés végén is számottevő marad, például Tokaji Aszú esetén a termékspecifikáció által rögzített minimum maradék cukortartalom 120 g/L (A Tokaj oltalom alatt álló eredetmegjelölés termékleírása).

Jellemzően 9-16 v/v% közötti természetes eredetű alkohol tartalommal találkozhatunk a kész borászati termékek esetén (a likőrborokat nem ide sorolva), amely tartomány már alsó értéke sem tolerálható a borászati jelentőségű élesztőfajok egy részének, azonban a felső határértéket a rendkívül alkoholtűrő törzsek lehetnek képesek csak túlélni (Pina *et al.*, 2004). A változó fogyasztói elvárások szerint jelenleg nagyobb az igény az alacsonyabb alkoholtartalmú tételekre, ugyanakkor a már többször említett cukortartalom emelkedés a nem-édes bor készítésre szánt alapanyagokban tendenciózusan emelkedő alkohol tartalomhoz vezethet, ami inkább elkerülendő (Jones, 2012). Minderre számottevő törekvések vannak kutatói és ipari oldalról egyaránt. Többek közt a nem-*Saccharomyces* élesztők alkalmazása során felmerülő egyik cél, az azonos mennyiségű kiindulási cukorból kisebb mennyiségű etanol erjesztése, konvencionális *S. cerevisiae*-vel való erjesztéshez képest (Giaramida *et al*., 2013; Contreras *et al*., 2015; Englezos *et al*., 2016; Teslic *et al.*, 2018b; Varela és Varela, 2016). Hasonló törekvésekkel találkozhatunk söripari kutatásokban is (Michel *et al.*, 2016; Varela és Varela, 2016; Budroni *et al*., 2017; Kun-Farkas és Mecser, 2018; Bellut és Arendt, 2019).

A borélesztők szempontjából az etanol toxicitását nagyban befolyásolja az erjesztés hőmérséklete: az alacsonyabb erjedési hőmérséklet a kedvező, annak ellenére, hogy lassabb és alacsonyabb alkohol kihozatalú lehet, azonban így nem akad el az erjedés, a cukortartalom túlnyomó

részét képes a domináns élesztő kierjeszteni (Fleet és Heard, 2003). A magas alkohol koncentráció a *S. cerevisiae* sejtekben rendkívül komplex változást idéz elő, génkifejeződés, fehérjeszintézis és metabolitok szintjén egyaránt (Stanley *et al*., 2010). A magas etanollal szembeni sejt szintű válaszreakció sok szempontból azonos a hideg sokkra adott válasszal, illetve általánosan nem különíthető el egészében egyik stresszre adott válasz a másiktól, bizonyos mértékben mindkét stressz köthető a vízaktivitás változásához. Mindkét esetben Hsp fehérjék szintézise történik, amik például a sejt membrán hidrofobitásán változtatanak (Bauer és Pretorius, 2000). Ugyanakkor a sejten belüli térben az etanol befolyásolja a fehérjék harmad- és negyedrendű szerkezetének kialakulását (Ma és Liu, 2010). Megváltozik a foszfolipid, mannoprotein, szaturált zsírsav és izoprenoid szintézis, tehát a sejtfal és membrán összetétele módosul (Ma és Liu, 2010). Átalakul az aminosav metabolizmus az etanol stressz során a sejten belüli triptofánnak és prolinnak van szerepe a tolerancia kialakításában (Ma és Liu, 2010; Snoek *et al*., 2016). A trehalóz és glikogén termelés, az MAPK-HOG szignál transzdukciós útvonal aktiválódása etanol stressz esetén szintén megfigyelhető (Santley *et al*., 2010). Nagy etanol koncentráció mellett változik a sejt elektrokémiai egyensúlya, továbbá a membrán „ion szivárgásához" is vezethet (Snoek *et al*., 2016). Eltérő a *Saccharomyces* fajok cukor felvétele etanol stressz alatt, a *S. uvarum* cukorfelvétele kevésbé befolyásolt a növekvő alkohol koncentráció által *S. cerevisiae*-hez képest (Zinnai, *et al*., 2014).

### 2.1.5. Egyéb gátló anyagok

Az alkoholos erjedést számos egyéb endogén vagy exogén anyag jelentléte befolyásolhatja, melyeknek származása/eredete változatos lehet. Az élesztők tevékenységét gátolhatja például nem megfelelő permetezési gyakorlat eredményeként a mustban maradó permetezőszer maradvány (Cabras és Angioni, 2000); adott élesztő fajon belüli kommunikációs vegyületek, ún. quorum sensing molekulák (Avbelj *et al*., 2016); ritkán, főként botrítiszes alapanyag esetén vitaminhiány (Ribereau-Gayon, 2006); közepes szénláncú zsírsavak (Viegas *et al*., 1989); killer toxinok (Zagorc *et al*., 2001); illetve egyéb bakteriális vagy penészgomba eredetű metabolitok stb. Mindezek közül a dolgozatomban a közepes szénláncú zsírsavakkal foglalkoztam bővebben, ezért erre térek ki.

A közepes szénláncú zsírsavak és észtereik általános élesztős szekunder metabolitok, azonban mennyiségük és összetételük változó (Capucho és San Romano,1994; Balmaseda *et al*., 2018). Borerjesztés során az közepes szénláncú zsírsavak (MCFA) termelését befolyásolhatja az erjesztő élesztő faj vagy törzs (Bagheri *et al*., 2018), a hőmérséklet és a levegőztetés (Restrepo *et al*., 2019), az elérhető aminosavak, mint N forrás (Wang *et al*., 2016) stb. A zsírsavak termelése hőmérséklet

függő, összetétele a sejt membrán hideg tűrését és egyéb ellenállóképességét határozza meg többek közt (Torija *et al.*, 2003). Az oxigén hiány következtében pusztuló sejtpopuláció számottevő közepes szénláncú zsírsavat bocsát az erjedő borba, ami a sejten belül nem detektálható jelentős mértékben, ellenben az extracelluláris térben igen, tehát nem okozója, hanem következménye a folyamatnak (Bardi *et al.*, 1998). Ugyanakkor a must/bor közegbe bocsátott közepes szénláncú zsírsav molekulák felelősek lehetnek más tényezőkkel együtt az erjedésben elakadt borok újraoltásának sikertelenségéért (Bisson, 1999). Továbbá az MCFA termelés felelős lehet fajok közötti vagy -belüli gátlásért, vagy akár egy starter kultúra dominanciájának kialakítását is akadályozhatja (Ciani *et al.*, 2016).

Folyadék vagy gáz kromatográfiás módszerrel azonosíthatók borból az MCFA molekulák, általában kis koncentrációban (pl. oktánsav:dekánsav:dodekánsav=4,4:8,9:0,3 mg/L), borminőségre gyakorolt hatás nélkül. Babikova és munkatársai (2012) úgy találták, hogy magasabb koncentrációban (pl. 16-30 mg/L oktánsav:dekánsav=2:3) negatív íz és illatjegyeket kölcsönözhet a bornak, pl. sajt, kecske sajt, szappan stb.

Korábbi vizsgálatok rávilágítottak, hogy erjedés vagy visszaerjedés szabályozó/gátló hatású lehet külső forrásból kis koncentrációjú MCFA adagolása (Babikova *et al.*, 2012; Baron *et al.*, 2017). Baron és munkatársai (2017) úgy találták, hogy egyes MCFA kombinációk hatékonyabbak, mint az adott zsírsavak önmagukban; pl. a 2:7:1arányú oktánsav:dekánsav:dodekánsav keverék 70 v/v% etanolban oldva. A MCFA adagolásra irányuló fent említett vizsgálatok során a gátolt élesztő populáció egy must összetett élesztő biotáját alkotó fajok együttesét jelentette (további specifikáció nélkül), vagy pedig kereskedelmi *S. cerevisiae* starter kultúrát. Az egyes élesztő fajok borászati viszonyok közti nettó termeléséről van elérhető adat az irodalomban (pl. lásd 5. és 6. táblázat), azonban a fajok toleranciájáról nem. A dolgozatban első általános vizsgálatként négy borászatilag jelentős élesztő fajra fókuszáltam (**4.2.4.** alfejezet).

## 2.2. Borászati jelentőségű élesztőgombák nagy cukortartalmú mustok erjesztésében

Ebben az alfejezetben igyekszem az egyéb erjedésipari alkalmazásoktól elkülönítve a borászatban több-kevesebb ipari jelentőséggel is bíró élesztő fajokat áttekinteni. Teszem ezt lehetőleg anélkül, hogy az emberiség történetének gyökereinél kezdődő leírást adjak, holott feltétlenül említést érdemel, különösen a *Saccharomyces* fajok esetében, azok hosszú évszázados/évezredes domesztikációja az élelmiszeripar különböző erjesztési folyamatai során.

### 2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Erre a fajra, mint első számú borélesztőre kell, hogy tekintsünk, nem pusztán ipari jelentősége miatt, hanem a must/bor körülményein való élettevékenysége miatt is. Mint az eukarióta sejtszerveződések modell-szervezete könyvtárnyi információ elérhető erről a fajról, aminek számottevően szűkebb köre foglalkozik az anaerob energianyeréssel és ezen belül a borászati viszonyok közt végzett alkoholos erjedéssel. Ugyanakkor még mindig legalább a jelen munka terjedelmében lehetne a *Saccharomyces cerevisiae*-ről eddig megszerzett ismereteket tömören, vázlatszerűen rendszerezni. Az alábbiakban csak a legfontosabb tulajdonságait szeretném részletezni.

Eredetéről, potenciális forrása(i)ról a mustban a vélemények a mai napig megoszlanak, különböző populáció dinamikai vizsgálatok bizonyították, hogy az egészséges szőlőbogyó felületén vagy a szőlőültetvény talaján és a szőlő növényen elenyésző számban található meg *S. cerevisiae* (Martini, 1992). Azonban a sérült bogyókon számottevően felszaporodik (10^5-6 TKE/mL nagyságrendig) feltehetően különböző rovarok (méhek, darazsak) közvetítésével, amely sejtszám még mindig alacsony a szőlőbogyó teljes biotáját tekintve (Mortimer és Polsinelli, 1999). Ezzel ellentétben a borászati üzem berendezésein (tartályok, zúzó-bogyózó, prés, hordók, csővezetékek stb.) nagy számban, változatos törzsei mutathatók ki. Ezen *S. cerevisiae* törzsek közt az autochton törzsek mellett korábbi években használt élesztő starterek is megtalálhatók. A különböző gépek, tartályok felületén megtelepedő élesztők összességét az adott borászat domesztikált, rezidens *Saccharomyces* biotájának tekinthetjük (Fleet és Heard; 2003; Ciani *et al*., 2004; Bokulich *et al*., 2013). Az adott szüreti periódusban használt starter kultúrák önmagukban is egy forrását jelentik a fajnak a borászatban, azonban ez a **2.3.** fejezetben szerepel részletesen.

A fentiekből következik, hogy a must kezdeti spontán élesztő populációjában a *Saccharomyces cerevisiae* csak kis százalékban található meg, azonban az alkoholos erjedés során változó környezeti paraméterek (főként a számottevően emelkedő alkohol tartalom) az erjedő borban a faj felszaporodásának kedveznek. Starter kultúra használat nélkül az erjedés 3-4. napjára szaporodik fel

jelentősen és veszi át a domináns szerepet, ami az erjedés végéig megmarad; köszönhető mindez például az egyéb, spontán biotát alkotó fajok mérsékelt etanol toleranciájának (Fleet és Heard, 2003). Tehát a bor kierjesztésében nagy szerepet játszó, a végtermék minőségét nagyban alakító fajról van szó. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a szőlő bogyó, erjedő must/bor élesztő biotáját tekintve nem elegendő információ, hogy mely fajról van szó, hiszen sok *S. cerevisiae* törzs nem kívánatos erjedési melléktermék képzésével a bor, mint végtermék érzékszervi tulajdonságait lerontja, például magas acetaldehid képzéssel (Romano *et al*., 1994) vagy magas hidrogén-szulfid képzéssel (Kumar *et al*., 2010). A szelekciónak, majd a szelektált, jó kondíciójú törzsek starter kultúraként való használatának mára nagyon nagy jelentősége van az ipari gyakorlatban. Spontán erjedéssel is lehetséges megfelelően bort erjeszteni, de a folyamat esetlegessége, az irányítás hiánya miatt kockázatos.

Rendkívül nagy változatosság figyelhető meg a sok mustból/borból izolált *Saccharomyces cerevisiae* fenotípusos tulajdonságai között, ezért nem is lehet egy abszolút listaként összegezni előnyeit, azonban vannak olyan alapvető tulajdonságai, amit fontos megnevezni a faj borászati szempontból történő jellemzésekor.

A faj hőmérsékleti optimuma (30 °C körüli) sajnos nem kedvez az illékony szőlő eredetű és fermentációs aromaanyagok megőrzésének, azonban a szélsőségektől eltekintve a *S. cerevisiae* képes a borászati szempontból releváns hőmérséklet tartományokban hatékonyan erjeszteni (Bauer és Pretorius, 2000). Ugyanakkor nem hidegtűrő faj lévén az alacsonyabbra tolódó erjesztési trendeknek megfelelően 15 °C alatti erjesztés esetén a cukortartalom kimerüléséig tartó fermentáció számottevően elhúzódhat.

A borászatban jelentős élesztők közt - a *S. uvarum*-mal együtt- kiemelkedő az alkohol tűrése azonban a különböző törzsei esetében ennek határa eltérő (Stanley *et al.*, 2010). A faj egyes kiemelkedően alkoholtűrő törzsei akár 18 v/v%-ot meghaladó etanolt is képesek termelni (Pereira *et al*., 2011), ami valójában pl. bioetanol gyártás során előnyös, a bor harmónia kialakítása során ez inkább problémaként jelentkezhet, az adott tétel érzékszervi tulajdonságait rontja. Általánosságban a *S. cerevisiae* törzsek egy értett szőlő mustját (kb. 200 g/L körüli cukortartalom) képesek szárazra erjeszteni, ha az egyéb erjedést befolyásoló tényezők ezt nem akadályozzák.

A szőlőmustban megtalálható monoszacharidok közül a *S. cerevisiae* a glükózt preferálja, mint a borászatban jelentős élesztők túlnyomó többsége, azonban a relatív fruktóz hasznosításban a faj törzsei közt nagy különbségek mutatkoznak (Liccioli *et al.,* 2011). Mindennek elhúzódó, akadozó, vagy elakadt erjedések újra indításában van ipari jelentősége (Bisson, 1999).

Az alkoholos erjedés során az élesztők által termelt ecetsav mennyisége rendkívül jelentős a végtermék minősége szempontjából, különösen, mert ez a nem kívánatos erjedési melléktermék a borból hatékonyan, az érzékszervi paraméterek számottevő lerontása nélkül nem távolítható el. Ebből kifolyólag, a törzs szelekció egyik elengedhetetlen lépése ezen tulajdonság screenelése, kiterjesztve arra is, hogy különböző, nem minden napi erjesztési helyzetben (mint extrém cukortartalom, alacsony erjesztési hőmérséklet vagy szegényes nitrogén ellátottság) miként alakul. A *S. cerevisiae* jellemzően az emelkedő cukortartalomra magasabb ecetsav termeléssel válaszol (pl. Magyar *et al*., 2008a), ami kiugróan magas cukortartalmú mustok esetén komoly probléma lehet, ugyanakkor ennek mértéke törzs függő tulajdonság (Erasmus *et al*., 2004).

Glicerin termelése átlagosnak mondható, egyes egyéb borélesztők számottevően több glicerint képesek termelni. A sejten belüli glicerin képzés dinamikájára az erjedés iniciációs szakaszában számottevő felhalmozást, majd lassú extracelluláris térbe való bocsátást jelent (Perez-Torrado *et al*., 2016).

A *S. cerevisiae* nitrogén felvétele az erjedés kezdeti szakaszában az egyéb borélesztőkhöz képest gyors (Gobert *et al*., 2017), specifikus nitrogén hasznosítása a borélesztők közt a legjobbnak bizonyul (Taillandier *et al*., 2007).

A faj aromás alkohol termelése nem csak az érzékszervi tulajdonságok kialakításában, hanem mint quorum sensing molekulák, azaz sejtsűrűség függő, sejtek közti kommunikációs vegyületekként is jelentősek (Rul és Monnet, 2015; Avbelj *et al*., 2016). A triptofol, tirozol és 2-fenil-etanol termelése és a termeléssel összekötött gének kifejeződése a növekedési fázis és sejt sűrűség függvénye, aminek időbeni lefutását Avbelj és munkatársai vizsgálták (2015). A *S. cerevisiae* quorum sensing molekula (QSM) termelése negatívan korrelál az alkohol tartalommal és pozitívan a N hiánnyal valamint a sejt sűrűséggel (Avbelj *et al*., 2015; Bagheri *et al*., 2018). A *S. cerevisiae* QSM molekula képzése a borélesztők közt a *S. uvarum*-mal együtt számottevően magasabb, mint a nem-*Saccharomyces* élesztőké (Gonzalez *et al*., 2018a). Gonzalez és munkatársai (2018b) vizsgálták *S. cerevisiae* és egyéb nem-*Saccharomyces* fajok növekedésének modulálását különböző bioaktív molekulák (szerotonin, melatonin, triptamin, triptofol, triozol, 2-fenil-etanol) jelentlétében. A vizsgált borélesztők közt jelentős különbség adódott, a *S. cerevisiae* növekedését a szerotonin egyértelműen lassította, a triptofol nem volt számottevő hatással, amíg a triptamin fajfüggő vegyes eredményt hozott.

A jelenlegi ipari gyakorlatban és a spontán erjedésben betöltött szerepéből kifolyólag is, a *Saccharomyces cerevisiae* tekinthető az etalonnak a borászati jelentőségű élesztők közt, mitöbb jelen

munkában is igyekszem, mint viszonyítási alapot használni az egyéb élesztők és tevékenységük leírása során.

### 2.2.2. *Saccharomyces bayanus var. uvarum*

A *Saccharomyces bayanus var. uvarum*-ot, melyet a jelen munkában a *S. uvarum*-ként rövidítek, a második legjelentősebb borélesztőnek aposztrofálhatjuk. A faj taxonómiai besorolása az elmúlt évtizedekben dinamikus változásban volt a különböző genetikai vizsgálatok eredményeit figyelembe véve. A *S. cerevisiae* fiziológiai változataként, majd önálló fajként való csoportosítását követően, jelenleg a *S. bayanus* fiziológiai változataként elfogadott (Pulvirenti *et al*., 2000; Naumov *et al*., 2011).

Előfordulása általában a *S. cerevisiae*-nél is ritkább a korábban említett természetes forrásokat tekintve (bogyó, talaj, feldolgozóüzem), azonban bizonyos speciális bortípusokhoz jól adaptálódott, ahol az erjedés során már nagymértékben előfordul, egyes esetekben a *S. cerevisiae*-t is megelőzve dominál (Demuyter *et al*., 2004; Naumov *et al*., 2011). Speciális, a S. *uvarum* szempontjából kedvező csoportot alkotnak a Tokaji- (Antunovics *et al*., 2003; Magyar *et al*., 2008a), a Sauterni- (Naumov *et al*., 2000) a Recioto- (Dellaglio *et al*., 2003) és az Amarone- (Torriani *et al*., 1999; Tosi *et al*., 2009) borok/borkülönlegességek készítési körülményei.

A *S. cerevisiae*-vel való rokonságából következik (korábban *Saccharomyces* sensu stricto csoportosítás, Vaughan-Martini és Martini, 1998), hogy számos diverz interspecifikus hibridjük izolálható borból, borászati környezetből (Naumova *et al*., 2005; Sipiczki, 2019). A természetes hibridek mellett a különböző hibridizációs technikákkal előállított szegregánsoknak ipari szempontból is van jelentősége, azonban ebben a dolgozatban ezt nem részletezem.

Kriotoleranciája (15 °C alatti erjesztés), ami akár 2-4 °C-on való aktivitást is takarhat (Masneuf-Pomarede *et al*., 2010) a jelenlegi alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódó erjesztési trendek szempontjából kedvező. Ezért a *S. cerevisiae*-hez képest eltérő plazma membrán összetétel felelős, aminek változását az alacsony hőmérséklet regulálja. A *S. cerevisiae* alacsonyabb hőmérsékleten a membrán fluiditást a hosszabb szénláncú telítetlen zsírsavak arányának növelésével biztosítja, míg a *S. uvarum*-nál ez nem megfigyelhető, ellenben a közepes szénláncú zsírsavak mennyisége számottevően megemelkedik (Torija *et al*., 2003).

*S. cerevisiae*-hez képest alacsonyabb etanol termelése a jelenlegi alkohol fogyasztási trendeknek kedvező, ugyanakkor a különböző nem-*Saccharomyces* élesztőkhöz képest önállóan alkalmas a must cukortartalmának kierjesztésére. Amennyiben nem biztosít az alacsony hőmérséklet szelekciós előnyt

számára, az *S. cerevisiae* jobb versengő lévén dominánssá válik vegyes erjesztés során (Masneuf-Pomarede *et al*., 2010; Magyar és Tóth, 2011).

Mérsékeltebb ecetsav termelése és annak kevésbé cukorkoncentráció függő mivolta (Rainieri *et al.*, 1999; Masneuf-Pomarede *et al.*, 2010) előnyös általánosságban minden borászati tevékenység során, azonban a magasabb kezdeti cukortartalmú mustok erjesztésekor kiemelkedően fontos lehet.

Glicerin termelése átlagos, a *S. cerevisiae*-től nem különböző (Masneuf-Pomarede *et al*., 2010; Magyar és Tóth, 2011). Az erjedés kezdeti szakaszában jellemzően a *S. cerevisiae*-nél kisebb mértékben halmozza fel az intracelluláris térben, majd azt relatíve hamar az extacelluláris térbe bocsátja (Perez-Torrado *et al*., 2016).

A faj szerves savtermeléséről változó eredmények találhatók az irodalomban, ami e tulajdonság változékonyságára utal. A *S. uvarum* egyes törzseinek jelentősége lehet a különösen meleg évjáratok savszegény mustjainak erjesztése során, ugyanis a nettó szerves savtermelés bizonyos mértékben kompenzálhatja az alacsony titrálható savartalmat. A faj almasav hasznosítása eltérő lehet az fajon belüli variabilitás és az erjesztési körülmények függvényében. Giudici és munkatársai (1995) almasav termelést figyeltek meg normál szőlőmustban, Rainieri és munkatársai (1999) fogyasztást normál szőlőmustban, Muratore és munkatársai (2007) számottevő termelést botrítiszes Malvasia must erjesztése során, Magyar és munkatársai (2014) minimális termelést szintetikus minimál médiumban. Számos munka megerősítette, hogy borostyánkősav termelése eltér a *S. cerevisiae*-től, nagyobb mennyiséget szintetizál az alkoholos erjedés során (Giudici *et al*., 1995; Muratore *et al*., 2007; Magyar *et al*., 2014).

Abszolút értékben vett aromaképzése nem magasabb a *S. cerevisiae*-nél, azonban annak összetétele számottevően eltér (Masnuef-Pomarede *et al*., 2010). Főként a fenil-alanin prekurzorból képzett 2-fenil-etanol és annak észtereit képzi nagy mértékben, amely vegyületek rózsa illatért felelősek (Muratore *et al*., 2007; Stribny *et al*., 2015).

A faj jelentősége a borászatban a *S. cerevisiae*-nél egyértelműen kisebb, azonban nehéz pontosan megbecsülni, mert a közelmúltban történt számos taxonómiai újra sorolás miatt a korábbi publikációkban és az ipari gyakorlatban, valamint a szárított starterkultúrák csomagolásán is egyes esetekben a *S. cerevisiae*-vel összemosódik. Ezért nagy jelentőséggel bírnak a faj genetikailag azonosított törzseivel végzett újabb tanulmányok, melyre dolgozatomban is törekedtem.

### 2.2.3. *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)*

A *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)* egy ígéretes nem-*Saccharomyces* starter jelölt. Kereskedelmi előállítása aktív szárított élesztő (ADY) formájában fejlesztés alatt van, jelenleg folyadék kultúra formájában elérhető egyes gyártóknál, például Olaszországban (Atecream 11 H, BioEnologia 2.0 S.r.l., Olaszország).

A faj taxonómiai besorolása dinamikusan változott az elmúlt évtizedekben. Kezdeti tanulmányozása *Candida stellata* név alatt folyt, mivel ettől a közeli rokonságú fajtól való elkülönítése kizárólag molekuláris biológiai módszerekkel lehetséges, a klasszikus mikrobiológiai eszköztár nem alkalmas megkülönböztetésükre. A 26S rDNS D1/D2 domainjében való eltérés segítségével különítette el a két fajt Sipiczki (2003), az új fajt *C. zemplinina* néven leírva. Ezt követően az új faj részletes fenotípusos identifikálása és széles re-klasszifikációs munka indult, aminek eredményeként megállapítható, hogy a korábban *C. stellata*-ra vonatkoztatott gyűjteményi törzsanyag és publikációk túlnyomó része a *C. zemplinina*ra vonatkozik, valamint, hogy a faj számos borászati szempontból értékes tulajdonsággal rendelkezik (Sipiczki, 2004; Csoma és Sipiczki 2008). Kiderült továbbá, hogy a borerjesztés során a korábban *C. zemplinina* helyett kimutatott *C. stellata* csak kisebb valószínűséggel fordul elő (Mills *et al*., 2002; Antunovics *et al*., 2003; Magyar *et al*., 2008a). További molekuláris biológiai munka bizonyította, izoenzim profilok és a 26S rDNS D1/D2 domain felépítésének segítségével, hogy a faj kis mértékű hasonlóságot mutat a *Candida* nemzetség típus törzsével (*Candida tropicalis*), azonban nagyobb fokú az egyezés *Torulopis bacillaris*-szal (*basiomyn Saccharomyces bacillaris*), ami a *Starmerella* kládba tartozik (Duarte *et al.,* 2012). Így a faj új, jelenleg is aktuális megnevezése *Starmerella bacillaris*, azonban a korábbi *Candida zemplinina* név szinonímként elfogadott. Jelen munkában az *S. bacillaris*t fogom használni.

A *S. bacillaris* előfordulásáról is változtak ismereteink az elmúlt két évtizedben, mivel korábban főként nagy cukortartalmú, botrítizálódott borok erjesztésével azonosították jelenlétét (Torija *et al*., 2001; Mills *et al*., 2002; Antunovics *et al*., 2003; Divol és Lonvaud-Funel, 2005; Magyar *et al*., 2008a). Mára többszörösen bizonyítást nyert *ubiquiter* előfordulása, bármely borvidéken, fehér és vörös, száraz és édes borok erjesztése során egyaránt, azonban a különböző kutatócsoportok változó geno- és fenotípusos diverzitást figyeltek meg (Tofalo *et al*., 2012; Masneuf-Pomarede *et al*., 2015; Englezos *et al*., 2015). Továbbá Eder és munkatársai (2019) különböző *Vitis* fajokon való előfordulását vizsgálták, miszerint sem az évjárat, sem a *Vitis* fajok nem adnak magyarázatot a *S. bacillaris* genetikai diverzitására.

A *S. bacillaris* előfordul a szőlőbogyó felületi biotájában, valamint a borászati eszközök felületén, mindkettő pontenciális reservoir lehet (Bokulich *et al*., 2013; Grangeteau *et al*., 2016). A többi nem-*Saccharomyces* élesztőtől eltérően nem csak az erjesztés kezdeti szakaszában (az erjedés vezetés függvényében, spontán 3-4 napig, starterkultúrás beoltás esetén jóval rövidebb ideig) képes számottevően elszaporodni, akár 10^4-6 TKE/mL nagyságrendig, hanem jelenléte kimutatható az erjedés végén is (Jemec és Raspor, 2005). Fontos megjegyezni, hogy az aszúsodott bogyókon is számottevő mértékben előfordul, a Tokaji Aszú, vagy szalmabor készítés technológiájában alkalmazott néhány hetes tárolás alatt pedig a bogyó felület biotájának egyik meghatározó faja lehet (Magyar és Bene, 2006; Rantsiou *et al.*, 2013).

Jelenleg is a tudományos érdeklődés előterében van a faj részletes feno- és genotípusos leírása (Tofalo *et al*., 2012; Pfliegler *et al.*, 2014; Masneuf-Pomarede *et al*., 2015; Englezos *et al*., 2015, Rollero *et al*., 2018; Eder *et al.*, 2019), más borélesztőkkel való összehasonlítása (Magyar és Tóth, 2011; Magyar *et al*., 2014; Rossouw és Bauer, 2016), borászati alkalmazhatósága és interakciója kevert tenyészetű erjesztés során (Ciani *et al*., 2016; Bagheri *et al*., 2018; Lencioni *et al*., 2018) valamint alkalmazhatósága szárított élesztő starter kultúraként (Domènech *et al*., 2018). Ezen munkák eredményeként számottevő ismereteink vannak már a *S. bacillaris*-ról, azonban még bőven van megválaszoltalan kérdés is. Például teljes genomjának szekvenálása csak az utóbbi években fejeződött be (Lemos-Junior *et al*., 2018; Rosa *et al*., 2018) további molekuláris biológiai munkák előtt utat nyitva.

A faj a mustban elérhető monoszacharidok közül a fruktózt preferálja (Sipiczki, 2004; Magyar *et al*., 2008a; Sipiczki *et al.*, 2010), ami aránylag ritka, azonban borászati viszonylatban értékes tulajdonság. Magyar és Tóth (2011) vizsgálatai alapján a *S. bacillaris* fruktofiliája valós borászati körülmények között (256 g/L kiindulási cukortartalmú valós Furmint szőlőmust erjesztése 18 °C-on) erősen megnyilvánul (a G/F aránya még a szintén fruktofil *C. stellata*hoz képest is 5x magasabb). A határozott fruktóz preferencia egy kevert tenyészetű erjesztésnél a glükofil *Saccharomyces* élesztőkkel kombinálva jól kiegészíthetik egymást. A faj jellemzően nem robusztus erjesztő, önmagában nem képes egy természetes szőlőmustot szárazra erjeszteni, azonban *Saccharomyces* élesztőkkel kombinációban alkalmazva lehet ipari jelentősége (részletesebben **2.3.** fejezet).

Ozmotoleranciája kiemelkedő (Mills *et al*., 2002; Sipiczki, 2004), ami részben magyarázatot ad nagy számú előfordulására magas kiindulási cukortartalmú, botrítiszes vagy szalma borok készítése során, azonban nincs összefüggés genetikai diverzitása és az eredete (édes/száraz borból izolált) közt, tehát nincs szelekciós nyomás alatt borászati viszonyok közt (Masneuf-Pomarede *et al*., 2015). Ebből

kifolyólag szerepe és nagy arányú jelenléte további tisztázást igényel botrítizálódott alapanyag feldolgozása során (Magyar és Soós, 2016).

Általános mikrobiológiai csoportosítás szerint pszichrotoleráns fajról van szó (Sipiczki, 2004), azonban a borászati viszonylatban releváns hőmérséklet tartomány nagy része 20 fok alá esik, tehát további pontosításra van szükség hőmérséklet tűrését illetően. Hidegtűrő tulajdonsága szintén részben magyarázatot adhat arra, miért lehet megtalálni a Tokaji aszúerjesztés körülményei közt nagy számban, ahol a konstans 11-13 °C körüli pincehőmérséklet jellemző.

Alkohol toleranciája kiemelkedő a nem-*Saccharomycesek* közt, igazolván jelenlétét az erjedés kezdeti szakaszán túl. Alkohol termelése viszont visszafogott, bár az egyes törzsek közt számottevő diverzitást lehet tapasztalni, különböző kísérleti munkák alapján, amit az 4. táblázat összegez. Alkohol kihozatala kimondottan alacsony, egyéb erjedési melléktermékeket képez nagyobb arányban a cukor metabolizmusa során (Magyar és Tóth, 2011; Comitini *et al*., 2011; Lemos *et al.*, 2019).

Ecetsav termelése visszafogott, a *Saccharomyces* élesztőkkel összevethető (Magyar és Tóth, 2011; Comitini *et al*., 2011; Suzzi *et al*., 2012; Rantsiou *et al*., 2012; Binati *et al*., 2019). Továbbá általában nem kiindulási cukortartalom függő tulajdonsága, ugyanakkor bizonyos fokú intraspecifikus variabilitás tapasztalható (Rantsiou *et al*., 2017). Ez kiemelkedően fontos lehet magas cukortartalmú mustok erjesztése során.

Glicerin termelése kiemelkedő (Andorra *et al*., 2010; Magyar és Tóth, 2011; Binati *et al*., 2019), a felhasznált cukorból a glicerin kihozatala számottevően magasabb, mint a *Saccharomyces* élesztőké (Magyar és Tóth, 2011). Bizonyos mértékű fajon belüli diverzitás ezen boralkotó esetén is megfigyelhető (Englezos *et al*., 2015).

Általános mikrobiológiai besorolás szerint a *S. bacillaris* acidogén faj, mindez aerob körülmények közti vizsgálat során igazolt tulajdonsága (Sipiczki, 2004). Oxigén limitált (borászati) körülmények közt nettó szerves savtermelése mennyiségileg összehasonlítható a *Saccharomyces* fajokéval, például L-almasav, L-borostyánkősav és fumársav esetén, azonban a szintézis útvonalai részben eltérőek (Magyar *et al*., 2014). Lemos-Junior és munkatársai (2019) jelentős almasav hasznosítást figyeltek meg éretlen must *S. cerevisiae*-vel való kombinált erjesztése során, amit korábbi munkák megerősítenek, azonban kisebb mértékben (Rantsiou *et al*., 2017; Englezos *et al*., 2017), valamint több munka is javasolja alkalmazását az alkohol-, illó- és titrálhatósav tartalom modulálására (Englezos *et al*., 2016; Lencioni *et al*., 2018; Vilela, 2019).

A faj átlagos nitrogén igénye moderált, a *Saccharomyces* fajokéval összevethető. Azonban a nitrogén felvétel dinamikája számottevően késleltetett *S. cerevisiae*-hez viszonyítva (Englezos *et al*.,

2018a). A faj nitrogén forrás preferenciája jelentősen eltér a *Saccharomyces* fajokétól (Gobert *et al.,* 2017; Englezos *et al*., 2018a). A jelenleg elérhető eredményeket eltérő közegben (természetes must közeg és szintetikus modell must) valamint eltérő törzsek esetén határozták meg, így azok nem egybevágósága részben magyarázható: a hisztidin, treonin és tirozin hasznosítás elhanyagolható, azonban a metionin, aszparaginsav és alanin hasznosításában eltérő tendenciákat figyeltek meg (Gobert *et al*., 2017; Englezos *et al*., 2018a).

A nitrogén felhasználással szoros összefüggésben van, a faj aromatermelése, a *Saccharomyces* fajokkal összevetve nagy különbségek fedezhetők fel, azonban elég nagy fajon belüli variabilitás is megfigyelhető az elérhető publikációk alapján. A magasabb rendű alkoholok termelését illetően elhanyagolható (Sadoudi *et al*., 2012), *S. cerevisiae*-vel összevethető (Andorra *et al*., 2012; Englezos *et al*., 2018b,c) és kiemelkedően magas (Andorra *et al*., 2010) eredmény is elérhető. Tóth-Márkus *et al.,* (2002) korábbi, még *C. stellata* név alatt végzett vizsgálatai szerint a faj magasabb rendű alkohol és észter képzése aszú borban, lényegesen elmarad a *S. cerevisiae*-től. Az acetát észterek esetén elhanyagolható (Sadoudi *et al*., 2012; Englezos *et al*., 2018b,c) és *S. cerevisiae*-nél néhányszor magasabb (Andorra *et al*., 2010 és 2012) eredmény is elérhető. Az etil észterek esetén *S. cerevisiae*-nél számottevően alacsonyabb (Sadoudi *et al*., 2012; Englezos *et al*., 2018b,c), összevethető (Andorra *et al*., 2012) és néhányszor magasabb (Andorra *et al*., 2010) eredmény is elérhető. Lakton és terpén típusú vegyületeket jelentősen magasabb mértékben termel, mint a *S. cerevisiae* (Sadoudi *et al*., 2012). A fent említett négy munka és továbbiak (Gonzalez *et al*., 2018a,b; Bagheri *et al*., 2018) alapján egybe hangzó, hogy 2-fenil-etanolt és annak acetát észterét nem képzi a *S. uvarum*-hoz hasonló mértékben.

**4. táblázat:** A *S. bacillaris* fő erjedési metabolit képzéséről elérhető irodalmi adatok, az erjedés paramétereinek feltűntetésével

| Kiindulási cukortartalom, g/L | Erjedési hőmérséklet, °C | YAN, mg/L | Közeg | Lépték, mL | Etanol, v/v% | Glicerin g/L | G/F arány | Illósav, g/L | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 256 | 18 | n.a. | must | 250 | 3,98-4,98 | 7,55-9,05 | 50+ | 0,73-0,90 | Magyar és Tóth, 2011 |
| 263 | 25 | 278 | must | 140 | 7,3 | n.a. | n.a. | 0,72 | Comitini *et al*., 2011 |
| 280 | 25 | n.a. | must | 95 | 8,96 | 10,20 | n.a. | 0,78 | Suzzi *et al*., 2012 |
| 403 | 25 | n.a. | must | 100 | 1,91-8,44 | 1,84-10,10 | 1,58-50+ | 0,19-0,79 | Rantsiou *et al*., 2012 |
| 100 | 20 | 400 | modelloldat | 250 | 3,81-4,68 | 3,30-4,20 | n.a. | 0,32-0,51 | Magyar *et al.*, 2014 |
| 244 | 25 | n.a. | must | 25 | 5,11-14,53 | 4,98-10,91 | 1,30-50+ | 0,24-0,78 | Englezos *et al*., 2015 |
| 200-330 | 25 | 160 | must | 25 | 9,6-10,6 | 9,4-12,9 | 50+ | 0,31-0,45 | Rantsiou *et al.*, 2017 |
| 229,2 | 25 | 200 | modelloldat | 1100 | 5,8-6,4 | 7,7-8,2 | 9,47-27,78 | 0,11-0,21 | Englezos *et al*., 2018a |
| 200 | 20 | 182 | modelloldat | 100 | 4,53-11,12 | 4,35-7,69 | 6,75-27,6 | 0,65-0,89 | Lemos-Junior *et al*., 2019 |
| 210 | 22 | 150 | must | 400 | 3,86 | 5,46 | 1,76 | 0,56 | Binati *et al.*, 2019 |

n.a.= nincs adat

A *S. bacillaris* nettó összes illékony vegyület termelése mennyiségileg elmarad a *S. cerevisiae*-től (Englezos *et al*., 2018b,c), összetételét tekintve pedig az elérhető vizsgálati eredmények alapján egyértelműen elkülöníthető pusztán a képzett illékony komponensek alapján az egyéb borélesztőktől (*Metschnikowia pulcherrima, Torulaspora delbrueckii, S. cerevisiae, Hanseniaspora uvarum).*

Aromás alkohol termelése elenyésző *S. cerevisiae*-hez viszonyítva, ugyanakkor növekedését számottevően befolyásolják a QSM-ák (Gonzalez *et al*., 2018a). A szerotonin és melatonin nem növeli generációs idejét jelentősen, sőt az inokulálást követő pár órában a melatonin növekedést serkető hatásúnak bizonyult (Valera *et al*., 2019), azonban a triptofol igen, a triptamin mérsékelten lassítja (Gonzalez *et al*., 2018b).

Dolgozatom egy lényeges fejezetét képezi a közepes szénláncú zsírsavak növekedésgátló hatásának vizsgálta. A külső MCFA adagolás hatásáról a szakirodalomban erről a fajról nem találtam adatokat. A más élesztőkkel való interakció szempontjából azonban lényeges lehet az faj MCFA termelése. Több munka is közöl közepes szénláncú zsírsav termelési adatokat, részletekbe menő magyarázat nélkül, az összes illó komponens vizsgálat részeként (5. és 6. táblázat), amik túlnyomó része kevert kultúrájú erjesztésről szólnak, összehasonlításuk nehézkes a rendkívül változatos erjesztési körülmények, inokulálási stratégiák és eltérő törzs választék miatt. Megállapítható, hogy a *S. bacillaris*-nak önmagában alacsonyabb a hexánsav, oktánsav és dekánsav termelése, mint a *S. cerevisiae*-nek, míg dodekánsav termelése törzs és/vagy erjesztési körülmény függő. Kevert kultúrás tenyészet esetén pedig általában alacsony vagy moderált az MCFA termelés, a *S. cerevisiae* önálló termelésével összehasonlítható mértékű.

A fent említett tulajdonságokon túl ipari adaptálhatóságára is számottevő figyelem irányul (pl. Domenech *et al*., 2018), illetve jelen munkában is bemutatok félüzemi kísérleti eredményeket.

**5. táblázat:** *S. bacillaris* közepes szénláncú zsírsav termeléséről elérhető irodalmi adatok (µg/L)

| Hexánsav | Oktánsav | Dekánsav | Dodekánsav | *S. cerevisiae* kontroll | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| 310 | 230 | 120 | 1200 | 3420:2620:1590:180 (H:O:D:DD) | Andorra *et al*., 2010 |
| n.a. | n.d. | 26,7 | n.a. | 586,0:38,9 (O:D) | Sadoudi *et al*., 2012 |
| 0,26-0,37 | 4,88-4,96 | 0,95-1,42 | 0,44-0,72 | 1,93:44,71:8,58:2,68 (H:O:D:DD) | Englezos *et al*., 2018a |

n.d.=nem detektált; n.a.=nincs adat

**6. táblázat:** *S. bacillaris* és *S. cerevisiae* kombinált erjesztése során közepes szénláncú zsírsav termeléséről elérhető irodalmi adatok (µg/L)

| Hexánsav | Oktánsav | Dekánsav | Dodekánsav | *S. cerevisiae* kontroll | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| 2890 | 1880 | 840 | 560 | 3420:2620:1590:180 (H:O:D:DD) | Andorra *et al*., 2010 |
| 700 | 683 | 425 | n.a. | 740:1222:190 (H:O:D) | Comitini *et al*., 2011 |
| n.a. | 470,4 | 246,9 | n.a. | 586,0:38,9 (O:D) | Sadoudi *et al*., 2012 |
| n.a. | 120,3 | n.a. | n.a. | 179,4 (O) | Gobert *et al*., 2017 |
| 65 | 83 | n.a. | n.a. | 39:44 (H:O) | Nisiotou *et al*., 2018 |
| 410 | 1200 | 830 | n.a. | 1200:1700:960(H:O:D)* | Bagheri *et al*., 2018 |

n.a.= nincs adat; *komplex élesztő biota: *S. cerevisiae* 10^6 TKE/mL és *Metschnikowia pulcherrima, Torulaspora delbrueckii, Starmerella bacillaris, Hanseniaspora uvarum, Pichia terricola; Lachancea thermotolerans, Candida parapsilosis, Wickerhamomyces anomalus* 10^4 TKE/mL

### 2.2.4. Egyéb nem-*Saccharomyces* fajok

A nem-*Saccharomyces* élesztők ipari alkalmazásba vonásakor a borászatban értelemszerűen azon fajok kerültek a kutatói érdeklődés középpontjába, amelyek a szőlőbogyó felületén lévő biota alkotói, valamint a spontán erjedés kezdeti szakaszában jelentőségük van (együttesen véve 10^6-8 TKE/mL nagyságrendű populációjuk által) (Jolly *et al*., 2014). Ezek a szelekciós munkák akár konkrét szárított élesztő starter terméket eredményezve, akár a termelt metabolitok kedvezőtlen aránya miatt sikertelenül zárultak, vagy akár még folyamatban vannak. Fontos megjegyezni, hogy a lenti eredmények többsége az általános karakterizáláson túl, relatíve szűk törzs készletre alapozott, ezért a jövőben széles törzs készlettel való átfogó kísérleti alátámasztás lehet szükséges, a jelentős fajon belüli variabilitás miatt (Rossouw és Bauer, 2016).

Az apikuláta élesztők (*Kloeckera apiculata, Hanseniaspora guilliermondii, Hanseniaspora vinae*) egészséges szőlőbogyón való dominanciájuk, valamint a spontán erjedés indításában való részvételük miatt kézenfekvő volt szelekciójuk (Caruso *et al*., 2002; Mendoza *et al*., 2007; Andorra *et al*., 2011). A *K. apiculata* alacsony fermentatív aktivitású, fruktofil karakterű, *Saccharomyces*sekkel összemérhető mennyiségű glicerint termel, valamint viszonylag alacsony koncentrációjú hidrogén szulfidot (De Benedictis *et al*., 2011). Ezen vad élesztők komoly negatív tulajdonsága a számottevő ecetsav, etil-acetát és acetoin termelés, ami jelentős minőségbeli probléma, (pl. Romano és Marchese,

1998). Újabban borerjesztésre való alkalmasságukról szóló munkákat is publikáltak (Tristezza *et al*., 2016; Lleixa *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2018).

A *Metschnikowia pulcherrima* (syn. *Candida pulcherrima*) a szőlőbogyón elterjedt élesztő, amely egyes populáció dinamikai vizsgálatok szerint a szőlőfeldolgozás során rövid időn belül dominánssá válhat (Jolly *et al*., 2003a). Etanol kihozatala alacsony (4-7 v/v%), valamint légzési metabolizmusa által, alkalmas lehet csökkentett alkoholtartalmú tétel erjesztésére (Contreras *et al*., 2015; Varela és Varela, 2016). Alacsony hidrogén-szulfid és illósav képzéssel, kénessavval szembeni toleranciával, széles spektrumú killer toxin képzéssel, extracelluláris enzim képzéssel borászati szempontból értékes élesztőnek számít (Zott *et al.*, 2011; Morata és Suarez-Lepe, 2016). *S. cerevisiae*-vel szekvenciális beoltást alkalmazva jó dinamikájú és komplett alkoholos erjedést lehet kivitelezni (Jolly *et al*., 2003b), melynek aromaprofilja számottevően gazdagabb magasabb rendű alkohol, terpén és észter vegyületek tekintetében (Rodriguez *et al*., 2010). Pezsgő alapborok második alkoholos erjesztése (Gonzalez-Royo *et al*., 2015), valamint rögzített sejtes reaktorban történő alkalmazására is irányulnak vizsgálatok (Canonico *et al*., 2016). Kereskedelmi forgalomban már kapható.

A *Torulaspora delbrueckii* közepesen robosztus erjesztő, általában 8-11% etanolt képest előállítani, alacsony hidrogén-szulfid, illófenol, valamint ecetsav termeléssel jellemzik, jelentős fajon belüli variabilitással (Renault *et al*., 2009). Az almasavat metabolizálja, ellenben számottevő fumársavat és borostyánkősavat képes termelni (Belda *et al*., 2015), továbbá egyes törzsei képesek linalool termelésre (King és Dickinson, 2000). *S. cerevisiae*-vel kombinálva (Belda *et al*., 2015), és tiszta tenyészetben is (van Breda *et al*., 2013) beszámoltak sikeres alkalmazásáról, ahol a bor aromaprofiljában is számottevő eltérés figyelhető meg (Jolly *et al*., 2003a; Azzolini *et al.*, 2012). Szekvenciális beoltás során *S. cerevisiae*-vel versengésben van a nitrogén forrásért (Taillandier *et al*., 2014). Bely és munkatársai (2008) magas kiindulási cukortartalmú (botrítizálódott) mustok erjesztése során bizonyították, hogy ecetsav termelése nem függ a kiindulási cukortartalomtól, ami borászati szempontból rendkívül értkékes tulajdonság. Canonico és munkatársai (2018) alkalmasnak találták pezsgők második alkoholos erjesztésére. Önmagában, vagy más fajok szeletált törzseivel keverékként, a *T. delbrueckii* szelektált startereinek az egyik legjelentősebb a szerepe a nem-*Saccharomyces* élesztőt is alkalmazó üzemi borerjesztések során. Kereskedelemben több törzse kapható.

*Lachancea thermotolerans (syn. Kluyveromyces thermotolerans)* számos borászati szempontból értékes tulajdonsággal bír, mint a magas L-tejsav-, glicerin- és alacsony ecetsav termelés, közepes erjesztőképesség, jó versengőképesség, bizonyos fokú glikozidáz és észteráz aktivitás, extracelluláris poliszacharid termelés (Kapsopoulou *et al*., 2005; Cominiti *et al*., 2011; Gobbi *et al*., 2013). *S.*

*cerevisiae*-vel való szekvenciális beoltása során a ráoltás ideje szabja meg, a fent leírt előnyös tulajdonságok érvényesülését (Kapsopoulou *et al*., 2007). Botrítiszes alapanyag erjesztése során a *Saccharomyces* dominancia után is hosszan az erjedő borból azonosítható marad más nem-*Saccharomyces*ekkel együtt (Mills *et al*., 2002). Aroma termelése a *S. cerevisiae*-től eltérő (Balikci *et al*., 2016; Benito *et al*., 2016; Gobbi *et al*., 2013). Ipari borerjesztés során a *T. delbrueckii* mellett ezen faj szelektált törzseinek a legnagyobb a jelentősége, ugyancsak több kereskedelmi készítménnyel.

A *Pichia kluyveri* az egészséges szőlőmust biotájának akár 10%-át is adhatja, ugyanakkor aerob anyagcseréje meghatározó, csak korlátozott mértékben képes etanol termelésre (Sabate *et al*., 2002). Borászati szempontból előnyős jelentős tiol képzése, amelyek bizonyos fajták (Sauvignon blanc, Chardonnay, Rajnai rizling) fajtajellegét részben meghatározó értékes vegyületek. Az élesztő ezen vegyületeknek a mustban jelenlévő prekurzorait is hatékonyan felszabadítja, ebből kifolyólag a végtermékben számottevően eltérő aroma profilt tapasztalunk, ami érzékszervi bírálat során pozitív megítélésű (Anfang *et al*., 2009; Benito *et al*., 2016). Egyes törzsei killer toxin termelőnek bizonyultak, amelyek akár *S. cerevisiae* szaporodását is gátolhatják (Zagorc *et al*., 2001).

*Zygosaccharomyces bailii* kitűnő ozmotoleranciájú, alkohol, ecetsav- és egyéb gyenge savat tűrő törzsei által a palackos borokban tapasztalt visszaerjedések számottevő százalékáért felelős (James és Stratford, 2003; Palma *et al*., 2018). Ugyanakkor egészséges alkoholos erjesztésben is részt vehetnek, főként botrítiszes borok erjesztése vagy szelektált törzseik kevert kultúrás felhasználása során. A faj erős fruktofíliát mutat (Magyar *et al*., 2008b). A *Z. bailii* esetén számottevő fajon belüli variabilitás mellett, kéndioxid toleranciája kitűnő, hidrogén szulfidképzése közepes mértékű, etanol és illósav képzése a *S. cerevisiae*-vel összevethető, etil-acetát termelése alacsony (Domizio *et al*., 2011). Egyidőben zajlik több vizsgálat visszaszorítására és nem-*Saccharomyces* starterként való alkalmazására is. *S. cerevisiae*-vel kombinálva konvencionális erjesztéshez képest az etanol-, glicerin- és ecetsav képzés nem módosult számottevően (Domizio *et al*., 2011). *Pichia membranifaciens* PMKT killer toxinja alkalmasnak bizonyult *Z. bailii* visszaszorítására borászati körülmények között, kénessavval kombinálva (Alonso *et al*., 2015).

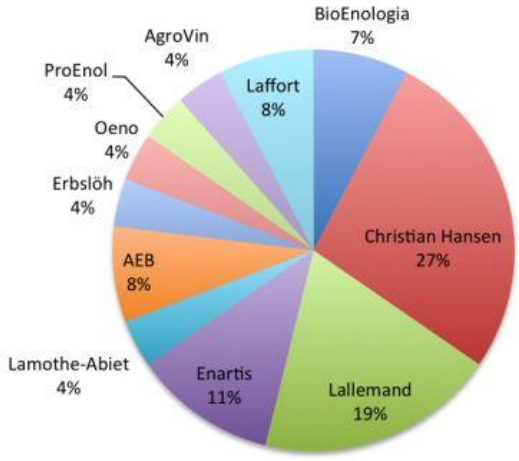
## 2.3. A starterkultúra használat és kialakulása

A bor erjesztése hosszú évezredeken át a fermentáció során végbemenő biokémiai folyamatok pontos ismerete nélkül zajlott, azonban a borászati mikrobiológia fejlődésének köszönhetően mára részletes ismereteink vannak az erjedés lefutásáról, az élesztő biota összetételéről, alkotóinak ökológiai, biokémiai, feno- és genotípusos tulajdonságairól stb. (Fleet, 2008; Roudil *et al.*, 2019).

A starter kultúra használat bor erjesztéséhez nem új keletű dolog, aktív szárított élesztő formában történő termelése ipari igény teljesítéseként, a 1960-as évek közepén kezdődött az USA-ban, a '80-as évekre terjedt el világszerte, azonban a mai napig a termelők egy része üzemi léptékű borerjesztés során a spontán erjedést preferálja, annak minden bizonytalanságával és kockázatával. A borászati fajélesztő használat, az irányított erjesztés részeként, a korszerű borászati technológia szerves része. Mára a starter kultúra gyártás sokat fejlődött, azonban a sütő élesztő gyártáshoz képest jellemzően egy sok törzzsel dolgozó, szezonális, relatíve kis méretű iparág. Az elmúlt 50 évre visszatekintve jól elkülöníthető a fajélesztő termékek több generációja is, hiszen nem csak az erjesztő képesség screenelése zajlik, hanem jóval több tulajdonság tesztelése, és összetett szelekciós munka, több léptékben (labor, félüzemi és üzemi kísérleti erjesztések is) mire egy törzs starterré válhat (Pereira *et al.*, 2019). A piacon jelenleg több száz borászati élesztő starter érhető el, túlnyomó többségük ADY formában, míg kisebb részük mélyfagyasztott folyadék kultúraként. Ezen starterek többsége rendelkezik néhány specifikus tulajdonsággal, mint kiemelkedő etanol tolerancia és termelés, specifikus extracelluláris észteráz aktivitás, malolaktikus együtt erjesztéssel való kompatibilitás stb. Valamint általában meghatározott borászati termékekhez (pl. pezsgő, vagy vörösbor erjesztés), akár fajtákhoz (pl. Sauvignon blanc, vagy Pinot fajta kör) ajánlott a használatuk. Jellemzően egy adott földrajzi terület preferált fajtáihoz illeszkedő, a környező nagyobb földrajzi régióban szelektált élesztő starterek használata az elterjedt (mint például Magyarországon az Európában szelektált élesztők jellemzők), de nem kizárólagos.

Az aktív szárított élesztők közül a *S. cerevisiae* ipari jelentősége a legnagyobb, a leggyakrabban használt és legszélesebb törzsszámban propagált, első számú borélesztő starter, mellette megtalálható kisebb számban *S. uvarum* is, azonban az ipari terminológia keverve használja korábbi és aktuális elnevezéseit. A 2000-es évek elejéig ipari alkalmazásuk a borászatban kizárólagos volt, azonban egyre több figyelem fordul a nem-*Saccharomyces* élesztők felé is. Az elmúlt két évtizedben jelentek meg a piacon a nem-*Saccharomyces* élesztő starterek, alkalmazásuk kevésbé elterjedt, azonban folyamatosan növekvő, az elérhető termékek számával együtt (Fleet, 2008; Roudil *et al.*, 2019). Jelenleg a legtöbb starter kultúra gyártó cégnek van néhány tiszta, vagy kevert kultúrás nem-

*Saccharomyces* terméke (1. ábra), valamint az Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet (OIV) 2017-ben kiadott monográfiájában (OIV-OENO 576B-2017) rögzíti az Európai Uniós szabályozással összehangolva a nem-*Saccharomyces* starter kultúrákkal kapcsolatos elvárásokat.




**1. ábra:** A nem-*Saccharomyces* élesztőt tartalmazó starterek piacának megoszlása a gyártó cégek termékeinek arányában (Roudil *et al*., 2019)

Jelenleg kellően széles a starter paletta, hogy egy adott bor erjesztés paramétereihez megfelelő élesztő startert alkalmazza a borász, valamint a termelői oldalról is apránként nő a bizalom az újonnan piacon található készítmények irányában, továbbá lassan elterjedté válik a nem-*Saccharomyces* élesztők használata *S. cerevisiae*-vel kombinálva.

### 2.3.1. Az új fajélesztők forrásai: hagyományos szelekció és genetikai módosítás

A szőlészet-borászat teljes vertikumában elérhető felületekről, mátrixokból történő élesztő törzs szelekció a tradicionális és legkézenfekvőbb forrása egy új starter jelölt kiválasztásának. A jelenleg elérhető starter kultúrák túlnyomó többsége ezzel a módszerrel jutott a gyártók birtokában. Meglepő mértékű diverzitás tapasztalható, különösen a nem-*Saccharomyces* élesztők használatba vonásával; az ipari környezetből való szelekció majdhogynem kimeríthetetlen forrást jelent (Rossouw és Bauer, 2016). A hagyományos szelekció nem csak a starter gyártó cégek számára áll nyitva, hanem az egyes borászatok, vagy akár borvidékek számára is, amennyiben saját, helyi, autochton élesztő starterrel szeretnének erjeszteni. Általában a „saját" élesztő használat passzált évközi fenntartást és folyadékkultúrás felszaporítást jelent minden szüreti időszakban. Például átfogó munka folyik a Badacsonyi borvidéken (Szőke *et al*., 2015) vagy a SZIE Borászati Tanszékén (Tokaj, Somló).

Míg a fent említett hagyományos módszer a természetes diverzitást használja ki és így keres ideális tulajdonságú starter jelölteket, addig a genetikai módosítás során egy általánosan jó tulajdonságú élesztő starter célzott változtatására kerül sor úgy, hogy az eredeti tulajdonságait ne veszítse el, azonban ez a kör az új, értékes, „különleges" tulajdonság(ok)kal kiegészüljön. Ezen módszerek: a mutagenezis, protoplaszt fúzió, intraspecifikus és interspecifikus hibridizáció, transzformáció és rekombináns DNS technika, adaptív evolúció és funkcionális genomika, rendszer biológia (Fleet, 2008). Egy részük jelenleg nem alkalmazható ipari hasznosításban, pusztán laboratóriumi körülmények közt, mint a rekombináns DNS technika vagy a mutagenezis, azonban a hibrizidációs technikák, vagy adaptív evolúció ellen nincs fogyasztói ellenállás, illetve nincs közjogi akadálya (Bisson *et al*., 2007). Mivel saját kísérleti munkám túlnyomó részt nem molekuláris jellegű nem térek ki ezekre a fejlődő technikákra.

### 2.3.2. Mono, oligo- és multistarterek

A monokultúrás erjesztést tekinthetjük a tradicionálisnak, hiszen a nem-*Saccharomyces* starterek megjelenése előtt egy kultúrás beoltás volt az elterjedt. Ebben az esetben az ülepített, megfelelő hőmérsékletű, szükség szerint kiegészített szőlőmustot a biztonságos erjedés vezetés céljából egy rehidratált egysejt tenyészettel beoltjuk (megközelítőleg 10^5 TKE/mL koncentrációban). Ezzel dominanciáját biztosítjuk a fermentáció kezdetétől a szőlőmustban megatalálható összetett élesztő biota felett (10^6-8 TKE/mL nagyságrendben), ami származhat a bogyó felületről, a feldolgozó berendezésekről stb. Ez által biztosítjuk a jó dinamikájú erjesztést, hiszen a relatíve alacsony kezdeti *Saccharomyces* sejt populáció felszaporodási idejét számottevően lerövidítjük; mivel egy ismert tulajdonságú starter végzi az erjesztést, metabolit képzéséről, speciális tulajdonságairól az adott törzs kiválasztásával lehet dönteni; a nem kívánatos erjedési melléktermékek, mint hidrogén-szulfid, képzése nagy valószínűséggel alacsony marad stb. A monokultúrás erjesztés kritikája, hogy a spontán fermentációhoz képest az élesztők diverzitása szinte elhanyagolható, a fajélesztő dominanciájával túlnyomó részt az adott törzs fenotípusos tulajdonságai nyilvánulhatnak meg, tehát a képzett élesztős metabolitok sokfélesége is limitált, amik befolyásolják az érzékszervi tulajdonságokat, ezáltal bizonyos szempontból „uniformizálttá" válhatnak a tételek. Összességében inkább előnyös, mint problémás a monokultúrás erjesztés, jelenleg még ez a vezető élesztő használati mód, de az alternatív opciók népszerűsége fokozatosan növekszik.

Az oligo- és multistarterek jelentősége a nem-*Saccharomyces* élesztők forgalomba kerülésével számottevően emelkedett, folyamatosan emelkedik, főként mivel ezen élesztő fajok többsége nem

képes önállóan kierjeszteni egy mustot, *Saccharomyces* ráoltásra szükség van. A piacon elérhető nem-*Saccharomyces* starterek többsége önállóan ADY formában kapható, amire egy kompatibilis *Saccharomyces* startert szükséges ráoltani, azonban vannak eleve kevert tenyészetű starterek is, valamint a *Torulaspora delbrueckii* vagy akár *Zygosaccharomyces bailii* képes lehet önállóan is kierjeszteni egy mustot. Ezen alternatív starter kultúrák és a több élesztő törzs együttes fermentációja új távlatokat nyitott a borászati kutatásban olyan témákkal, mint a ráoltás mértékének és idejének optimalizálása (Kapsopoulou *et al.*, 2005; Comitini *et al.*, 2011); a különböző fajok visszaizolálhatósága az erjesztés különböző fázisaiból (Mills *et al*., 2002; Bagheri *et al*., 2018); a potenciális interakció, akár szinergens, akár antagonista (Ciani és Comitini, 2015; Prior *et al*., 2019); a különböző fajok populációinak regulációja, például kommunikációs vegyületeken keresztül (Valera *et al*., 2019; Englezos *et al*., 2019); a különböző fajok metabolikus aktivitásának módosulása (Peng *et al.*, 2018); a szárítási technológia kidolgozása (Domenech *et al*., 2018; Kim *et al*., 2019) stb. A kombinált erjesztés egyfajta üzemileg irányítható, tervezhető megoldás/válasz a monokultúrás erjesztés „uniformitására". Kétségtelenül az oligo- és multistarterek alkalmazása komplex változást idéz elő a borban található élesztős metabolitok koncentrációjában. Például növelheti az aroma komplexitást a borokban (Domizio *et al*., 2011; Sadoudi *et al*., 2012), alacsonyabb alkohol tartalom érhető el ugyanannyi cukortartalomból kiindulva (Quiros *et al*., 2014; Varela és Varela, 2016; Rolle *et al*., 2018; Lemos-Junior *et al*., 2019), alacsonyabb lehet a termelt illósav tartalom (Bely *et al*., 2008; Rantsiou *et al*., 2012; Lencioni *et al*., 2018) és magasabb a glicerin koncentráció (Englezos *et al*., 2017; Binati *et al*., 2019), faj függően alacsonyabb és magasabb titrálható sav tartalom is elérhető (Benito *et al*., 2016; Teslic *et al*., 2018b; Vilela, 2019) stb. Ugyanakkor a spontán élesztő biota diverzitásához képest két-három faj együttes erjesztését még nem tekinthetjük annak teljes megfelelőjének.

## 2.4. A metabolomika mint megközelítésmód

A metabolitok a sejt szintű regulációs folyamatoknak végtermékei, a sejten belüli, intracelluláris-, vagy a sejten kívüli, extracelluláris térben detektálható, kis molekulatömegű molekulák. Egy élő sejt, szövet, szervezet által szintetizált vegyületek összessége maga a metabolom. A metabolomika egy biológiai rendszer (sejt) bármely környezeti hatásra (stresszre) adott válaszának legvégső megnyilvánulását vizsgálja (Fiehn, 2002). Ebből kifolyólag élő szervezetek esetén a metabolom egy dinamikusan változó, adott paraméterek mellett tapasztalt mintázat, amelyben a jelen levő vegyületek koncentrációja rendkívül széles tartományban mozoghat.

Az omikák között a genomikához (DNS), transzkriptomikához (RNS), proteomikához (fehérjék) hasonló átfogó, „nagy merítésű", hatás-válaszreakció alapon dolgozó tudományág. Azonban, a DNS, RNS és a fehérjék kémiai szempontból hasonlóak és limitált számú „építőkövekből" felépülő óriás biomolekulák, így méréstechnikai szempontból „könnyebben" detektálhatóak. Mivel a metabolomot alkotó vegyületek mennyisége nagyon eltérő, kémiai tulajdonságai rendkívül szerteágazóak, ez számottevően megnehezíti egyidejű, egy gépegyüttessel való hatékony vizsgálatukat (Jewison *et al*., 2012). A megközelítésmód sajátossága, hogy nem egyes vegyületek változását követi nyomon, hanem mintázatokat, ujjlenyomatokat figyel, és annak komplex változásaiból következtet. Jelenleg, ilyen típusú munka során gyakran használt módszerek a tömegspektrometriával kapcsolt gázkromatográfia (GC-MS), tömegspektrometriával kapcsolt folyadék kromatográfia (LC-MS) és mágneses magrezonancia (NMR) (Emwas *et al*., 2019).

Két diszjunkt halmazra oszthatók a metabolomikai vizsgálatok: célzott (targeted, profiling) vagy nem célzott (untargeted, shotgun). Az első megközelítés célja, hogy kvantitatív és kvalitatív információt nyerjünk egy konkrét anyagcsere úthoz köthető vegyületek összességéről, tehát pontosan melyik vegyület, milyen koncentrációban található a vizsgált mátrixban. Így valójában nem metabolomikáról beszélünk, a szó „omika" értelmében, azonban alkalmazott kérdésekben, mint a borászatban, ez bizonyul hasznosnak. A második megközelítésmód esetén nem feltétlenül cél az adott molekulák azonosítása, hanem komplex mintázatok összehasonlítása történik eltérő környezeti paraméterek, fajok, törzsek stb. esetén. Gyakori az NMR vagy tömeg spektrumok, kromatogramok egészének összehasonlítása, továbbá a metabolitok konkrét azonosítása helyett különböző statisztikai módszerekkel történő csoportosítása jellemző (Dettmer és Hammock, 2004).

Mivel metabolomikai munka során rendkívül nagy adatmennyiséggel kell dolgozni a különböző többváltozós statisztikai módszerek használata célszerű, mint a főkomponens analízis (PCA) vagy különböző klasszifikációs módszerek, mint a klaszter analízis (CA) és a diszkriminancia

analízis (DA). A főkomponens analízis során a sok eredeti változót (metabolitok) egy virtuális térben néhány főkomponensbe tömöríthetjük anélkül, hogy az eredeti információból számottevően veszítenénk. A klaszter analízis során a hasonló tulajdonságok előzetes ismeret nélküli összevonása történik csoportokba különböző módokon (hierarchikus és nem -hierarchikus); a diszkriminancia analízis során egy előzetes csoportosításhoz képest újra csoportosítás történik többváltozós szóráselemzéssel. Ezen módszerek sok változó esetén összefüggések feltárására alkalmasak, rendszerszerű megközelítéssel, grafikusan jól ábrázolható eredménnyel (Kovács, 2014).

Az élesztős metabolitok borminőségre gyakorolt hatása elvitathatatlan, ezért borászati kérdésekben is gyakori megközelítésmód a metabolomika, azonban shotgun módszer ritkább (Son *et al*., 2009; Peng *et al*., 2018), míg a metabolit profil vizsgálatok az elterjedtek, nem ritkán bizonyos DNS, RNS vagy fehérje szintű adatokkal összekötve, azokkal alátámasztva (Perez-Torrado *et al*., 2016; Avbelj *et al*., 2016; Englezos *et al*., 2018a).

# 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

## 3.1. Alkalmazott élesztő törzsek

A vizsgálatok során alkalmazott élesztő törzsek: kereskedelmi starterek, típus törzsek és a Borászati Tanszék törzsgyűjteményi törzsei a 7. táblázatban találhatók, azonosításuk klasszikus és/vagy molekuláris analízissel történt, a megadott referenciák szerint. Fontos megjegyezni, hogy a Borászati Tanszék gyűjteményi törzsei, és részben az NCAM törzsek is, eredetileg borászati anyagokról, mustokból, borokból származnak. Az egyes kísérleti elrendezéseket, mintavételeket és mérési idő igényt figyelembe véve eltérő törzskészlettel dolgoztam (M1. táblázat), azonban minden vizsgálat során a *S. bacillaris*-t hasonlítottam a *Saccharomyces*-ekhez, illetve *Z. bailii*-hez.

**7. táblázat:** A dolgozat kísérleteiben alkalmazott élesztő törzsek teljes jegyzéke.

| | Faj | Törzs | Fenntartó | Izolálás forrása | Izolálás helye | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Saccharomyces cerevisiae* | TP32 | BT | Tokaji szamorodni | Tokaji borvidék, HU | Kovács *et al.*, (2008) |
| 2 | | TA12 | BT | Tokaji szamorodni | Tokaji borvidék, HU | Kovács *et al.*, (2008) |
| 3 | | RA100 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar (1996) |
| 4 | | PM321 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2000) |
| 5 | | PM404 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2000) |
| 6 | | PM650 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2000) |
| 7 | | SC57 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008a) |
| 8 | | S302 | BT | erjedő must | Somlói borvidék, HU | Magyar *et al.* (2008a) |
| 9 | | S701 | BT | erjdeő must | Somlói borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008a) |
| 10 | | E704 | BT | erjedő must | Etyek-Budai borvidék, HU | Csernus *et al*. (2014) |
| 11 | | VAplusz1 | BT | jégbor erjesztés | Badacsonyi borvidék, HU | - |
| 12 | | Uvaferm®PM | Lallemand | champagne-i pezsgő alapbor | Champagne, FR | kereskedelmi starter |
| 13 | | Uvaferm®228 | Lallemand | erjedő bor | Rajnai borvidék, DE | kereskedelmi starter |
| 14 | | SB12 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008a) |
| 15 | *Saccharomyces bayanus var. uvarum* | CBS395$^{T}$ | NCAIM | fekete ribizli must | NL | Beijerinck (1898) |
| 16 | | TKH1 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008a) |
| 17 | | SB26 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al.* (2008a) |
| 18 | | SB42 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al.* (2008a) |
| 19 | | E105 | BT | erjedő must | Etyek-Budai borvidék, HU | Csernus *et al.* (2014) |

7. táblázat folyt.

| | Faj | Törzs | Fenntartó | Izolálás forrása | Izolálás helye | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 | *S. bayanus var. uvarum* | S103 | BT | erjedő must | Somlói borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008a) |
| 21 | *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)* | Y1667$^T$ | NCAIM | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Sipiczki (2003) |
| 22 | | Y1756 | NCAIM | Aszú bogyó felülete | Tokaji borvidék, HU | Sipiczki (2003) |
| 23 | | MLO | BT | erjedő bor | Etyek-Budai borvidék, HU | - |
| 24 | | SJ1 | BT | Aszú bogyó felülete | Tokaji borvidék, HU | - |
| 25 | | ROYAL1 | BT | Aszú bogyó felülete | Tokaji borvidék, HU | - |
| 26 | *Zygosaccharomyces bailii* | Y954$^T$ | NCAIM | sorghum cefre | JP | James *et al*. (1996) |
| 27 | | Z6 | BT | kénessavval tartósított must | HU | Magyar *et al*. (2008b) |
| 28 | | Z22 | BT | üledékes palackos bor | Badacsonyi borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008b) |
| 29 | | PM614 | BT | Tokaji aszú erjesztés | Tokaji borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008b) |
| 30 | | DS3 | BT | sűrített must | Mátrai borvidék, HU | Magyar *et al*. (2008b) |

BT= Borászati Tanszék; NCAIM= National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms; HU= Magyarország; FR= Franciaország; NL=Hollandia; DE=Németország; JP=Japán.

### 3.2. Alkalmazott tápközegek

A tápközegek összetevői a Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft-től (Magyarország) és a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-tól (Németország) származnak. A természetes tápközegek (must, bor) sterilezése 100 °C-on, a modell tápközegek sterilezése 115 °C-on, 15 percig történt. A félüzemi kísérlet Szürkebarát mustja esetén nem steril közegből indultunk ki. 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 (370-420-470 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.

**Természetes mustok, borok:**

- **Bianca must I.:** 250 g/L cukortartalom; pH 3,5; alkoholtartalom 0,0 v/v%; kénessavtartalom (összes/szabad) 0/0 mg/L. Kiegészítve 2 g/L élesztőkivonattal. Az előkísérletekhez felhasznált steril, jól beérett must (**4.1**-es alfejezet).
- **Bianca must II**.: 240 g/L cukortartalom, pH 3,2; alkoholtartalom 0,0 v/v%; kénessavtartalom (összes/szabad) 0/0 mg/L. Az erjedési hőmérséklet stressz vizsgálathoz felhasznált steril must (**4.2.1**-es alfejezet).
- **Bianca must III.:** 320 g/L cukortartalom; pH 3,5; alkoholtartalom 0,0 v/v%; kénessavtartalom (összes/szabad) 0/0 mg/L. Kiegészítve 2 g/L élesztőkivonattal. Az intracelluláris glicerin vizsgálathoz felhasznált steril, jól beérett must (**4.3.1**-es alfejezet).
- **Szürkebarát must**: cukortartalom 229 g/L pH 3,6; alkoholtartalom 0,0 v/v%; kénessavtartalom (összes/szabad) 0/0 mg/L. Az félüzemi keverék kultúrás erjesztési kísérlethez felhasznált must (**4.4**-es alfejezet).

**Szintetikus modell mustok, táplevesek, szilárd agarok összetétele:**

- **Erjedésben elakadt modell must** (Santos *et al*., 2008 alapján): 12 v/v% etanol, 0,5 v/v% ecetsav, 5 g/L élesztő kivonat, 25 g/L D- fruktóz, $K_2HPO_4$, pH kiegyenlítésre; pH=3,5. Az előkísérletek steril, erjedésben elakadt must közege (**4.1**-es alfejezet).
- **Modell leves** (mustot imitáló közeg): 0,75 g/L $MgSO_4$, 1 g/L $K_2HPO_4$ pH kiegyenlítésre, pH=3,3, 5 g/L Pepton 3 g/L élesztő kivonat, 3 g/L DL-almasav, 40 g/L D-glükóz. A közepes szénláncú zsírsav stressz vizsgálathoz felhasznált szilárd és folyékony, steril modell tápközeg (**4.2.4**-es alfejezet).

- **Módosított modell agar**, a fenti összetétellel megegyező összetételű szilárd közeg, kiegészítve 15 g/L por agar-agarral, közepes szénláncú zsírsav (MCFA) kombinációval 10-20-40-80 mg/L-es koncentrációban, valamint 5v/v% etanollal (Baron *et al*., 2017 alapján). A közepes szénláncú zsírsav stressz vizsgálatához felhasznált szilárd, steril modell tápközeg (**4.2.4-**es alfejezet).
- **MCFA törzsoldat** (Baron *et al*., 2017): C8:C10:C12= 2:7:1 arányban 10g/100ml 70%-os etanolban oldva. A közepes szénláncú zsírsav stressz vizsgálat szilárd, steril modell közegének alkotója (**4.2.4-**es alfejezet).
- **Modell must erjedési metabolitok vizsgálatához** (Henschke és Jiranek, 2003 alapján): 220, 270 és 320 g/L cukortartalom 1-1 arányban D-glükóz és D-fruktóz, 11,7 g/L Yeast Carbon Base (vitaminok és ásványi sók), 2 g/L L-borkősav, 3 g/L L-almasav, KOH pH kiegyenlítésre, pH=3,4, 155 mg/L $(NH_4)_2PO_4$, 0,5 ml/L Tween 80. 300 mg/L YAN szerves és szervetlen nitrogén források alfa-aminosavak és diammónium-foszfát formájában: 657,0 mg/l arginin, 131,0 mg/l aszparagin, 263,0 mg/l aszparaginsav, 17,5 mg/l fenil-alanin, 175,0 mg/l glutamin, 438,0 mg/l glutaminsav, 8,8 mg/l hisztidin, 20,5 mg/l izoleucin, 67,0 mg/l leucin, 44,0 mg/l metionin, 17,5 mg/l tirozin, 43,9 mg/l treonin, 17,5 mg/l triptofán, 87,7 mg/l valin, Valamint 438,5 mg/l prolin ugyan jelen ismereteink szerint rendkívül rosszul hasznosított aminosav, azonban a mustok, borok aminosavainak jelentős alkotója. A kiindulási cukortartalom okozta stressz (**4.2.2**-es alfejezet), valamint a metabolikus profil vizsgálathoz alkalmazott steril modell közeg (**4.3.2-**es alfejezet).
- **Módosított YEPD agar**: Normál összetételű YEPD agar (10 g/L élesztő kivonat, 10 g/L pepton, 25 g/L D- glükóz, 15 g/L por agar-agar), különböző kiindulási cukortartalommal, ahol a 25 g/L a kontroll koncentráció, valamint 220-470 g/L között 50 g/L különbséggel emelkedő koncentrációt alkalmaztunk. Az erjedési hőmérséklet és a kiindulási cukortartalom kombinált hatásának vizsgálatára alkalmazott szilárd, steril modell közeg (**4.2.3-**as alfejezet).

### 3.3. Analitikai módszerek

A vegyszerek és indikátorok a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-tól (München, Németország) származtak, az enzim rendszerek a Megazyme Inc-től (Bray, Írország).

#### 3.3.1. Hagyományos módszerek

- Oldott szárazanyag tartalom (túlnyomó részt hat szénatomos cukrok) meghatározása refraktometriás módszerrel (OIV-MA-AS2-02), Atago RX-5000 CX digitális refraktométerrel.
- Alkohol tartalom meghatározása lepárlást követően, hidrosztatikus mérleggel (OIV-MA-AS312-01B), Gibertini DEE lepárló és Gibertini Densimat & Alcomat hidrosztatikus mérleg.
- Illósav tartalom meghatározása víz-gőz lepárlást követő sav-bázis titrálással (OIV-MA-AS313-02), Gibertini DEE lepárlóval.
- Titrálható savtartalom meghatározása, sav-bázis titrálással, borkősav egyenértékben kifejezve (OIV-MA-AS313-01).
- pH érték meghatározása potenciometriás úton, Radelkis pH/ION ANALYSER asztali automata pH mérővel (OIV-MA-AS313-15)
- Redukáló cukortartlom meghatározása Schoorl titrálással (OIV-MA-AS311-01A).

#### 3.3.2. Enzimatikus, spektrofotometriás módszerek

- L-almasav tartalom meghatározása enzimatikus úton (OIV-MA-AS313-11), L-almasav Assay Kittel (Megazyme Inc., USA), Dynamica Halo RB-10 Spektrofotométer UV/VIS, 340 nm-en.
- Glicerin tartalom meghatározása enzimatikus úton (OIV-MA-AS312-05), Glycerol Assay Kittel (Megazyme Inc., USA), Dynamica Halo RB-10 Spektrofotométer UV/VIS, 340 nm-en.
- Azonnal felvehető nitrogén tartalom meghatározása enzimatikus úton, PANOPA és LARGE Assay Kittel (Megazyme Inc., USA), Dynamica Halo RB-10 Spektrofotométer UV/VIS, 340 nm-en.
- L-borostyánkősav tartalom meghatározása enzimatikus úton. L-borostyánkősav Assay Kittel (Megazyme Inc., USA), Dynamica Halo RB-10 Spektrofotométer UV/VIS, 340 nm-en.
- Glükóz-fruktóz arány meghatározása enzimatikus úton D-glükóz/D-fruktóz Assay Kittel (Megazyme Inc., USA), Dynamica Halo RB-10 Spektrofotométer UV/VIS, 340 nm-en.

- Oldott fehérje tartalom meghatározása spektrofotometriás úton, módosított Bradford módszer alapján, CBB reagenssel, Dynamica Halo RB-10 spektrofotométerrel, 570 nm-en.
- Fehérje mentesítés Carrez módszer alapján, Carrez I. és II. reagensekkel.

### 3.3.3. Nagy műszeres analitika:

- $^{1}$H NMR technika (Godelmann *et al.,* 2013): $^{1}$H NMR spektrumok rögzítése 26,85 °C-on Bruker AVANCE 400 spektrométerrel és 400’54 ASCEND magnet rendszerrel (Bruker, Karlsruhe, Germany) proton NMR módban, 400.13 MHz frekvencián. A célzott vizsgálathoz való minta előkészítés és vizsgálati paraméterek a következők voltak: pH állítás pH 3,1-ra automata BTPH rendszerrel, deutérium és tetrametil- szilán adagolása, relaxációs késés 4 s, mintavételi idő 3,98 s, spektrális szélesség: 8223,68 Hz. Az adatok NMR Wine-Profiling$^{TM}$ 3.1 Analysis Reportban kerültek rögzítésre. Az NMR vizsgálatokra a Dyagnosticum Kft. Szerencsi laboratóriumában került sor.

## 3.4. Mikrobiológiai módszerek

### 3.4.1. Kísérleti erjesztések

- Inokulumok: A különböző léptékű erjesztésekhez való inokulum készítés azonos volt: ferde YEPD/$CaCO_3$-mal kiegészített YEPD agaron, paraffinolaj alatt, 6 °C-on tartott, majd friss YEPD agaron felszaporított (2 hétnél nem öregebb) sejtek tovább szaporítása steril YEPD levesben rázatás nélkül, szobahőmérsékleten 24/48 óráig, majd 2v/v %-nyi inokulum beoltás az adott vizsgálat közegébe. A félüzemi erjesztés esetén a YEPD leves 5 mL-jének lépték növelése 48 h után steril mustban, szobahőmérsékleten 8/24 óra rázatással. Majd a 72 órán át szaporított inokulum beoltása a valós, nem steril, ülepített must közegbe.
- Előkísérlet, erjesztőképesség vizsgálata mustban: Az erjesztés 2 v/v%-nyi stacioner inokulummal való beoltást követően egy jól beérett (250 g/L) természetes steril Bianca must közegben zajlott 20 °C-on, 60 mL must/65mL-es óriáskémcső léptékben, szemi-anaerob körülmények közt.
- Előkísérlet, elakadt must újraerjesztése: Az erjedés újra indító képességét 20 °C-on, YEPD levesben, 25 g/L fruktóz, 0,5 g/L ecetsav és 10% etanol jelenlétében, 15mL/ normál kémcső léptékben, szemi-anaerob körülmények közt vizsgáltam, 2 v/v%-nyi stacioner inokulummal.

- Hőmérséklet hatása a szaporodásra és ejesztésre: Természetes, steril, Bianca must közegben ment végbe az alkoholos erjedés, 240 g/L es kiindulási cukortartalommal, három féle hőmérsékleten (6, 12 és 20 $^{o}$C), 60 mL/65mL óriás kémcső léptékben szemi-anaerob körülmények közt, 2 v/v%-nyi stacioner inokulummal A 21 napos (527 óra) vizsgálati periódusban az élesztő populáció változását követtük nyomon, optikai denzitás mérésén keresztül (majd sejtszámra kalibrálva), valamint az alkoholos erjedés lefutását az oldható szárazanyag koncentrációjának változásán keresztül (refrakció% mérés).
- A kezdeti cukortartalom hatása a szaporodásra: A kísérletben steril, szintetikus modell must közegben ment végbe az alkoholos erjedés, 20 °C-on szemi-anaerob körülmények közt, 2 v/v%-nyi stacioner inokulummal való beoltást követően. A kiindulási cukortartalom volt a változó szintekre beállított faktor: 220-320 g/L között. Az élesztő populáció monitorozása az optikai denzitás mérésén keresztül történt (sejtszámra kalibrálva).
- Intracelluláris glicerin meghatározás: Az erjedés valódi, sterilizált must közegben zajlott 20 °C-on, 320 g/L kiindulási cukortartalom mellett, 48 órás 2 v/v%-nyi YEPD-ben szaporított inokulummal, 200 mL/500 mL Erlemeyer lombik léptékben, szemi-anaerob körülmények között, két párhuzamossal.
- Metabolitkus profil vizsgálat: A fermentáció modell must közegben zajlott 20 °C-on, 220 és 320 g/L kiindulási cukortartalom mellett, 48 órás 2 v/v%-nyi YEPD-ben szaporított inokulummal, 180 mL/200 mL Erlemeyer lombik léptékben, szemi-anaerob körülmények között, három párhuzamosban.
- Félüzemi léptékű fermentáció: 100 L-es koracél tartályban, 60 L valódi szőlő must állandó hőmérséklet: 16 °C, 2 v/v%-nyi inokulummal történő beoltás, két párhuzamossal.

### 3.4.2. Növekedés vizsgálatok szilárd táptalajon (Drop-teszt)

- Drop-teszt (Perez-Torrado *et al.*, 2016 alapján): 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 (részletesen: **4.2.3.** alfejezet). A Drop-tesztek részletesebb leírását az eredmények könnyebb áttekintése és értelmezhetősége érdekében az Eredmények fejezet adott alfejezeteiben adom meg.

- A cukor és hőmérséklet hatásának kombinált vizsgálata: A vizsgálat szilárd táptalajon, Drop-teszttel (részletes leírás a **4.2.3.** alfejezetben) történt, 7 eltérő cukor fokozattal: 25 g/L(kontroll), 220, 270, 320, 370, 420, 470 g/L három párhuzamosban. A cukortartalom glükóz és fruktóz 1:1 arányú adagolásával került beállításra. A YEPD levesben 48 órát szaporított stacioner inokulumot hat tagú tizedelő hígítás minden lépcsőjéből vittük ki 10 µL-es mennyiségben YEPD táptalajra, aminek összetételében a növekvő cukortartalom volt az egyetlen változó.
- Közepes szénláncú zsírsavak (MCFA) hatásának vizsgálata: 4 borászatilag jelentős faj 5-5 törzsének szaporodási képességét teszteltük emelkedő MCFA koncentráció (0, 10, 20, 40 és 80 mg/L) mellett, Drop-teszttel. A dolgozat összes vizsgálatában egymás mellett kezelt három faj mellé a *Zygosaccharomyces bailii* került be, mint egy gátló anyagokkal szemben kiemelkedően toleráns, jelentős károkért felelős romlást okozó élesztő. A YEPD levesben 48 órát szaporított stacioner inokulumot 2 v/v%-ban beoltottuk egy szőlőmustot imitáló egyszerű modell levesbe, ahol 72 órán át szaporodtak 20 °C-on, ezt követően Bürker- kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot. Majd egy, a korábban alkalmazott modell leveshez hasonló összetételű, 5v/v% etanollal és emelkedő MCFA koncentrációkkal kiegészített modell agar felületén Drop-tesztet végeztünk az **4.2.3**-es alfejezetben ismertetett módon, a **4.2.4**. fejezetben ismertetetett módosításokkal.

### 3.4.3. Hagyományos vizsgálati módszerek

- Élő-holt sejtarány meghatározása metilénkékes festést követő Bürker kamrás sejtszámlálással (OIV-MA-AS4-01).
- $OD_{600}$ optikai denzitás meghatározása spektrofotometriás úton, Dynamica Halo RB-10 spektrofotométerrel, 600 nm-en.
- Intracelluláris glicerin nyomon követése Perez-Torrado *et al*. (2016) módosított módszere alapján. Valódi must közegben történő erjesztésből optikai denzitás alapján meghatározott mennyiségű sejt gyűjtése, majd tisztítása membránszűréssel (szűrés 0,45 µm steril nitrocellulóz membránnal, majd a membránon felfogott sejtek mosása 5 mL steril desztillált vízzel). 1 mL steril desztillált víz adagolása a sejtek membránról való lemosására, majd hővel való feltárás (10 perc 100 °C, 10 perc 0 °C). Centrifugálást (10 perc, 15 300 × g) követően a felülúszóból CarrezI.-II. reagensekkel a Megazyme Glycerol Assay Kit leírása alapján, fehérje mentesítést követően sejten belüli glicerin tartalom enzimatikus meghatározása. Ezzel időben párhuzamosan extracelluláris glicerin értékek meghatározása a fermentléből. Mivel a *Saccharomyces*-ekhez viszonyítva a *S. bacillaris* kisebb átlagos sejtméretű, az azonos OD érték alapján meghatározott sejtmennyiségekkel

történő vizsgálat eredményeit a vizsgált fajok sejtmorfológiai eltérése enyhén torzítaná. Ezért Bürker-kamrás sejtszámlálással kalibráltuk a feltárt sejttömeg valós sejtkoncentrációját. Így az intracelluláris glicerin koncentráció µg/10^8 sejt formában kifejezhető.

### 3.4.4. Molekuláris biológiai módszerek:

- A Borászati Tanszék törzsgyűjteményében megtalálható hagyományos mikrobiológiai és sejt morfológiai vizsgálatok alapján feltételezett *S. bacillaris* izolátumok 26 S rDNS D1-D2 domain segítségével történő faji szintű azonosítását a SZIE, ÉTK Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszékén végeztem.

  A vizsgált törzsek sejtjeinek feltárása és a DNS izolálás Prepman® Ultra kit (Applied Bioscience, NY, USA) alkalmazásával történt a gyártó utasításai szerint (PrepMan® Ultra Protokoll, 2010):

  - 1mL sejt kultúra (48 órás, 25 °C-on, 160 rpm mellett 5 mL YEPD levesben szaporított) centrifugálása (12000 rpm, 3 perc), a felülúszó elöntése, majd 200 µL Prepman Ultra Sample Preparation reagens adagolása (felszuszpendálás és homogenizálás).
  - 10 perc 100 °C-os minta melegítés.
  - A szobahőmérsékletű minták centrifugálása (3 perc, 14000 rpm, 20 °C).
  - A felülúszó kiegészítő tisztítása Centriflex Gel filtration Cartridge centrifugálható kolonnával (Edge Biosystems, CA, USA) (2 perc, 2500 rpm, 20 °C) új eppendorf csövekbe a további vizsgálatokhoz.
  - Nukleinsav izolátumok ellenőrzése: a DNS oldat koncentrációját ($A_{260}$) és tisztaságát ($A_{260/280}$) spektrofotometriás úton, NanoDrop® (Thermo Fischer, MA, USA) készülékkel.

  Specifikus PCR reakció (26 rDNS D1-D2 régió):

  - PCR mastermix összetétele: OneTaq Standard buffer 6 µL, $MgCl_2$ 25 mM 13,5 µL, dNTP 25 mM 1,8 µL, Primer-NL1 2 µL, Primer-NL4 2 µL, OneTaq DNS polymerase 5000 U/mL 1,8 µL, steril desztillált víz 145,8 µL, DNS kb. 100 ng/µL 2 µL.
  - PCR hőmérsékleti profil: elődenaturálás: 95 °C, 5 perc, ciklus (35x); denaturáció: 95 °C, 0,5 perc, annenálás (primer kötődés): 50,5 °C, 0,5 perc, extenzió (lánchosszabítás): 68 °C, 1 perc, végső lánchosszabítás: 68 °C, 5 perc, ciklusok befejeztével hűtés 15,0 °C- ra.
  - Az alkalmazott primerek szekvenciája:

NL1 5’ GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3’

NL4 5’GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3’

Elválasztás 1,5%-os agaróz gélen:

- Gélöntés: 70 mL 0,5xTBE puffer (5,4 g Tris, 2,75 g $H_3BO_3$, 2 mL 0,5 M EDTA pH=8,0), 0,7 g agaróz, 2,5 µL GR-Green törzsoldat (fluoreszcens festék).
- 3 µL minta és 3 µL Loading puffer (5 g szacharóz, 1 mL 0,5 M Na-EDTA, 10 mg brómfenolkék, 10 µL 10% (v/v) SDS, 10 mL bidesztillált víz) összemérése, homogenizálása, majd a gélzsebekbe juttatása.
- Méret marker: 100 bp DNS Ladder (New England BioLabs)
- Futtatás 0,5x-es TBE pufferben 120V-on, 90 percig.
- Fragment ellenőrzés UV fénnyel BIO-Rad Quantity One programmal.

A felszaporított DNS fragmentek szekvenálása a Reprocare Genetics Kft. laboratóriumában történt. Majd a kapott szekvenciák NCBI adatbázisban elérhető adatokkal történő összehasonlítása blasztolással (Basic local alignment search tool, Altschul *et al*., 1990). A szekvencia adatbázis adatai szerint a vizsgált törzsek értelmezhető szekvencia részletei 100%-os egyezést mutattak a CBS9494 *S. bacillaris* típus törzzsel: 361 (ROYAL1), 316 (MLO) és 238 (SJ1) bázispár alapján. A 100%-os egyezőség alapján R1 és MLO törzs *S. bacillaris*, míg SJ1 azonossága a rövidebb szekvencia miatt csak valószínűsíthető.

### 3.5. Statisztikai módszerek

Különböző egy és több változós módszereket alkalmaztam, azonban minden esetben a nyers adatsor feltétel vizsgálata előzte meg a statisztikai próbát, ahol az előzetes feltételek nem teljesültek, ott az adatsoron transzformációt végeztem. Amennyiben még így sem teljesültek a feltételek (pl. a reziduumok homogenitása), a Post Hoc analízis során ezt figyelembe vettem, illetve egyes statisztikai próbák, vagy az adott adatok együttes, egy rendszerben történő vizsgálatát elvetettem. A feltétel vizsgálat eredményei a **3.** mellékletben találhatók. 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 (részletesen lásd: **3.** melléklet). 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.

### 3.6. Érzékszervi vizsgálati módszerek

Profil analízis (mennyiségi leíró értékelés) az OIV, 2015-ös erre vonatkozó ajánlásai alapján történt. A bírálat rövid tréninget követően önállóan zajlott, meghatározott paraméterek értékelésével előre egyeztetett, strukturált skálákon. A vak kóstoló során a bírálók ismerték a tételek közti különbség természetét, azonban nem volt azt adott kezelés (beoltási mód) azonosítható. A megjelenést, illat, íz paramétereket és összebenyomást értékeltek a kísérleti beállítás szempontjából releváns tulajdonságok szerint.

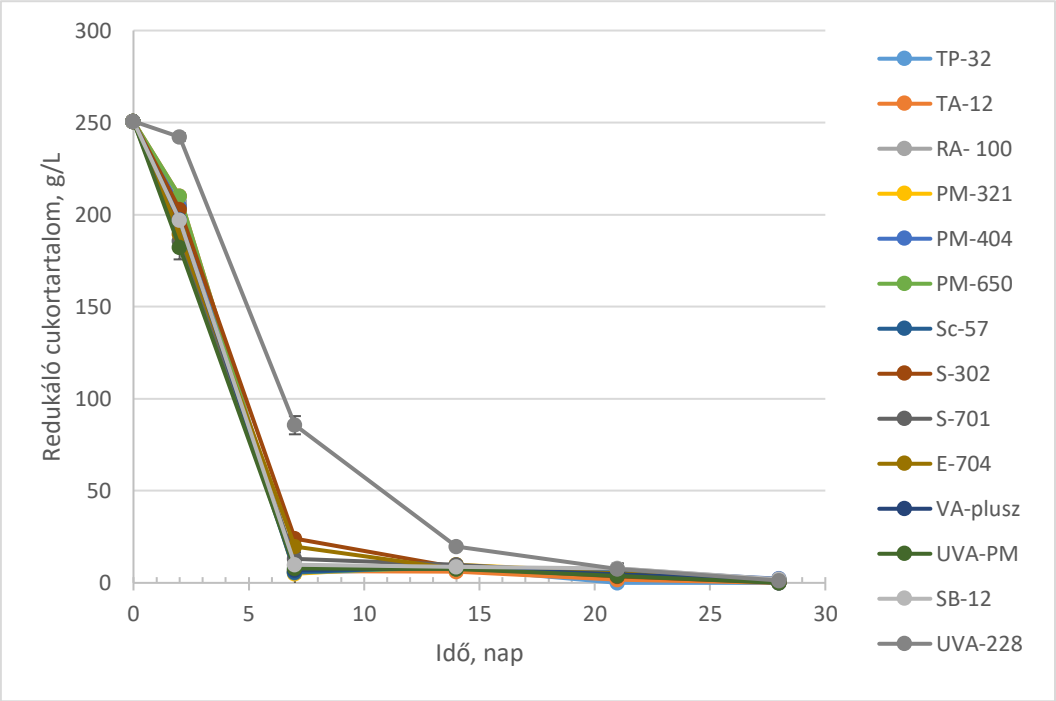
# 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Kísérleti munkám során *S. cerevisiae, S. uvarum, Z. bailii* és *S. bacillaris* törzsek növekedését és/vagy metabolikus aktivitásukat követtem nyomon különböző stressz körülmények közt, alkoholos erjedés során. A vizsgálatba vont, borászati szempontból jelentős élesztőket korábbi leírásuk és/vagy előzetes kísérletek során választottam ki főként a Borászati Tanszék Törzsgyűjteményéből, mindig szem előtt tartva, hogy legyen mások számára is könnyen hozzáférhető kontroll törzs (típus törzs és/vagy kereskedelmi starter) valamint, hogy lehetőleg a fajon belül eltérő földrajzi származásúak legyenek.

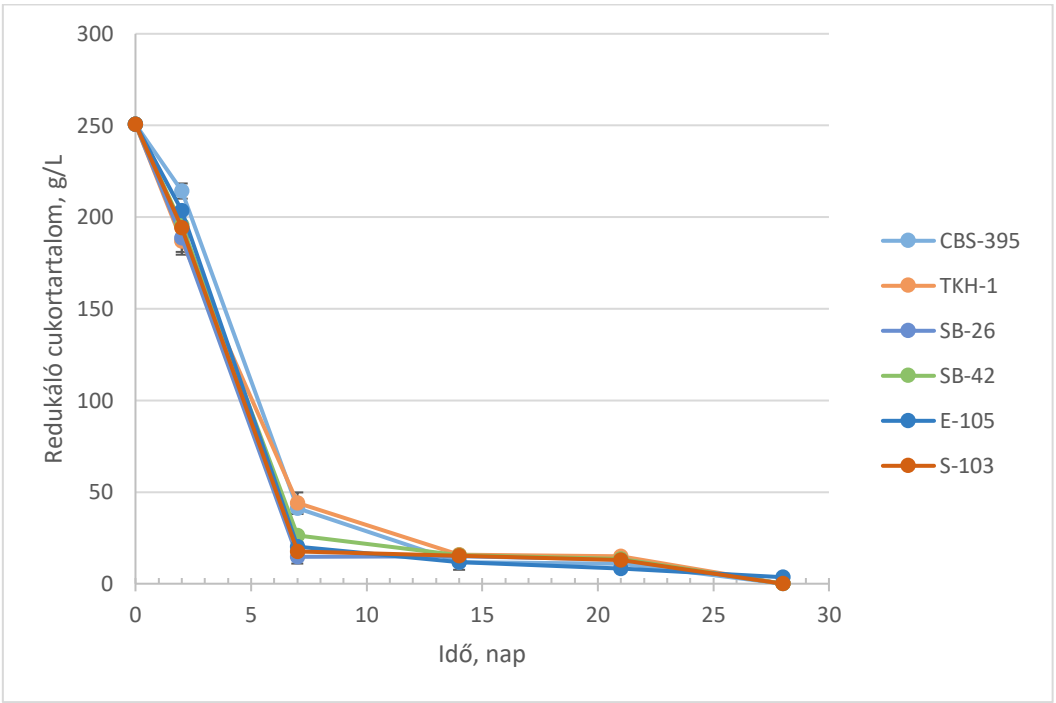
## 4.1. Erjesztési képességre irányuló előzetes kísérletek

Első lépésben a BT törzsgyűjteményéből kiválasztott *Saccharomyces* törzsek (14 *S. cerevisiae* és 6 *S. uvarum*) erjesztési képességét, robosztusságát, valamint az erjesztés dinamikáját követtem nyomon 28 napos megfigyelési idő során (2. és 3. diagram). Tettem mindezt azért, hogy differenciáljam őket, illetve, hogy csökkenthető legyen a törzsszám további munkához, azonban ne szubjektív módon történő kiválasztással, hanem alkoholos erjedéssel összefüggő tulajdonságuk alapján, merítve mind az erősen erjesztő és ellenálló, illetve a gyengébben erjesztő törzsekből egyaránt. Ezáltal a későbbi vizsgálatokba be tudtam vonni ennek a nagyon változékony fajnak jelentősen különböző fenotípusait, amelyeknél a vizsgált stressz körülményekre esetleg eltérő válaszokat várhatunk. A *S. bacillaris* esetén ezt nem kellett megtennem, mert a limitált számú BT gyűjteményi törzs számottevő részét a későbbi kísérletekbe vonhattam.

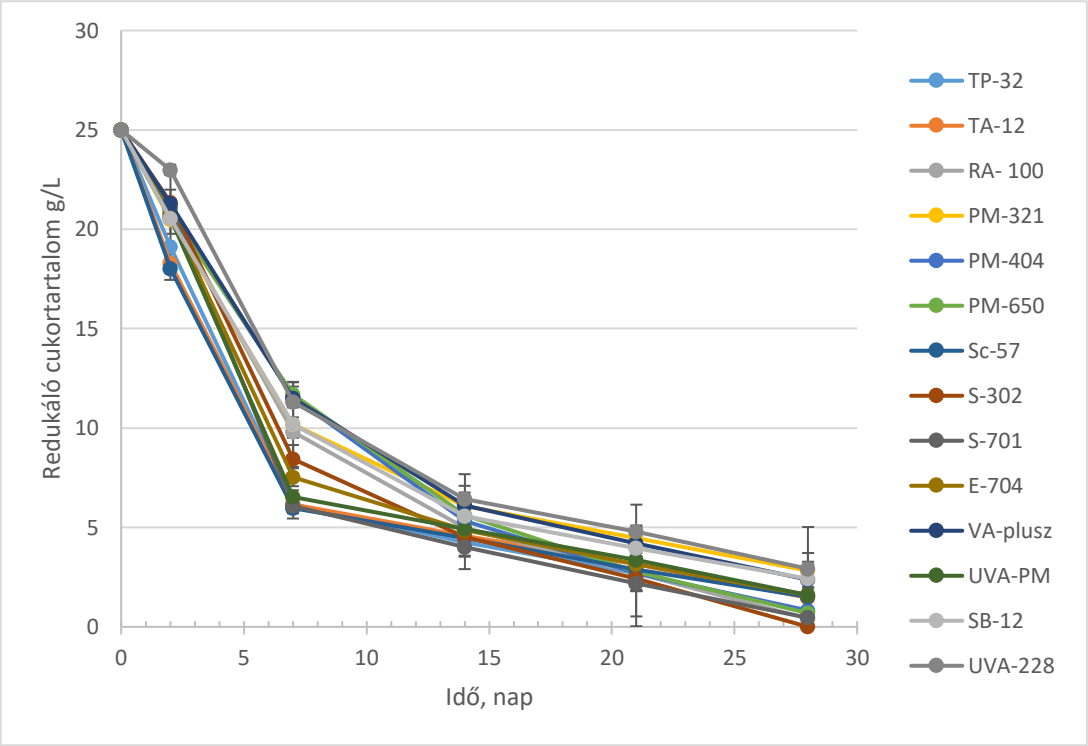
A fermentáció egy 250 g/L cukortartalmú, természetes steril Bianca must közegben zajlott 20 °C-on, szemi-anaerob körülmények közt. Minden törzs képes volt a redukáló cukortartalom megközelítőleg egészét kierjeszteni, ami nem meglepő, mivel a BT törzsgyűjteményében túlnyomó részt borászati környezetből izolált törzsek találhatók meg. Az erjesztés kezdetén az UVAFERM®228 *S. cerevisiae* törzs esetén az erjedés lassabban indult, hosszabb lag fázissal, majd a vizsgálati idő végéig az erjedés dinamikája számottevően lassabb volt. A többi törzs közt egy adott időpontban maximum 30 g/L-es cukortartalombeli különbség volt (pl. UVAFERM®PM 170g/L és CBS395 201 g/L), ami megközelítőleg a zajos erjedés (14 nap) végéig megmaradt. A 2. és 3. ábrák alapján a törzsek közti differenciálást a 7. napi cukortartalom eredmények alapján tettem meg, mivel itt mutatkozott a legnagyobb különbség. Fontos megjegyezni, hogy mivel nem egyfajta ipari optimalizáció volt a munka célja, nem a legerősebb, legrobosztusabban erjesztő törzseket kerestem, hanem igyekeztem az eredeti diverzitást megtartva csökkenteni a törzsszámon.



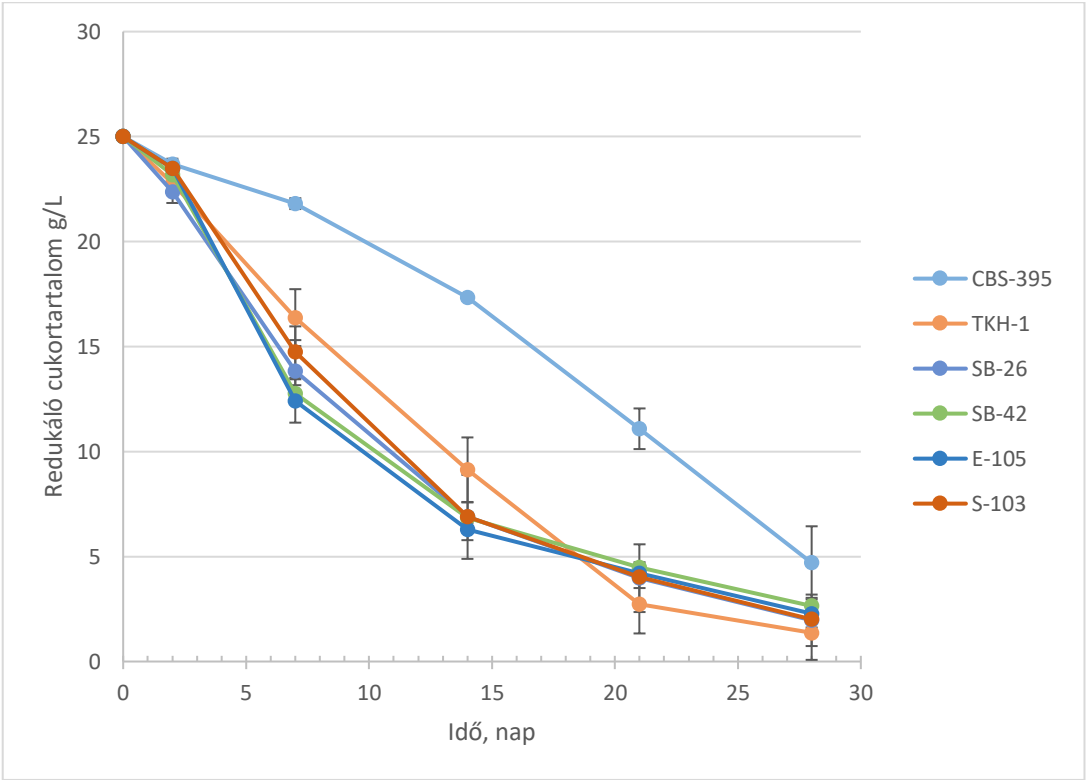

**2. ábra:** Erjedés lefutási diagram a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek esetén. 250 g/L kiindulási cukortartalom, 20 °C, Bianca must, a hibasávok a szórást jelölik.




**3. ábra:** Erjedés lefutási diagram a vizsgált *S. uvarum* törzsek esetén. 250 g/L kiindulási cukortartalom, 20 °C, Bianca must, a hibasávok a szórást jelölik.




**4. ábra:** Elakadt szintetikus mustközeg kierjesztésének dinamikája a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek esetén. 25 g/L kiindulási fruktóz tartalom, 20 °C, szintetikus must, a hibasávok szórást jelölik.




**5. ábra:** Elakadt szintetikus mustközeg kierjesztésének dinamikája a vizsgált *S. uvarum* törzsek esetén. 25 g/L kiindulási fruktóz tartalom, 20 °C, szintetikus must, a hibasávok szórást jelölik.

Második lépésben egy steril szintetikus elakadt must modell közegben (Santos *et al*., 2008 alapján) vizsgáltam a fenti törzsek erjedés újra indító képességét 20 °C-on, 25 g/L fruktóz, 0,5 g/L ecetsav és 10% etanol jelenlétében, Az erjedés során szintén 28 napig követtem nyomon a fruktóz tartalom csökkenését. Az erjedés megfelelően újraindult, kivétel a CBS395 törzs esetén, ami az egész vizsgálat alatt a leglassabbnak, legkevésbé hatékonynak mutatkozott. Az erjedés lefutása a Bianca must kierjesztéséhez képest jobban elhúzódott, az utolsó 5 g/L fruktóz elerjesztése vontatott volt, 14-21 napot vett igénybe. A robosztus *S. cerevisiae* törzsek 7 nap alatt 5 g/l-re csökkentették a cukortartalmat, azonban a moderált erjesztési képességű *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzseknek 10, illetve 15 g/L-re sikerült csak (4. és 5. ábra).

A jól beérett Bianca szőlőmust és a szintetikus elakadt modell must erjesztési dinamikájának 7. napi értékeit rangsorolva, illetve a görbék teljes lefutását is figyelembe véve választottam ki a későbbi metabolikus aktivitási kísérlet *Saccharomyces* törzseit. A *S. cerevisiae* csoporton belül jelentős fajon belüli variabilitás mutatkozott, ezért úgy döntöttem, hogy magasabb törzsszámmal fogom reprezentálni a tapasztalt változékonyságot a későbbi vizsgálatok során. Az M1. táblázat foglalja össze, hogy a dolgozatban szereplő egyes kísérletekben mely törzseket vizsgáltam. Általánosságban azonban igaz, hogy minden esetben a vizsgált fajokat és törzseket egymáshoz is szeretném hasonlítani, valamint az adott stresszhatás eredményeként önmagukhoz mért populáció/metabolit képzésbeli változást követem figyelemmel.

A törzsek kiválasztásán túl az előkísérlet eredményeiből egyes, a korábbi ismereteinket megerősítő következtetéseket tudtam levonni a két *Saccharomyces* fajról ismert borászati tulajdonságokra vonatkozóan.

### 4.2. Sejtszaporodás nyomon követése eltérő stressz körülmények között

A borászatban a must borrá erjesztése során a képzett anyagcsere termékek és arányuk rendkívüli prioritást élveznek a végtermék minőségének, élvezeti értékének meghatározása miatt. Azonban emellett szintén fontos a kellően gyors erjedés lefutás, hiszen egy nehezen induló, elhúzódó erjedés több szempontból is anyagi veszteséget okozhat. Például a szüreti szezonban megnehezíti, akár ellehetetleníti a tervezést amennyiben egy tétel az erjesztő edény kapacitást számottevő ideg foglalja; fennáll az elakadás veszélye; fennáll az oxidáció és illékony komponens vesztés, nem kívánatos mikrobák elszaporodása, illetve a nem kívánatos anyagcsere termék képzés stb. Az erjesztő élesztőt szőlő mustba oltva minden esetben stresszhatások érik, amiket általános esetben képes tolerálni, tehát a lag fázisa nem nő meg számottevő mértékben, valamint az erjedés anyagcseretermékei elfogadhatók a borminőséget tekintve. Ugyanakkor ezen stresszhatások mértéke eltérő stresszválaszt vált ki a különböző élesztő fajokból és azok törzseiből, valamint kombinált stresszhatást vizsgálva összetett válaszreakciót figyelhetünk meg. A következő

kísérletekben az erjedési hőmérséklet-, a kiindulási cukortartalom-, ezek kombinációjának-, valamint a közepes szénláncú zsírsavak jelentette stresszhatását vizsgáltam borászati körülmények közt különböző élesztő fajok szaporodására, esetenként erjesztési képességére is.

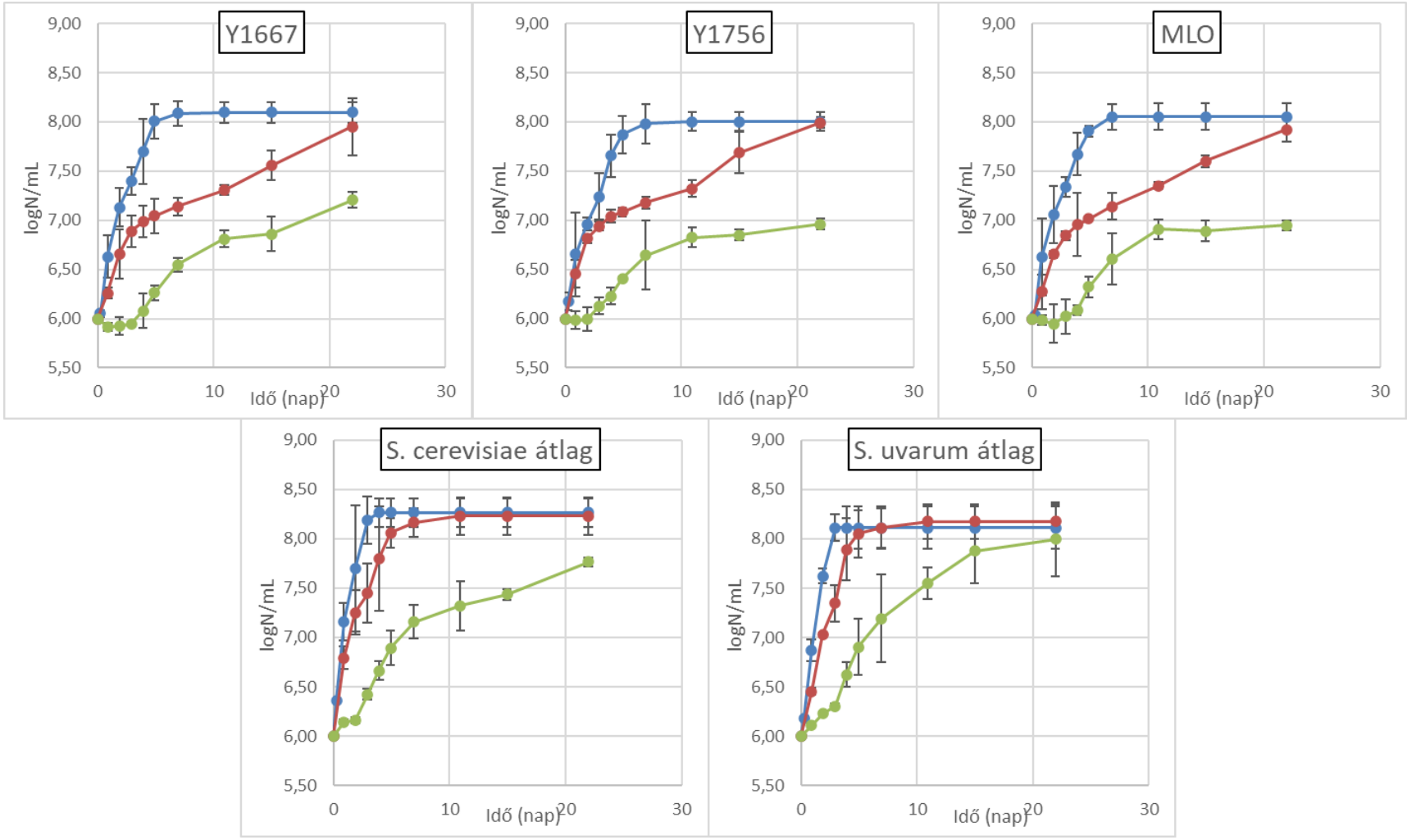
### 4.2.1. Erjedési hőmérséklet stressz

Az alacsony hőmérsékleten való erjesztés az illékony komponensek megtartását célozza, ezen keresztül a jelenlegi fogyasztói ízlést szolgálja. Egy olyan körülmény, ami nem az élesztők energianyerését támogatja, viszont alkalmazkodniuk kell hozzá. Értékes tulajdonsága bizonyos borélesztőknek a hidegtűrés, azonban mértéke változó lehet, illetve a végtermék szempontjából elengedhetetlen, hogy ez jó szaporodási- és jó erjedési sebességgel párosuljon, valamint a képzett metabolitok elfogadható arányát is jelentse.

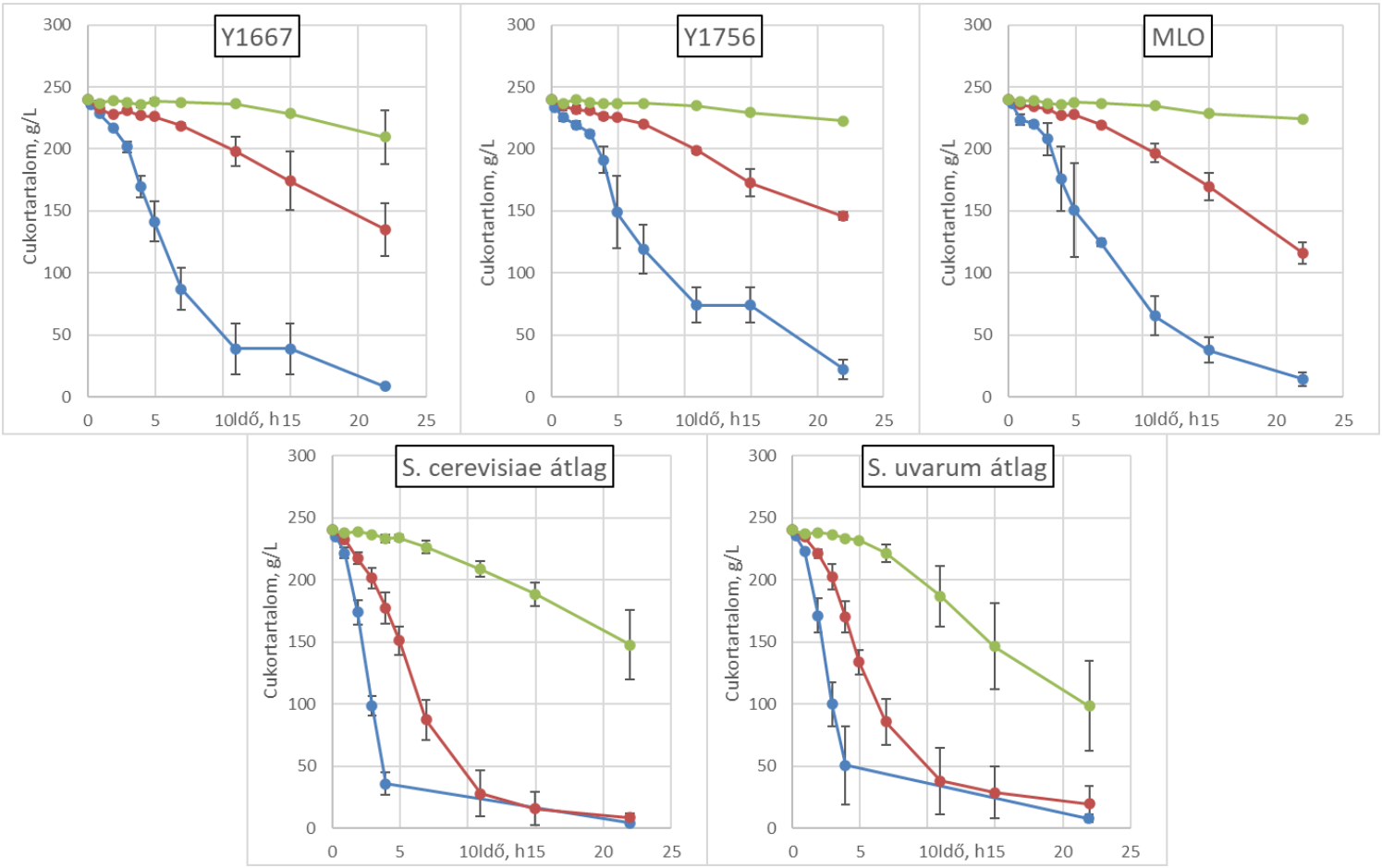
Az egyre alacsonyabbra tolódó erjesztési hőmérsékleti trend jelenős kihívást jelent az élesztőknek. A *S. uvarum* ún. kriotoleranciája (Masneuf-Pomarede *et al*., 2010) lehetővé teszi, hogy az erjesztés számottevő elhúzódása nélkül hatékonyan kierjessze egy teljes érésben levő szőlő mustját alacsony hőmérsékleten is (10-15 °C). A *S. cerevisiae* ehhez képest rosszabbul tolerálja az alacsonyabb hőmérsékletet. A *S. bacillaris*-t eredetileg pszichrofil fajként írták le általános mikrobiológiai karakterizálása során (Sipiczki, 2003), azonban ipari hasznosíthatóságának kapcsán érdekes kérdés, hogy borerjesztési körülmények közt toleranciájának határai, illetve szaporodásának és erjesztőképességének módosulása önmagához és a *Saccharomyces* fajokhoz képest miként alakul.

Jelen kísérletben természetes steril must közegben ment végbe az alkoholos erjedés, 240 g/L es kiindulási cukortartalommal, három féle hőmérsékleten (6, 12 és 20 $^{o}$C).

20 °C-on mint a borászatban gyakran alkalmazott kontroll hőmérsékleten, megmutatkozik a vizsgált élesztő fajok eredeti sejtszaporodási és erjesztési képessége (6. és 7. ábra). A vizsgált fajokon belül a törzsek közti sejtszaporodásbeli variabilitás nem számottevő, a cukorfogyasztás dinamikájában kis különbség figyelhető meg a *Saccharomyces* fajok törzsei és *S. bacillaris* törzsek esetén, ez azonban az erjedés végpontjában már nem mutatkozik meg (7. ábra). A stacioner állapot eléréséhez a *S. bacillaris* törzseknek hosszabb időre (>70 óra) volt szükségük, mint a *Saccharomyces*-eknek (~21-45 óra), mérsékelt növekedési erélyük egyértelműen nyomon követhető (6. ábra), amit a maximális fajlagos szaporodási sebesség ($\mu_{max}$, 8. táblázat) is jól jellemez. Hasonló módon az erjedés lefutásában is megmutatkozik a *S. bacillaris*-ok mérsékelt sebessége a *Saccharomyces* fajokhoz képest. Eltérő dinamikával, azonban a redukáló cukrok nagy részét minden törzs képes volt elerjeszteni (a *Saccharomyces*-eknek ~118 óra elegendő volt hozzá) (7. ábra).




**6. ábra:** Populáció dinamikai változások a csökkenő hőmérséklet hatására 20 °C-on (kék), 12 °C-on (piros) és 6 °C-on (zöld). *S. bacillaris*: Y1667 (n=2); Y1756 (n=2); MLO (n=2); *S. cerevisiae* átlag (n=3 törzs x 2 párhuzamos=6); *S. uvarum* átlag (n=3 törzs x 2 párhuzamos=6)




**7. ábra:** Cukorfogyasztás dinamikai változások a csökkenő hőmérséklet hatására 20 °C-on (kék), 12 °C-on (piros) és 6 °C-on (zöld). *S. bacillaris*: Y1667 (n=2); Y1756 (n=2); MLO (n=2); *S. cerevisiae* átlag (n=3 törzs x 2 párhuzamos=6); *S. uvarum* átlag (n=3 törzs x 2 párhuzamos=6)

12 °C-on, borászati szempontból még reális alacsony erjesztési hőmérsékleten a vizsgált fajokon belül a törzsek közti sejtszaporodásbeli variabilitás nem számottevő, a cukorfogyasztás dinamikájában kis különbség figyelhető meg a *Saccharomyces*-ek esetén, ami az erjedés végpontjában már nem mutatkozik, azonban az *S. bacillaris* MLO törzs jelentősen több cukrot erjesztett el, mint az Y1756. A *Saccharomyces* fajok közt nem adódott számottevő különbség, sem a maximális szaporodási sebesség, sem az erjedés lefutást, sem a maximális sejtszámot tekintve ($N_{max}$, 9. táblázat), a stacioner állapotot ugyanakkor jelentősen később érte el mindkét faj (>118 óra). Amennyiben azonban a 20 és 12 °C közti változást tekintjük a *S. cerevisiae* fajlagos szaporodási sebességének maximuma számottevően csökkent, addig az *S. uvarum* nem változott. A *S. bacillaris* törzsek sejtszaporodása azonban számottevően lelassult és elhúzódott (6. ábra). Az erjedés menetét tekintve hasonló tendencia figyelhető meg, a 20 °C-hoz képest számottevően hosszabb idő alatt a *Saccharomyces*-ek képesek voltak szárazra erjeszteni a Bianca mustot, amíg a *S. bacillaris* törzsek esetén jelentős mennyiségű cukor (átlag 111,1±16,9 g/L) maradt a közegben a vizsgálati idő végén (7. ábra).

6 °C-on minden törzs szaporodása jelentősen lassult a kontroll 20 °C-hoz képest, az elért maximális sejtszám megközelítőleg egy nagyságrenddel alacsonyabb a 12 °C-on mérthez képest, valamint hosszabb lag fázis figyelhető meg. A vizsgált fajokon belül a törzsek közti sejtszaporodásbeli variabilitás nem számottevő, a cukorfogyasztás dinamikájában különbség figyelhető meg az *S. uvarum* esetén, mivel az S103 kiemelkedő erjesztési képességgel bír még 6 °C-on is (a faj átlagot szemléltető 7. ábra nagy szórásai ennek köszönhetők). Ezen a hőmérsékleten határozottan megmutatkozik a *S. uvarum* kriotoleranciája, mind a felszaporodásban, mind a maximális sejtszámban, a *S. cerevisiae*-hez és *S. bacillaris*-hoz képest egyaránt. Továbbá a hideg tűrés az elerjesztett cukor mennyiségében is határozottan megkülönbözteti a két nem kriotoleráns fajt a *S. uvarum*-tól (6. és 7. ábra). A *S. bacillaris* esetében az elhúzódó sejtszaporodás (>166 óra a 'stacioner' állapothoz, a görbe vontatottan ellaposodó, kevésbé telítési görbe jellegű) és lassú erjedés kezdés egyaránt arra utal, hogy a vizsgált törzsek nem képesek tolerálni a *S. uvarum*-hoz hasonló mértékben ezt az alacsony hőmérsékletet úgy, hogy időben elfogadható és reális mértékű bor erjesztés is történjen. A cukor fogyasztás szempontjából egyértelműen elmaradt a *S. bacillaris* (alig detektálható cukor fogyasztás) és *S. cerevisiae* (mérsékelt cukor fogyasztás) a kriotoleráns *S. uvarum*-tól (7. ábra).

Összefoglalva megállapítható, hogy a csökkenő erjedési hőmérséklet számottevően befolyásolta a vizsgált fajokat, a kriotolerancia ellenére a *S. uvarum*-ot is, azonban ezt a fajt a legkisebb mértékben. A hőmérséklet-változás némileg eltérően befolyásolta a maximális szaporodási sebességet (8. táblázat) illetve a maximális sejtszámot (9. táblázat). A *S. uvarum* fajnál a 6 °C-on a szaporodási sebesség mindössze 34%-ra, az elért maximális sejtszám 74%-ra csökkent.

A *S. cerevisiae* esetén a szaporodási sebesség 6 °C-on 18%-ra csökkent, a maximális sejtszám 32%-ra. A *S. bacillaris* törzsek átlagos viselkedése a *S. cerevisae*vel mutat hasonlóságot.

A *S. bacillaris*, valóban pszichrotoleráns (Sipiczki, 2003) annak általános mikrobiológiai értelmében, amennyiben képes alacsony hőmérsékleten szaporodni azonban a szaporodás mértéke, dinamikája és az alkoholos erjesztés intenzitása nem megfelelő alacsonyabb hőmérsékleten. Ennek a tulajdonságnak a nem-*Saccharomyces* élesztők esetén nem önmagában, hanem kombinált erjesztés során lehet ipari jelentősége, ahol a populációdinamikai egyensúly kialakításakor a hőmérséklet megválasztását szem előtt kell tartani, mint potenciális limitációt. Azonban botrítiszes borok készítése során (Mills *et al*., 2002; Nisiotou *et al*, 2007), Tokaji aszú erjesztésekből nagy gyakorisággal izolálható ezen faj (Bánszky *et al*., 2003; Sipiczki 2003; Magyar és Bene, 2006; Pfliegler *et al*., 2014), ahol pince hőmérsékleten (~13 °C) van jelen, azonban az utóerjedés relatíve hosszú periódusában van alkalma felszaporodni és elhúzódóan erjeszteni, tehát hidegtűrése ebből a szempontból másként értelmezendő.

**8. táblázat:** Fajlagos szaporodási sebesség maximuma, $\mu_{max}$ (1/h). A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post-hoc tesztje szerint ($p<0,05$); a kisbetűk adott hőfokon belül, nagy betűk adott törzsön/fajon belül.

| Törzs | 20 °C | | 12 °C | | 6 °C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\mu_{max}$ | % | $\mu_{max}$ | % | $\mu_{max}$ | % |
| Y1667 | $(0,061\pm0,001)^{aA}$ | 100 | $(0,034\pm0,001)^{aB}$ | 55,7 | $(0,015\pm0,001)^{abC}$ | 24,6 |
| Y1756 | $(0,072\pm0,003)^{aA}$ | 100 | $(0,041\pm0,001)^{bB}$ | 56,9 | $(0,013\pm0,001)^{aC}$ | 18,1 |
| MLO | $(0,073\pm0,004)^{aA}$ | 100 | $(0,034\pm0,001)^{bA}$ | 46,6 | $(0,016\pm0,000)^{bC}$ | 21,9 |
| *S. bacillaris* átlag | (0,069±0,0067) | 100 | (0,036±0,004) | 53,0 | (0,014±0,002) | 21,5 |
| *S. cerevisiae* átlag | $(0,126\pm0,006)^{abA}$ | 100 | $(0,053\pm0,003)^{cdB}$ | 42,1 | $(0,023\pm0,003)^{abC}$ | 18,3 |
| *S. uvarum* átlag | $(0,092\pm0,013)^{bA}$ | 100 | $(0,064\pm0,004)^{cA}$ | 69,6 | $(0,031\pm0,005)^{cB}$ | 33,7 |

**9. táblázat:** Maximális sejtszám, $N_{max}$ ($10^7$ sejt/mL). A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post-hoc tesztje szerint ($p<0,05$); a kisbetűk adott hőfokon belül, nagy betűk adott törzsön/fajon belül.

| Törzs | 20 °C | | 12 °C | | 6 °C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nmax | % | Nmax | % | Nmax | % |
| Y1667 | $(12,54\pm0,74)^{aA}$ | 100 | $(8,91\pm2,08)^{aB}$ | 71,0 | $(1,61\pm0,57)^{abB}$ | 12,8 |
| Y1756 | $(10,09\pm0,69)^{aA}$ | 100 | $(9,86\pm3,61)^{abAB}$ | 97,7 | $(0,91\pm0,04)^{aB}$ | 9,0 |
| MLO | $(11,28\pm0,95)^{aA}$ | 100 | $(8,37\pm0,79)^{aA}$ | 74,2 | $(0,89\pm0,04)^{aC}$ | 7,9 |
| *S. bacillaris* átlag | (11,30±1,40) | 100 | (9,05±2,77) | 81,0 | (1,14±0,52) | 9,9 |
| *S. cerevisiae* átlag | $(18,35\pm1,40)^{bA}$ | 100 | $(17,04\pm2,07)^{abA}$ | 92,9 | $(5,86\pm2,27)^{bB}$ | 31,9 |
| *S. uvarum* átlag | $(12,94\pm2,37)^{abA}$ | 100 | $(14,95\pm1,78)^{bA}$ | 115,5 | $(9,89\pm3,16)^{cA}$ | 76,4 |

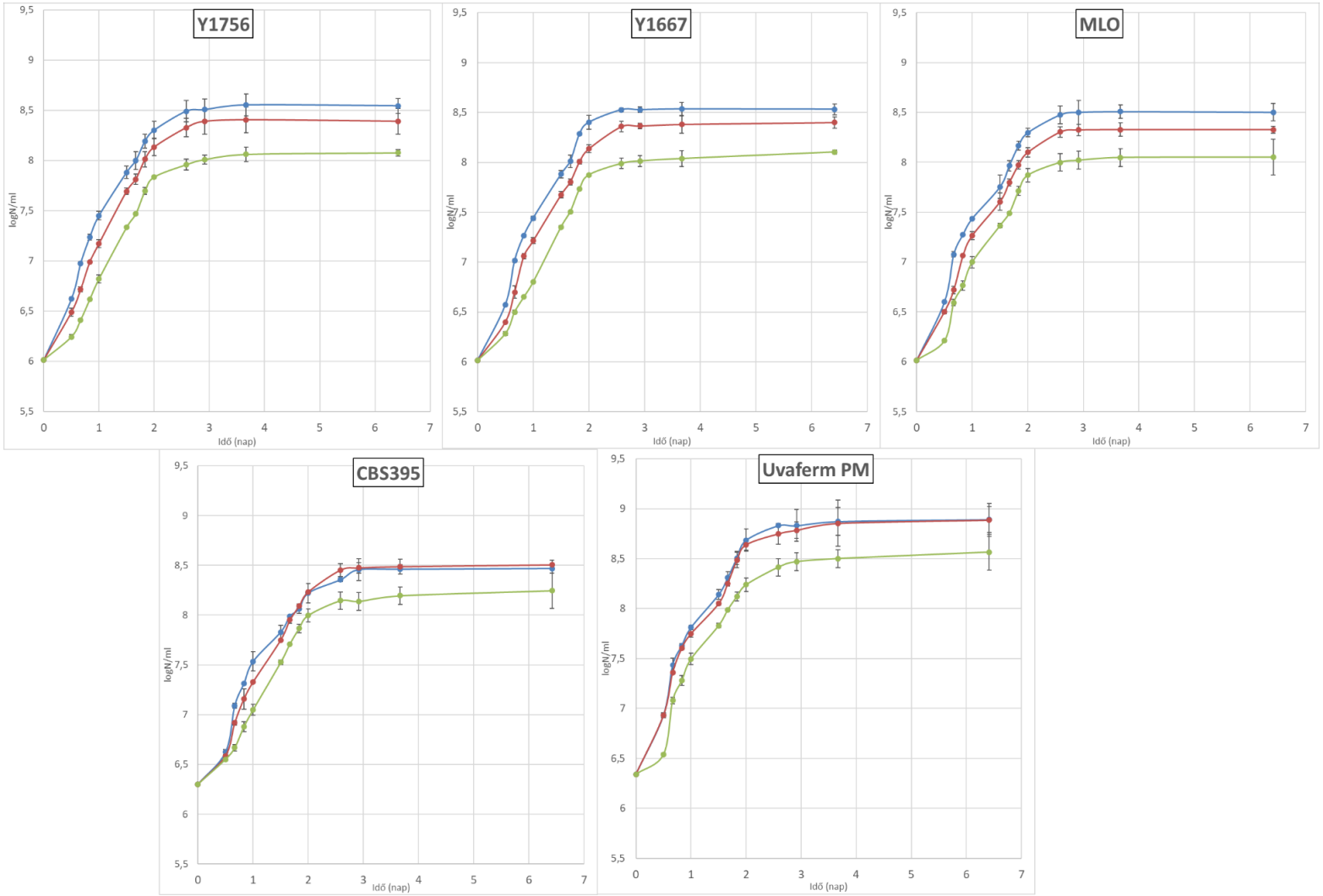
### 4.2.2. Kiindulási cukortartalom okozta stressz

A mustok magas cukortartalma miatt az alkoholos erjedést végző élesztőnek száraz borok készítése esetén is nagy kihívást jelent a teljes kierjesztés, édes borok készítésénél pedig a részleges erjesztés is, hiszen ez utóbbiaknál az extrém magas ozmotikus nyomás további gátló tényező. Az ozmotoleranciában számottevő különbségek adódhatnak fajok között és fajon belül is. Az állandó erjesztési hőmérséklettel ellentétben a glükóz és fruktóz koncentráció, mint az élesztő szaporodás szén forrása nem állandó szinten van jelen, mivel az etanol- és egyéb melléktermék termelés kiindulási alapanyaga.

A természetes édes borok (Tokaji borkülönlegességek) készítése során az erjesztő élesztőnek rendkívül magas kiindulási cukortartalmat kell tolerálnia a sejtszaporodás, az erjedési dinamika drasztikus leromlása nélkül és megfelelő metabolit termeléssel. Például a Tokaji aszú készítése során jelentkező extrém stressz körülményeket a jelenleg forgalomban kapható *S. cerevisiae* starterkultúrák nagyobb része nem képes elfogadhatóan tolerálni (első sorban metabolit kézpését tekintve), tehát kimondottan az adott feltételekhez adaptálódott helyi törzseknek is van a mai napig üzemi jelentősége. A különböző borászati élesztők közt faji és törzsi szinten is eltérést tapasztalhatunk azok toleranciáját tekintve. A *S. bacillaris*-t ozmotoleráns fajként írták le reklasszifikációja során (Sipiczki, 2003). A jelen vizsgálat során a *S. bacillaris* néhány törzsét vizsgáltam, a *S. cerevsiae*-t és *S. uvarum*-ot összehasonlításként 1-1 törzs reprezentálja.

A kísérletben steril, szintetikus modell must közegben ment végbe az alkoholos erjedés, 20 °C-on szemi-anaerob körülmények közt, a kiindulási cukortartalom volt a változó szintekre beállított faktor: 220-320 g/L között. A 202 óra vizsgálati periódusban az élesztő populáció monitorozása az optikai denzitás mérésén keresztül történt (sejtszámra kalibrálva), amit a 8. ábra szemléltet, valamint ~8 nap (202 óra) erjesztést követően a glükóz-fruktóz arányt vizsgáltuk.

Az emelkedő cukortartalom eltérő mértékben befolyásolta a fajlagos szaporodási sebesség és maximális sejtszám értékeit (10-11. táblázat). A táblázatokban a 220 g/l cukor mellett mért értékek (100%) százalékában is kifejezem a magasabb cukortartalmak mellett mért paramétereket. Míg a *S. bacillaris* törzsek és az *S. uvarum* esetén megközelítőleg egyforma mértékben csökkent a $\mu_{max}$ az 50 g-onként emelkedő cukortartalommal, addig az *S. cerevisiae*-nél csak 100 g/L eredményezett számottevő változást (10. táblázat).




**8. ábra:** Populáció dinamikai változások az emelkedő cukortartalom hatására 220 g/L (zöld), 270 g/L (piros), 320 g/L (kék); *S. bacillaris*: Y1667, Y1756, MLO; *S. cerevisiae*: Uvaferm®PM; *S. uvarum*: CBS395; (n=3)

**10. táblázat:** Fajlagos szaporodási sebesség maximuma, $\mu_{max}$ (1/óra). *S. cerevisiae*: UVAFERM ®PM, *S. uvarum*: CBS395, *S. bacillaris*: Y1667, Y1756, MLO. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post-hoc tesztje szerint ($p<0,05$); a kisbetűk adott cukortartalmon belül, nagy betűk adott törzsön belül.

| Törzs | 220 g/L | | 270 g/L | | 320 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\mu_{max}$ | % | $\mu_{max}$ | % | $\mu_{max}$ | % |
| Y1667 | $(0,107\pm0,001)^{bA}$ | 100 | $(0,076\pm0,001)^{aB}$ | 71,0 | $(0,053\pm0,001)^{bC}$ | 49,5 |
| Y1756 | $(0,111\pm0,001)^{cA}$ | 100 | $(0,089\pm0,003)^{bB}$ | 80,2 | $(0,052\pm0,000)^{abC}$ | 46,8 |
| MLO | $(0,114\pm0,000)^{abcA}$ | 100 | $(0,091\pm0,002)^{bAB}$ | 79,8 | $(0,059\pm0,002)^{cB}$ | 51,7 |
| UVAFERM®PM | $(0,118\pm0,000)^{aA}$ | 100 | $(0,113\pm0,005)^{cA}$ | 95,7 | $(0,075\pm0,004)^{eB}$ | 63,6 |
| CBS395 | $(0,084\pm0,000)^{dA}$ | 100 | $(0,064\pm0,001)^{aB}$ | 76,1 | $(0,046\pm0,000)^{dC}$ | 54,7 |

A maximális sejtszámban a legjelentősebb csökkenés a *S. cerevisiae* esetén figyelhető meg (47% csökkenés a legmagasabb cukor fokozaton), ennél kisebb mértékben csökkent a *S. uvarum* (32% csökkenés a magas cukor fokozaton). A közepes, 270 g/L cukortartalom esetén a vizsgált *S. bacillaris* törzsek diverzitása volt megfigyelhető: az Y1667 és Y1756 törzsek sejtszáma minimálisan csökkent, az MLO nagyobb mértékben 21%-kal. A 320 g/L cukor mellett a *S. bacillaris* törzsek 32-39%-os csökkentést mutattak (11. táblázat).

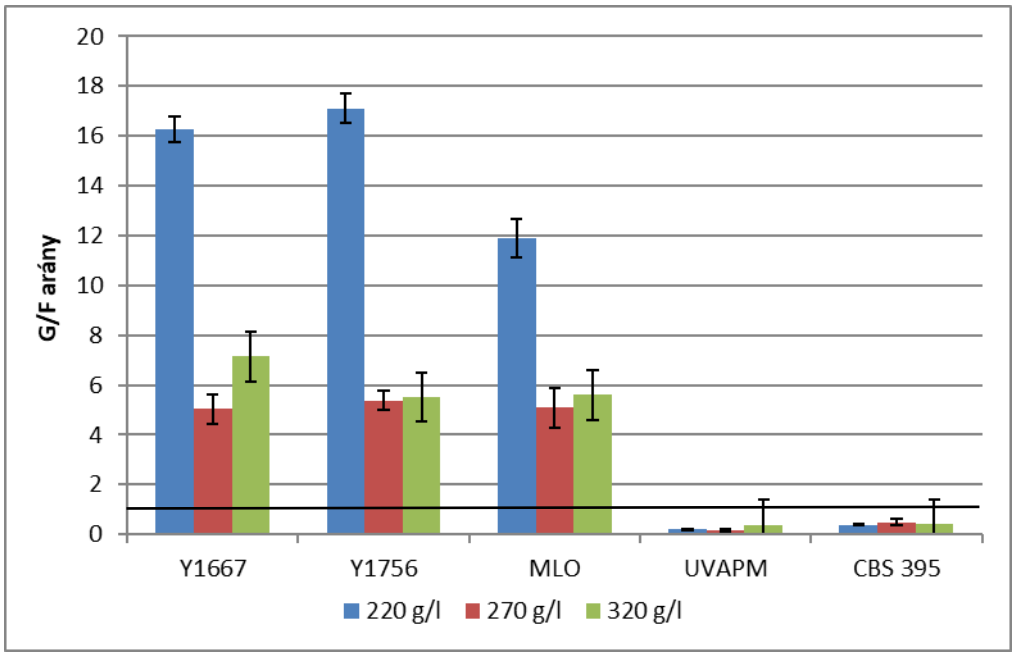
**11. táblázat:** Maximális sejtszám, $N_{max}$ ($10^7$ sejt/ml). *S. cerevisiae*: UVAFERM ®PM, *S. uvarum*: CBS395, *S. bacillaris*: Y1667, Y1756, MLO. A különböző betűk szignifikáns eltérést jelentenek egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post-hoc tesztje szerint ($p<0,05$); a kisbetűk adott cukortartalmon belül, nagy betűk adott törzsön belül.

| Törzs | 220 g/L | | 270 g/L | | 320 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nmax | % | Nmax | % | Nmax | % |
| Y1667 | $(3,34\pm1,06)^{bA}$ | 100 | $(3,27\pm1,27)^{bA}$ | 97,9 | $(2,21\pm1,13)^{bB}$ | 66,1 |
| Y1756 | $(3,29\pm1,11)^{aA}$ | 100 | $(3,13\pm1,38)^{abA}$ | 95,1 | $(2,23\pm1,07)^{abB}$ | 67,7 |
| MLO | $(3,18\pm1,18)^{aA}$ | 100 | $(2,15\pm1,06)^{abB}$ | 67,6 | $(1,95\pm1,08)^{aB}$ | 61,3 |
| UVAFERM®PM | $(10,5\pm1,34)^{cA}$ | 100 | $(8,74\pm1,55)^{cB}$ | 83,2 | $(5,54\pm1,22)^{cC}$ | 52,7 |
| CBS395 | $(4,04\pm1,05)^{bA}$ | 100 | $(3,48\pm1,06)^{bB}$ | 86,1 | $(2,76\pm1,02)^{bC}$ | 68,3 |

A vizsgált 8 nap elteltével (ami a főerjedési fázist jelenti) nagyon erősen megmutatkozott a *S. bacillaris* fruktofiliája, amit a glükóz-fruktóz arány (G/F) értékek igazolnak (9. ábra). A G/F arány a kiindulási állapotban mindhárom cukortartalom esetén 1 volt. 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. Mindez erősen alátámasztja a *S. bacillaris*-ról az irodalomban található gyengébb

erjesztési képességet és erős fruktofiliát (Tofalo *et al*., 2012; Magyar és Tóth, 2011; Englezos *et al*., 2017).

Az emelkedő cukortartalomnak jelentős hatása van a vizsgált borélesztők szaporodás kinetikai mutatóira, azonban fajonként eltérő mértékben. A *S. bacillaris* mérsékelt erjesztési erélye a magasabb cukortartományban is megnyilvánul a *Saccharomyces*-ekkel szemben, azonban a populáció nagyságát kevésbé érinti az ozmotikus viszonyok változása. A borászatilag releváns tartományban vizsgált jó cukortolerancia és erős fruktofilia alkalmassá teheti a *S. bacillaris*-t akadozó vagy elakadt erjedések újra indítására, illetve gondolhatunk rá oligo- vagy multistarterek értékes alkotójaként is.




**9. ábra:** A vizsgált fajok: *S. bacillaris* (Y1667, Y1756, MLO), *S. cerevsiaie* (UVAPM), *S. uvarum* (CBS395) glükóz-fruktóz aránya 202 óra erjesztést követően (minden érték 3 párhuzamos átlaga; a fekete vízszintes vonal a kiindulási 1 értéket jelöli).

### 4.2.3. Az erjedési hőmérséklet és a kiindulási cukortartalom kombinált hatása a növekedésre

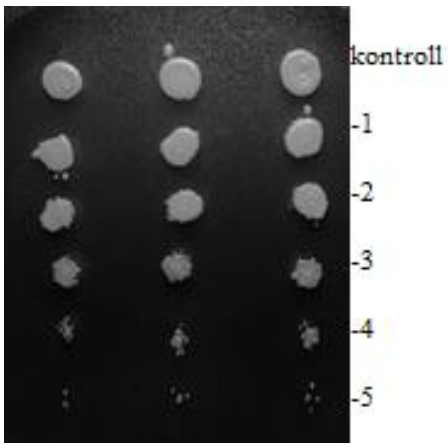
A hőmérséklet és cukor koncentráció okozta stressz önmagában végzett vizsgálatát követően ezen faktorok kombinált sejtszaporodásra gyakorolt hatását is nyomon követtem. A valóságban is együttesen (sőt egyéb stresszhatásokkal együtt) jelentkező erjesztési körülményekről van szó. Hipotézis szintjén felmerül, hogy nem összeadódó gátló hatásokat lehet majd megfigyelni csak, hanem az egyes kombinációk felerősítik, vagy lerontják az egyes élesztő fajok önállóan mutatott tolerancia határait. Ennél a kísérletnél is a még kevésbé ismert viselkedésű *S. bacillaris*-ra fókuszáltam 3 törzs vizsgálatával, míg a *S. cerevisiae* és *S. uvarum* fajokból 1-1 törzset vizsgáltam.

A vizsgálat Drop-teszttel (részletes leírás lejjebb) történt, a kontrolltól (25 g/L glükóz) 6 eltérő cukor koncentrációval és három hőmérsékleti szinttel (6, 12 és 20 $^{o}$C), három párhuzamosban. A 220 és 470 g/L cukortartalom közti 50 g/L-es emelkedéssel kellő ozmotikus stresszbeli különbséget kívántam elérni.

Az eredmények értékelése- a ritkábban alkalmazott és általam adaptált módszer következtében- részletesebb metodikai magyarázatot igényel, valamint egyes elemeit az eredményekhez sorolom.

A Drop-teszt kivitelezése Perez-Torrado és munkatársai (2016) módszere alapján történt, a dolgozat vizsgálati körülményeire optimalizálva, valamint a látómezős képrögzítés és feldolgozás segítségével a növekedés összehasonlítása egzakt módon történt, nem pusztán szemrevételezéssel.

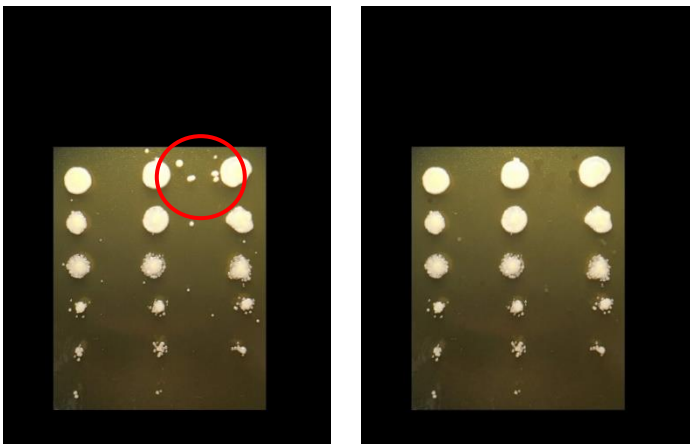
Az adott, pl. cukortartalmában változó összetételű, frissen öntött csésze felületére tizedelő hígítási sor minden lépéséből kivittünk a csészékre 10 µL sejtszuszpenziót, a kiindulási sejtszám 5 x 10^7/mL volt. (10. ábra). Az inkubációs idő alatt 24 óránként szemrevételezés és egy fix paraméterekkel rendelkező látómezőben képfelvételezés történt a csésze felületéről. A kiértékeléshez a felvételek közül kiválasztottuk azokat, amelyeken az adott törzs telepei a legkorábban teljes mértékben kinőttek, azonban nem nőtték még „túl” magukat. Mivel a telepek 3D kiterjedése is fokozatosan növekszik (azonban ezt nem képes a képfeldolgozási módszer értékelni) ezért jelentősége van az időpont megválasztásának. A kombinált kiindulási cukortartalom és hőmérséklet stressz vizsgálatnál jelentős hőmérséklet-, és cukor koncentrációbeli különbég miatt ezek a felvételi időpontok a kísérlet indításától számítva eltérő napokat vettek igénybe.




**10. ábra:** Példa a Drop-teszt kivitelezésére (a hígítási fokozatok a jobb oldalon találhatók)

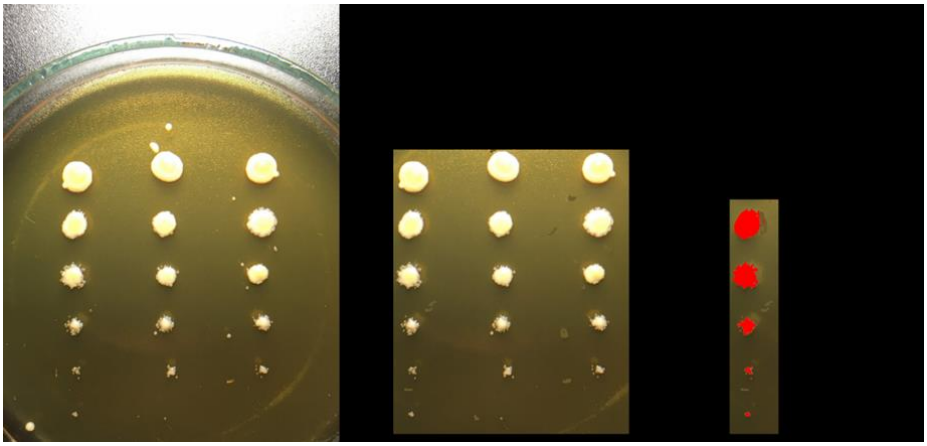
Az ImageJ képfeldolgozó program Area Measurement funkció segítségével minden telepnek meghatározható a két- dimenziós kiterjedése a telep és az agar (mint háttér) színe közti eltérés alapján. Az adott terület nagyságát a program pixelben határozza meg, ezért itt van jelentősége a csészék közti összehasonlíthatóság miatt az azonos paraméterű képrögzítésnek. Mivel a teljes elemzés során ugyanazt a módszert alkalmaztuk, így esetlegesen a program tévedéséből, vagy nem kellő érzékenységéből adódó hiba ugyanannyi volt.
A képfeldolgozás menete:

1. A felvételeken a dedikált pontoktól (cseppektől) eltérő helyen növekedett (a kísérlet elvégzése során félrecseppenésből adódóan) telepek átlagos háttérszínnel való helyettesítése (11. ábra).



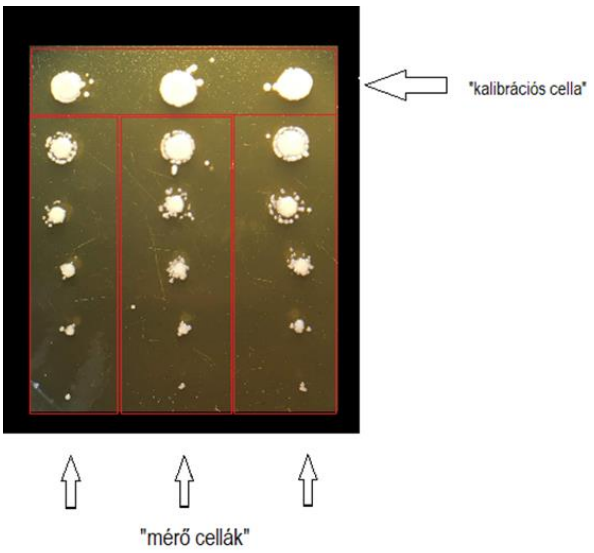
**11. ábra:** Félreeső növekedés javítása

2. A kiválasztott felvételeken az értékelendő terület kijelölése (12. ábra).



**12. ábra:** Képfeldolgozás lépései:(balról jobbra haladva) eredeti csésze; értékelendő terület; terület alapú kijelölés egy páhuzamos esetén

3. Az agar és a kinőtt telepek pontok eltérő színének segítségével Area Measurement funkcióval a telepek kiterjedésének meghatározása pixelben.
4. A kombinált kiindulási cukortartalom és hőmérséklet stressz vizsgálatnál a táptalaj jelentős összetételbeli eltérése miatt a cseppek elterülése eltérő volt (az eltérő felületi feszültség miatt), ezért a csészék közti összehasonlíthatóságot nem csak a látómező azonos elrendezése szolgálta, hanem a legfelső sor alkotta az úgynevezett „kalibrációs cellát". Ez az eredeti sejtkoncentrációt (5x 10^7/mL) tartalmazta, amit az adott faktorok melletti teljes cseppet benövő, „viszonyítási" növekedésként definiálunk. A hígítási sor tagjai a három párhuzamos „mérő cellát" alkották ($x_A$, $x_B$, $x_C$ a párhuzamosok növekedése). A 10^-1 hígítási lépés egy átlagos starter kultúrás beoltás sejt koncentrációja. A „cella" viszonyokat egy adott csészében a 13. ábra szemlélteti.




**13. ábra:** A „mérő" és „kalibrációs" cellák elhelyezkedése

5. A kalibráló cella három törzs szuszpenzió cseppjének (10/5µL) az átlagos területét használtuk ($x_{kalib}$), mint 100%-os növekedés, ezáltal összehasonlítható a cseppek fizikai kiterjedése a különböző összetételű csészék között az 1. egyenlet alapján számítva. A fenti módszer alapján kapott %-os növekedéssel ($Y_A$) történt az eredmények értékelése.

$$Y_A = (x_A * 100)/(x_{kalib} * 5) = \text{növekedés az átlagos terület \%-ában}$$

**1. egyenlet:** Adott cukortartalmú csészén belüli növekedés egységesítése (az ötös szorzó a figyelembe vett hígítási lépések számából adódik).

6. Egy további lépés elvégzése is szükséges lenne, ami a kapott %-os adatok kontroll növekedéssel ($Y_{kontroll}$) történtő normálása a 2. egyenlet alapján. Mivel a tizeledő hígítás utolsó lépései mindössze néhány telepet jelentenek 10 µL-enként, nem elvárható az átlagos csepp terület teljes "benövése" még a kontroll csészében sem. Így a kontroll növekedéssel normálva (a kontroll növekedést 100%-nak tekintve) az átlagos terület %-ában kifejezett ($Y_A$) értékek kis mértékben megnövekednek, az adott törzsek közti különbséget nem torzítva. A normált értékek %-ban kifejezve ($Y_{NA}$) a kontroll növekedéshez viszonyított %-os eltérést mutatják, míg a "nyers" %-os értékek ($Y_A$) az átlag növekedés területének ötszöröséhez viszonyított százalékot jelenti.

$$Y_{NA} = (Y_A * 100)/Y_{kontroll}$$

**2. egyenlet:** A kontroll növekedéssel történő normálás

A kombinált stressztolerancia teszt során ez a lépés nem történt meg, mivel a kontroll csészében (25 g/L cukortartalom) 6 °C-on a *S. bacillaris* növekedése jelentősen alacsonyabb volt (közel nulla), mint a borászatilag releváns cukortartományban.

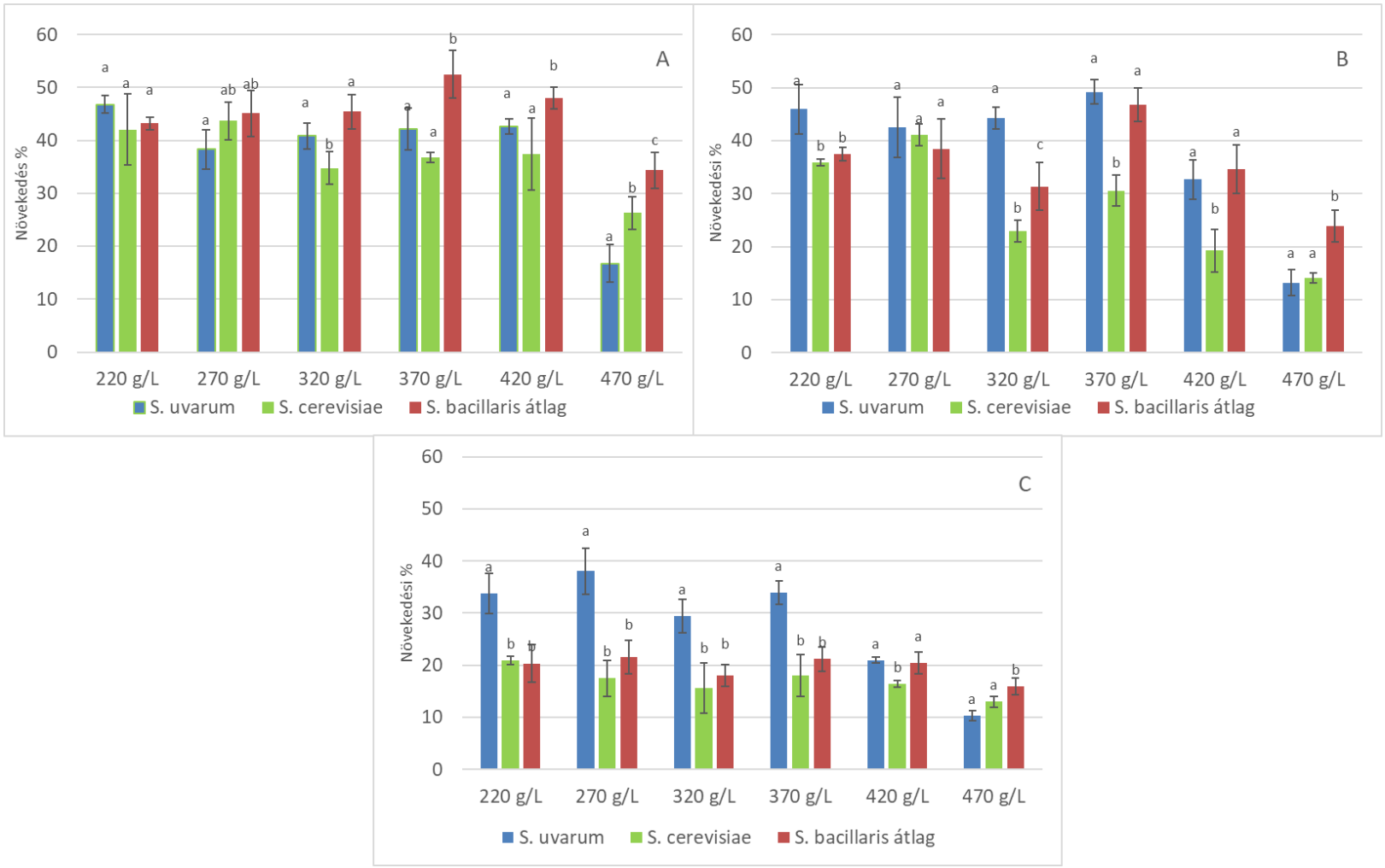
Tehát a csészék közti összehasonlításhoz szükséges „egységesítés" a kalibráló cellával megtörtént, azonban a kontroll növekedéshez való viszonyítást, annak irreális torzítása miatt, elhagytam. Ezáltal relative alacsony %-os értékekhez jutunk, ami az összehasonlítást tökéletesen lehetővé teszi, azonban kifejezőbbé tette volna a kontrollal való normálás.

A fent leírt csészeviszonyok közti kiértékelési módszerre, mint saját új eredményemre tekintek.

Az 14. ábrán a három faj vizsgálati eredményeit együttesen tüntettem fel, csökkenő hőmérséklet szerint csoportosítva a különböző cukortartalom esetén kapott eredményeket. A jelen vizsgálati összeállításban a *S. cerevisiae* (zöld oszlop) az abszolút kontroll, se nem cukortűrő, se nem hidegtűrő, ami alapján előzetes elképzelés szerint a leginkább akadályozza növekedését a két faktor emelkedő szintje. Mivel egy robusztus törzset (UVAFERM®PM) alkalmaztunk 20 °C-on csak a legmagasabb cukor fokozat eredményezett számottevő csökkenést a törzs növekedésében. 12 °C-on már 320-g/L fölött tapasztalható jelentős visszaesés a növekedésben. 6 °C-on pedig a szaporodás rendkívül korlátozott az alacsony hőmérséklet miatt a teljes tartományban (14. ábra, zöld oszlopok). A két stresszfaktor magasabb szintjein összeadódónak tűnik szaporodás gátló hatásuk a *S. cerevisiae*-re nézve.

A *S. uvarum*-ot tekintve (14. ábra, kék oszlopok) normálisnak/magasnak tekinthető cukor tartományban (220-370 g/L) a faj kriotoleranciája élesen megnyilvánul a *S. cerevisiae*-vel és *S. bacillaris*-sal szemben, már 12 °C-on. Az extrém cukor tartományban (420-470 g/L) azonban a hidegtűrő faj növekedése is jelentősen visszaszorul (12 °C és 470 g/L-en a *S. cerevisiae*-vel összevethető, míg 6 °C-on már 420 g/L-en hasonló), mivel feltételezhetően a cukor jelentette stressz egyre nagyobb mértékben akadályozza szaporodását, így a kriotolerancia jelentette előnye apránként háttérbe szorul (14 ábra).

A vizsgált három *S. bacillaris* törzs növekedése közt nincs jelentős különbség (ugyan statisztikailag igazolható egyes cukor fokozatokon némi eltérés), egyaránt erős ozmotoleranciájuk nyilvánult meg. A törzsek egyedi vizsgálati eredményeit az M1. ábra mutatja, a faj átlagértékei pedig az 14. ábrán tekinthetők meg (piros oszlop). A legmagasabb cukor fokozat egyértelműen nagy kihívást jelent még ezen cukortűrő faj törzseinek is.




**14. ábra:** A vizsgált fajok növekedése %-ban kifejezve ($Y_{A\text{-}B\text{-}C\ átlag}$) eltérő hőmérsékleten, emelkedő cukor koncentráció mellett. A: 20 °C, B 12 °C, C: 6 °C. Az eltérő betűk egytényezős, több szempontos varianciaanalízis Tukey's Post hoc elemzése szerinti szignifikáns különbséget jelölnek; $p<0,05$; *S. uvarum* (kék) és *S. cerevisiae* (zöld): n=3; *S. bacillaris* (piros): n=9.

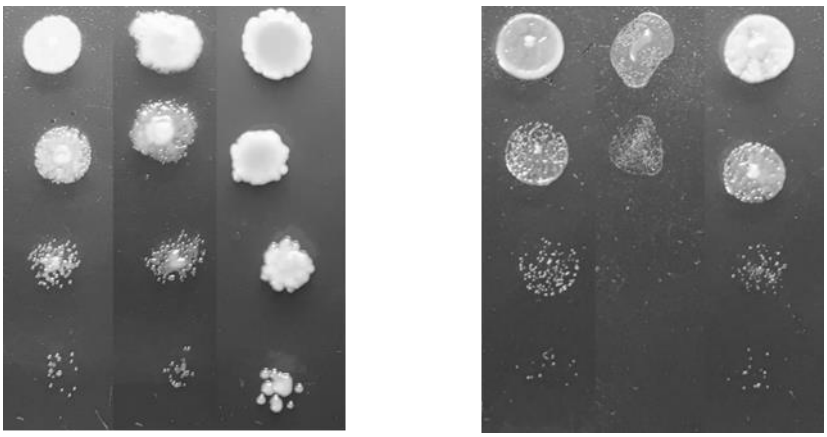
A szaporodásbeli csökkenés, amennyiben a cukor tartomány szélső értékeit vizsgáljuk (220 és 470 g/L), mindössze 5-15% a *S. bacillaris* esetén mindhárom hőmérsékleten, ami kiemelkedő, extrém ellenállóképességről tanúskodik. A vizsgált *Saccharomyces* fajok növekedésbeli visszaszorulása ennél jóval magasabb, 50-75%-ra tehető (14. ábra).

20 °C-on az *S. bacillaris* erős cukortűrése 370-470 g/L közt nyilvánul meg, azonban nem sokkal maradnak el a *Saccharomyces* fajok sem. 12 °C-on a vizsgált cukor tartomány alacsonyabb értékei esetén a három faj közt nincs jelentős különbség; 320 g/L-től magasabb szinteken a *S. cerevisiae* jelentősen visszaszorul. 370-420 g/L esetén az *S. uvarum* növekedése (hidegtűrése miatt) összevethető a *S. bacillaris*sal, azonban 470 g/L-en a *S. bacillaris* növekedése kiemelkedő. 6 °C-on a *S. uvarum* kriotoleranciája egészen 370 g/L-ig nyilvánul meg, míg a *S. bacillaris* növekedése jelentősen gátolt, a teljes cukor tartományban minimálisan változik, a *S. cerevisiae*-vel összevethető.

A *S. bacillaris* esetén a két stresszтényező 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 (15. ábra), míg a 6 °C-on a korlátozott hidegtűrés számottevően limitálja a növekedését.

A vizsgálat rávilágít arra, hogy az adott fajt jellemző tolerancia értékeket minden esetben megfelelő „korlátok" közt szabad valósnak elfogadni, azokon kívül jelentősen változhat az ellenállóképessége. Így például egy megbízható *S. cerevisiae* starterkultúra jellemzői, mint a robosztus erjesztés normál erjesztési hőmérsékleten, vagy egy *S. uvarum* starter jó hideg erjesztő képessége normál cukortartományban igazak, ebből kilépve az értékek jelentősen megváltozhatnak.

Továbbá jelen vizsgálati eredmény még inkább hangsúlyozza a *S. bacillaris*-t alkalmasságát extrém körülmények közt történő borerjesztésre, botrítiszes borok, egyéb édes természetes borok készítésére. Valamint 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).



**15. ábra:** A vizsgált törzsek növekedése 12 °C-on. Bal: 320 g/l, jobb: 420 g/l cukorkoncentráció mellett egy képen belül balról jobbra: *S. bacillaris* (Y1756), *S. cerevisiae* (UVAFERM®PM) *és S. uvarum* (103) (adott törzs reprezentatív ábrája).

### 4.2.4. Közepes szénláncú zsírsav stressz

A közepes szénláncú zsírsavak kis mennyiségben termelt élesztős metabolitok, jelenlétük, egyebek mellett, felelhet az elhúzódó vagy elakadó erjedésekért (Ciani *et al*., 2016). Az MCFA termelés mértéke az elérhető irodalmi adatok szerint jelentős variabilitást mutat fajok között és -belül egyaránt (Viegas *et al*., 1989; Andorra *et al*., 2010; Sadoudi *et al*., 2012, Nisiotou *et al*., 2018). A termelés mellett feltételezhető, hogy a tolerancia értékek is változóak a különböző borélesztők esetén, hiszen ettől nem független az egyes törzsek erjesztési, újra erjesztési, illetve együtt erjesztési képessége. Ugyanakkor a termelés és tolerancia mértéke, illetve az erjedés egyéb körülményeitől való függése aránylag keveset vizsgált terület. A nem-*Saccharomyces*-ek ipari alkalmazásba vonásával az MCFA termelés és tolerancia kérdése számottevően sokrétűvé válik a monokultúrás *S. ceverisiae* vagy *S. uvarum* erjesztéshez képest. Az oligo- és multistarterek működése során egy-egy törzs szukcessziója kiemelkedően fontos, illetve általánosságban két vagy több törzs kompatibilitásában szerepe lehet a MCFA-val szembeni toleranciának. Ugyanakkor másik nézőpontból, mint élesztő- és baktérium-, valamint erjedés gátló anyagnak lehet ipari jelentősége a közepes szénláncú zsírsavaknak a közel jövőben. Néhány éve felmerült az MCFA használata, mint a kénessav részleges kiváltója, alkoholos erjedés gátlására, megállítására (Baron *et al*., 2017, Babikova *et al*., 2012), azonban a kísérletek döntően *S. cerevisiae*-t tartalmazó erjedésben lévő borra vonatkoztak, az egyes borászati jelentőségű fajok tesztelése mindeddig elmaradt. Bizonyos botrítiszes borkülönlegességek készítése során jelentős segítség lehet a termelőknek a hatékony kénessav mennyiség részleges helyettesítése, hogy a jogszabályi határérték alatt maradjanak (607/2009/EK).

Jelen vizsgálatban 4 borászatilag jelentős faj 5-5 törzsének szaporodási képességét teszteltük emelkedő MCFA koncentráció (0, 10, 20, 40 és 80 mg/L) mellett, Drop-teszttel. A fenti

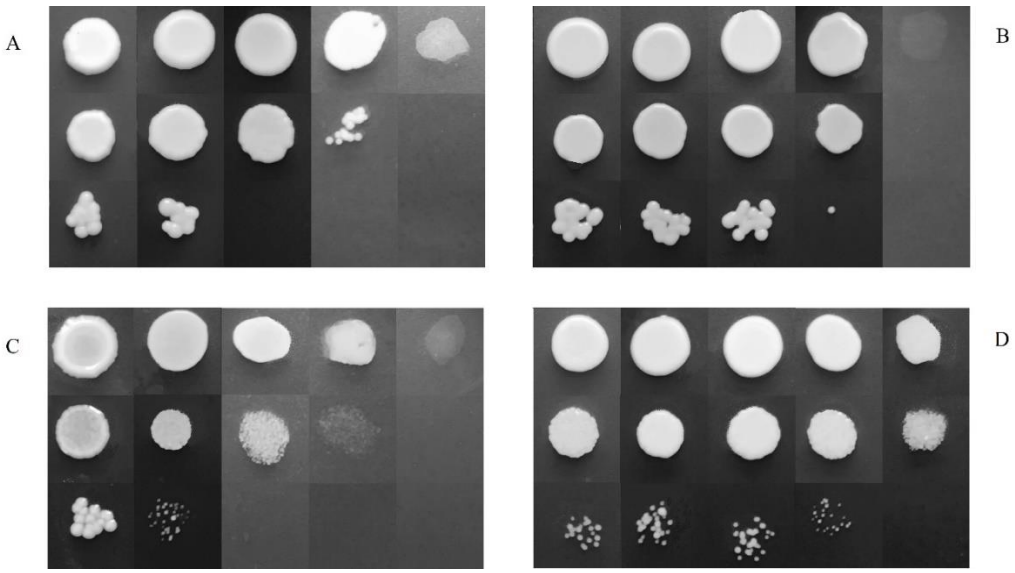
fejezetekből ismert három faj mellé a *Zygosaccharomyces bailii* került be, mint egy gátló anyagokkal szemben kiemelkedően toleráns, jelentős károkért felelős romlást okozó élesztő (Alonso *et al.*, 2015). Ez a faj a tokaji aszúbogyókon, valamint az aszú spontán erjedésében is kimutatható (Magyar és Bene, 2006). A törzsek növekedését egy, a korábban alkalmazott modell leveshez hasonló összetételű, 5v/v% etanollal és emelkedő MCFA koncentrációkkal kiegészített modell agar felületén vizsgáltuk Drop-teszttel a **4.2.3**-es alfejezetben ismertetett módon, az alábbi módosításokkal: 5 tagú tizedelő hígítás minden második tagjával ($10^{-1}$ ,$10^{-3}$ ,$10^{-5}$) 5µL-es mennyiségben történt a teszt megvalósítása. A képfelvételezés 1-3. lépései azonosak voltak, az 4-5. lépés elhagyható, mivel az MCFA tolerancia vizsgálat során csészénként az agar összetétele csak minimálisan változott (néhány mg/L-nyi gátlóanyag koncentráció eltérés), így a cseppek elterülése is hasonló volt, tehát csészén belüli kalibráló cellára nem volt szükség. A 6. pontban leírt, kontroll csészével (0 mg/L MCFA) történő normálás azonban itt megvalósítható volt.

A 4 vizsgált faj intraspecifikus variabilitása 5,8 és 25,6% között mozgott, azonban a jobb MCFA tolerancia nem korrelált sem az eredeti izolálás közegével, sem a földrajzi eredettel (7. táblázat), sem a korábban leírt robosztus erjesztési képességgel (pl. Magyar és Tóth, 2011).

Az emelkedő MCFA koncentráció hatására jelentős különbséget lehetett detektálni a vizsgált fajok közt (16. ábra). 10 mg/L MCFA szint kis mértékben gátolta a *S. bacillaris* törzsek növekedését, míg a három másik faj nem változott számottevően (17. ábra). Korábbi vizsgálatokban (Babikova *et al.*, 2012; Baron *et al.*, 2017) már ez a szint hatékonynak bizonyult etanollal (12 v/v%) és kénessavval (100 mg/L) kombinációban. Jelen kísérletben az MCFA elegy önmagában ezen a szinten, 5v/v% alkohol mellett nem volt képes számottevően gátolni a vizsgált törzseket.

20 és 40 mg/L MCFA jelenléte a *S. bacillaris* törzseket tovább gátolta, míg a *S. cerevisiae* növekedését a 20 mg/L MCFA kis mértékben, a 40 mg/L MCFA nagyobb mértékben akadályozta. A *S. uvarum* növekedése nem változott jelentősen 20 mg/L MCFA esetén, míg a 40 mg/L MCFA számottevő fajon belüli diverzitást eredményezett. Nem gátolt a növekedése számottevően az E105, SB42 és TKH1törzseknek, a S103 mérsékelten és a CBS395 jelentősen csökkent, a *S. bacillaris*-sal összevethető mértékben (17. ábra). A *Z. bailii* törzsek képesek voltak tolerálni ezeket a koncentrációkat jelentősebb csökkenés nélkül.

80 mg/L MCFA teljes mértékben gátolta az összes *S. uvarum* és *S. bacillaris* törzs növekedését, míg nagyon korlátozott növekedés volt megfigyelhető a *S. cerevisiae* esetén. A *Z. bailii* törzsek ezen a koncentráción is jelentős növekedést és kiváló toleranciát mutattak.

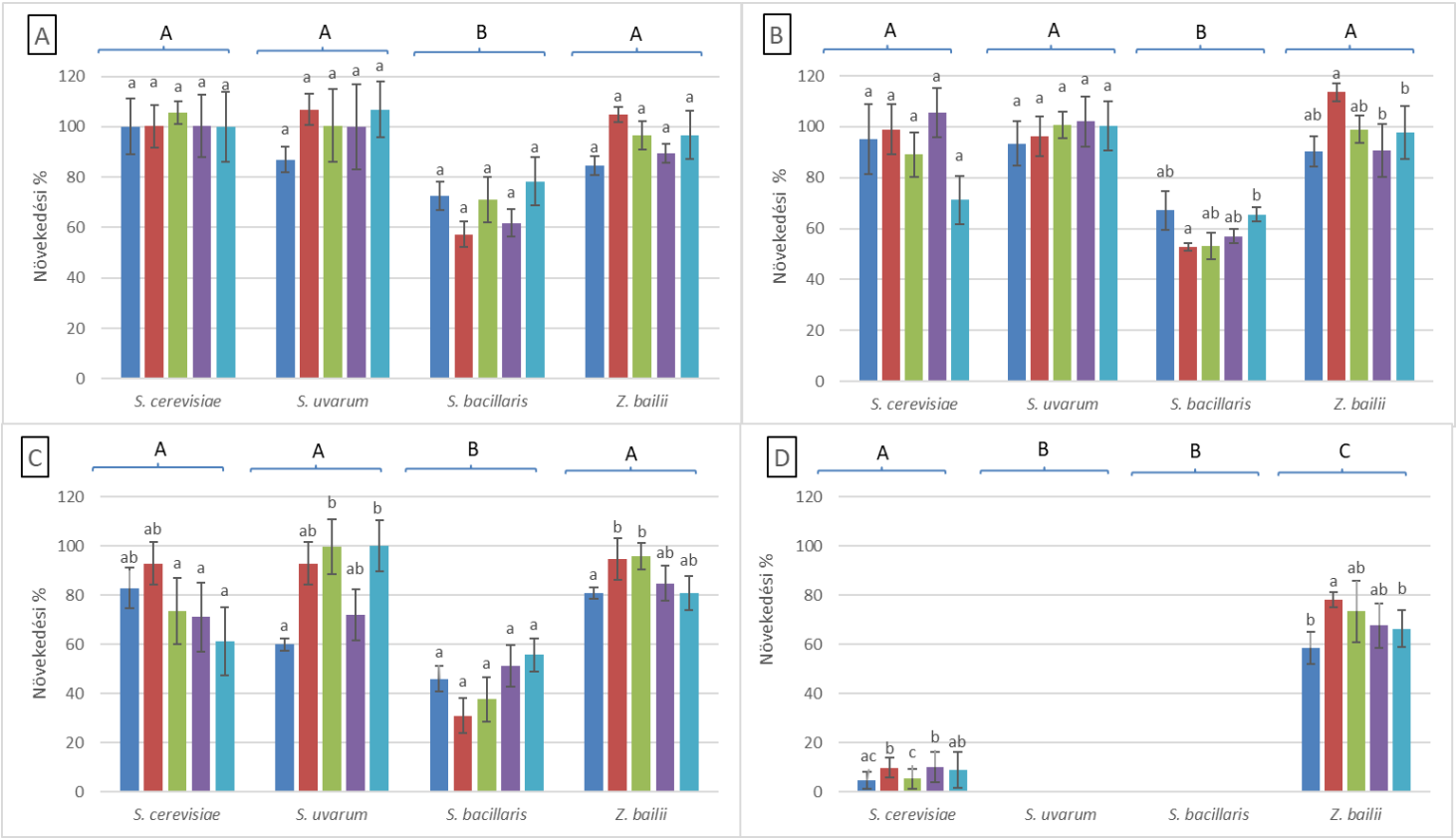



**16. ábra:** A vizsgált törzsek toleranciájának összehasonlítása, A: *S. cerevisiae* UVAFERM®PM, B: *S. uvarum* TKH1, C: *S. bacillaris* Y1756, D: *Z. bailii* Z6. Függőlegesen azonos törzs hígítási sorának tagjai ($10^{-1}$,$10^{-3}$,$10^{-5}$), vízszintesen balról jobbra 0-10-20-40-80 mg/L MCFA koncentráció látható (adott törzs három párhuzamosának reprezentatív ábrája).

A fenti vizsgálat definiálja a megfigyelt fajok általános MCFA toleranciáját: a *S. bacillaris* a legkevésbé toleráns, a *Saccharomyces*-ek hasonló, közepes mértékben ellenállók, míg a *Z. bailii*-t gátolja legkevésbé az MCFA jelenlét. A *S. bacillaris* szenzitivitását alátámasztja az is, hogy korábbi vizsgálatok jelentősen alacsonyabb MCFA termelést is figyeltek meg esetében, *S. cerevisiae*-hez képest (5. táblázat).

A *Z. bailii* kiemelkedő toleranciája limitációja lehet a jövőbeli ipari MCFA használatának az újra erjedés gátlásának céljából, mivel ez a borélesztő nagy arányban felelős maradék cukortartalmú borok refermentációjáért (Alonso *et al.*, 2015).

Jelen vizsgálatban az MCFA önálló gátló hatását kívántuk felmérni, korábbi vizsgálatok szerint azonban $SO_2$-vel kombinációban, 5 v/v%-nál jelentősen magasabb etanol jelentlétében inhibíciós hatása már jelentősen alacsonyabb koncentrációban jelentkezik (Babikova *et al.*, 2012; Baron *et al.*, 2017).




**17. ábra:** A vizsgált törzsek növekedése százalékban kifejezve ($Y_{NA\text{-}B\text{-}C\ átlag}$). *S. cerevisiae* (PM321, RA100, S7101, UVAFERM®228, UVAFERM®PM), *S. uvarum* (CBS395, E105, S103, SB42, TKH1), *S. bacillaris* (Y1756, R1, MLO, Y1667, SJ1) és *Z. bailii* (DS3, PM614, Y954, Z22, Z6). A: 10 mg/L MCFA; B: 20 mg/L MCFA; C: 40 mg/L MCFA; D: 80 mg/L MCFA. A százalékos értékek a telep területből kalkuláltak, normalizálva a kontroll növekedéssel. Az oszlopok 1-1- törzs három párhuzamos Drop-tesztjének átlaga. A különböző kis betűk Games-Howell Post Hoc elemzés során szignifikánsan különböző az átlagokat jelölnek ($p<0,05$), a nagy betűk a fajok közti különbséget szemléltetik (a fajátlagok az ábrán nem láthatóak).

### 4.3. Anyagcsere termékek nyomon követése, metabolikus profil vizsgálat

A szaporodási vizsgálatok mellett kiemelkedő jelentőségű a képzett anyagcsere termékek mintázatának monitorozása, több okból is. A borélesztők általános jellemzése normál borerjesztési körülmények közt érvényes, de nem ritkán ettől eltérő körülmények közé kerülnek, akár a klímaváltozás jelentette must összetételbeli változás miatt, akár egy elakadt must közeg újra indítása során, akár pedig egyes borkülönlegességek készítése során. Továbbá egyes élesztők (nem-*Saccharomyces*-ek mint *S. bacillaris*) jellemzése még messze nem teljes, annak széleskörű ipari léptékű alkalmazása is várat még magára. A metabolikus aktivitás vizsgálatok közül a borászatban, tehát alkalmazott mikrobiológiai szempontból, értékesebb célzott vizsgálatokat végezni, nem a metabolom egészét vizsgálni, alkotóinak pontos azonosítása nélkül, hanem szűkebb, de még mindig széles körét mérni és azonosítani, amiből összetett következtetéseket lehet levonni akár a végtermék minőségét illetően is.

#### 4.3.1. Intracelluláris glicerin menedzsment

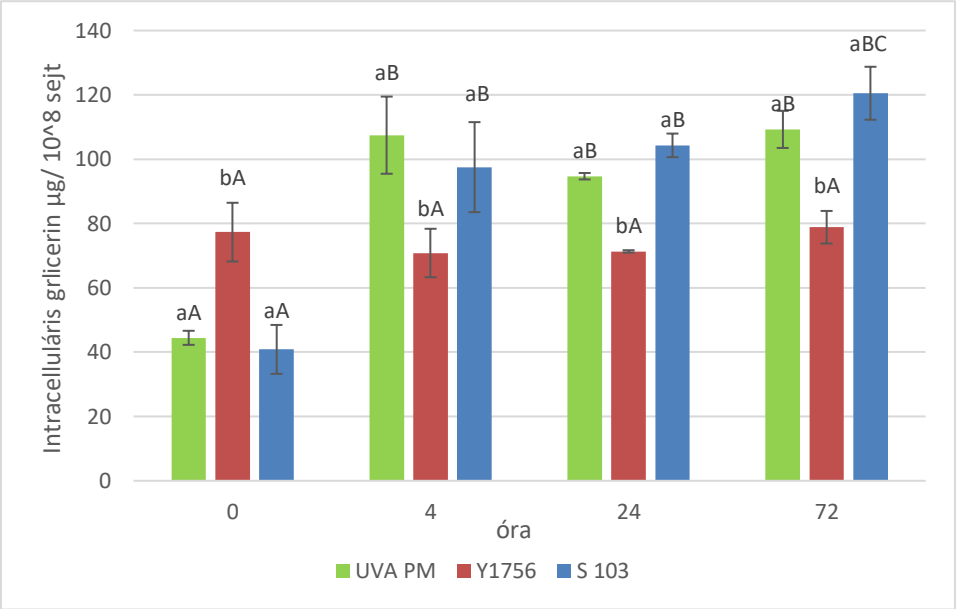
A következő kísérleti munka egy borminőséget meghatározó, értékes komponens termelésének dinamikájára fókuszál, mégpedig a glicerinre. A vegyület termeléséről szerzett információ több okból is hasznos lehet: 1. A bor minőséget nagyban meghatározza mennyisége, egyértelműen pozitív megítélésű molekula; 2. a glicerin több élesztőfajban fontos ozmotikus regulátor, tehát kapcsolatban lehet egy faj cukortűrésével, 3. a különböző élesztők eltérő általános glicerin termeléssel rendelkeznek, ami közül a *S. bacillaris* magas glicerin hozammal jellemzett faj (Magyar és Tóth, 2011); 4. jelenleg nem ismeretes a *S. bacillaris* glicerin képzési dinamikája (a *Saccharomyces* élesztőket Perez-Torrado és munkatársai vizsgálták, 2016-ban).

A vizsgálat valódi, sterilizált must közegben zajlott 20 °C-on, 320 g/L kiindulási cukortartalom mellett. Ez az érték visszatérő cukor fokozat a vizsgálatok során, ami egy kiemelkedően magas, extrém szint borászati viszonylatban. Várhatóan amennyiben van eltérés a *S. bacillaris* glicerin képzési dinamikájában a *S. cerevisiae*-hez és *S. uvarum*-hoz hasonlítva, akkor ezen a magas cukor szinten erősen meg kell, hogy nyilvánuljon. A 20 °C-ot azért választottam, mert ennél jelentősen alacsonyabb hőfok már magát a sejtszaporodás dinamikáját is számottevően befolyásolná a nem kriotoleráns fajokban, ezáltal a glicerin termelés összehasonlítását is. A vizsgálat Perez-Torrado *et al*. (2016) módosított módszere alapján történt.

A vizsgált *S. bacillaris* törzs (Y1756) sejten belüli glicerin képzésének dinamikája jelentősen eltér a két *Saccharomyces* fajétól (18. ábra). A vizsgálat kezdeti pillanatában számottevően magasabb az intracelluláris glicerin (ICG) mennyiség az Y1756 sejtekben, mint a *S. cerevisiae* (UVAFERM®PM) és a *S. uvarum* (S103) sejtekben. Mindez azonban a vizsgált 72 órában (ami az erjedés iniciációs periódusának tekinthető, mint glicerin-piroszőlősavas erjedés)

nem változott a Y1756 esetén, mindvégig a kezdeti koncentráció körül maradt (70,82-78.84 μg/ 10^8 sejt). Ezzel ellentétben a vizsgált *Saccharomyces* fajokban jelentős emelkedés volt megfigyelhető az inokulációt követő ozmózisnyomás (320 g/L kiindulási cukor koncentráció) sejten belüli kiegyenlítése érdekében. Már a 4. órára a kiindulási értékek legalább megduplázódtak, a *S. cerevisiae* esetén ez 24 és 72 óra elteltével is hasonló maradt, a *S. uvarum* esetén 4 órát követően 2,5x-ös növekedés figyelhető meg, majd ez a 72. órára 3x-ossá növekszik. Nagyságrendileg a két *Saccharomyces* faj közt nem volt számottevő eltérés.

Ezen eredményeket nehéz összevetni Perez-Torrado és munkatársai (2016) (vagy egyéb irodalmi) értékeivel, mivel nagyon eltérő körülmények közt futott a két vizsgálat (20 °C és 320 g/L cukor; valamint 12 °C és 200 g/L cukor), ami jelentősen befolyásolta a képződő glicerin mennyiségét. Az megállapítható, hogy nagyságrendileg hasonló a két vizsgálat során mért ICG mennyiség, azonban a fentiek miatt nem összevethető még az azonos fajok esetén sem. Mivel a glicerinnek a sejten belül összetett funkciója van, részt vesz az alacsony hőmérséklet elleni védekezésben, valamint a nagy ozmózisnyomás ellen való védekezésben mindkét vizsgálati körülmény együttes más-más helyzetet vizsgál. Továbbá, a *S. uvarum* kriotoleranciája miatt 12 °C-on, a Perez-Torrado vizsgálatokban, nincs extrém hideg stressz alatt, míg a *S. cervisiae* igen, tehát ez magyarázhatja a jelentős különbséget ICG szempontból a két faj közt. Jelen vizsgálatban egy ozmotoleráns és magas glicerin képzéssel jellemzett (pl. Magyar *et al*., 2014) *S. bacillaris* törzset (Y1756) hasonlítok két nem kiemelkedően ozmotoleráns, normál glicerin képző *Saccharomyces* faj 1-1 törzséhez. Az eredmények alapján úgy látszik, hogy a *S. bacillaris* lényegesen alacsonyabb intracelluláris glicerin felhalmozással válaszol a számára kisebb fokú ozmotikus stresszt jelentő környezetre. Az adott kísérleti elrendezés csak az erjedés kezdeti glicerin képzést jellemzi, a módszer maga a stacioner fázisban már nem alkalmazható hatékonyan (mivel a sejtszám optikai denzitással való mérése az élő és holt sejtek közt nem tesz különbséget).

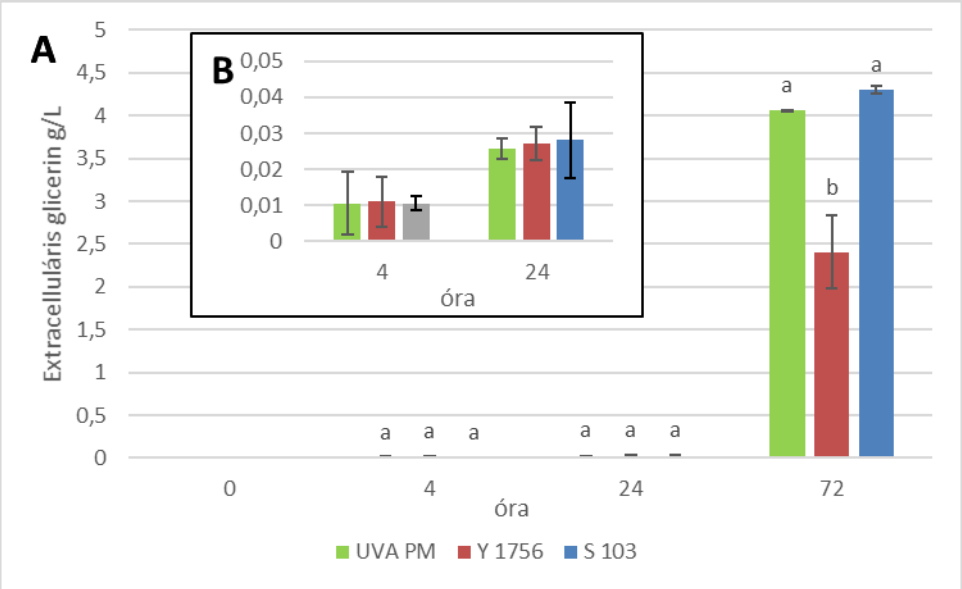



**18. ábra:** A vizsgált fajok: *S. cerevisiae* (UVAPM), *S. uvarum* (S103), *S. bacillaris* (Y1756) intracelluláris glicerin termelése (10^8 sejtre kifejezve). Az eltérő kis betűk egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post hoc elemzése szerinti szignifikáns különbséget jelölnek az adott időpillanatban a vizsgálat fajok közt ($p<0,05$; $n=2$), az eltérő nagy betűk szignifikáns különbséget jelölnek adott fajon belül a teljes időintervallumban ($p<0,05$; $n=2$).

Ha az extracelluláris glicerin (ECG) mennyiségét tekintjük, akkor a vizsgált 72 órában jelentős emelkedés figyelhető meg. Az ECG képzésének dinamikája hasonló (0-4-24. órai mintavétel alapján) azonban a 72. órára számottevően magasabb lesz Perez-Torrado és munkatársai (2016) eredményeihez képest (19. ábra). A vizsgált fajok közt nincs eltérés, azonban talán meglepő módon a *S. bacillaris* a 72. órában jelentősen alacsonyabb sejten kívüli glicerint képzett, mint a vizsgált *Saccharomyces*-ek. Ez arra enged következtetni, hogy az *S. bacillaris* nem az erjedés kezdetén történő nagy mértékű glicerin felhalmozással éri el a kierjedt állapotban mérhető jelentős glicerin többletet, mivel a jelen vizsgálatban 72 órát követően 2 g/L-es lemaradásban volt, azonban kiemelkedő glicerin termelése korábban (pl. Magyar és Tóth, 2011; Enlgezos *et al*., 2015), és jelen dolgozat más vizsgálatai során is megerősítést nyert (részletesen lásd **4.3.2.** fejezet; 20 °C, 320 g/L cukortartalom esetén, az erjedést követően: UVAFERM®PM 9 g/L; S103 8,6 g/L Y1756 11,9 g/L). Továbbá a vizsgált fajtok ECG termelése arra is enged következtetni, hogy a *S. bacillaris* kiemelkedő ozmotoleranciájában a sejten belüli glicerin képzéssel történő védekezés kisebb jelentőségű, valamint nem olyan mechanizmussal játszhat szerepet, mint a *Saccharomyes*-ek esetén.

A fent ismertetett vizsgálat a *S. bacillaris* glicerin képzésének és ozmotoleranciájának érdekes aspektusára világít rá, amit korábban tudomásom szerint még nem vizsgáltak. Jelen

kísérletből azonban messzemenő következtetéseket nem szabad levonni. A jövőben érdemes lehet szélesebb törzs palettát vizsgálni, az fajon belüli variabilitás ellenőrzésére, valamint több cukor és több hőmérséklet szintet is vizsgálatba vonni, hiszen a sejtek növekedésében saját korábbi vizsgálataimban is új összefüggést figyeltem meg extrém magas cukor tartományban és alacsony hőmérsékleten (lásd. **4.2.3.** fejezet). Feltehetőleg a glicerin és egyéb metabolit képzésére is hatással lehetnek ezen faktorok. Valamint a többi ipari alkalmazásba vont nem-*Saccharomyces* élesztő glicerin képzési dinamikáját is érdemes lehet vizsgálni. Ebben a doktori munkában azonban bizonyos anyagi limitációk miatt erre sajnálatos módon nem volt további lehetőség.




**19. ábra:** A vizsgált élesztőfajok extracelluláris glicerin termelése A: teljes idő intervallumban B: 4 és 24 óra nagyítása. Az eltérő kis betűk egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post hoc elemzése szerinti szignifikáns különbséget jelölnek az adott időpillanatban a vizsgált fajok közt ($p<0,05$; $n=2$).

### 4.3.2. Metabolikus profil vizsgálat eltérő kiindulási cukor koncentráció mellett

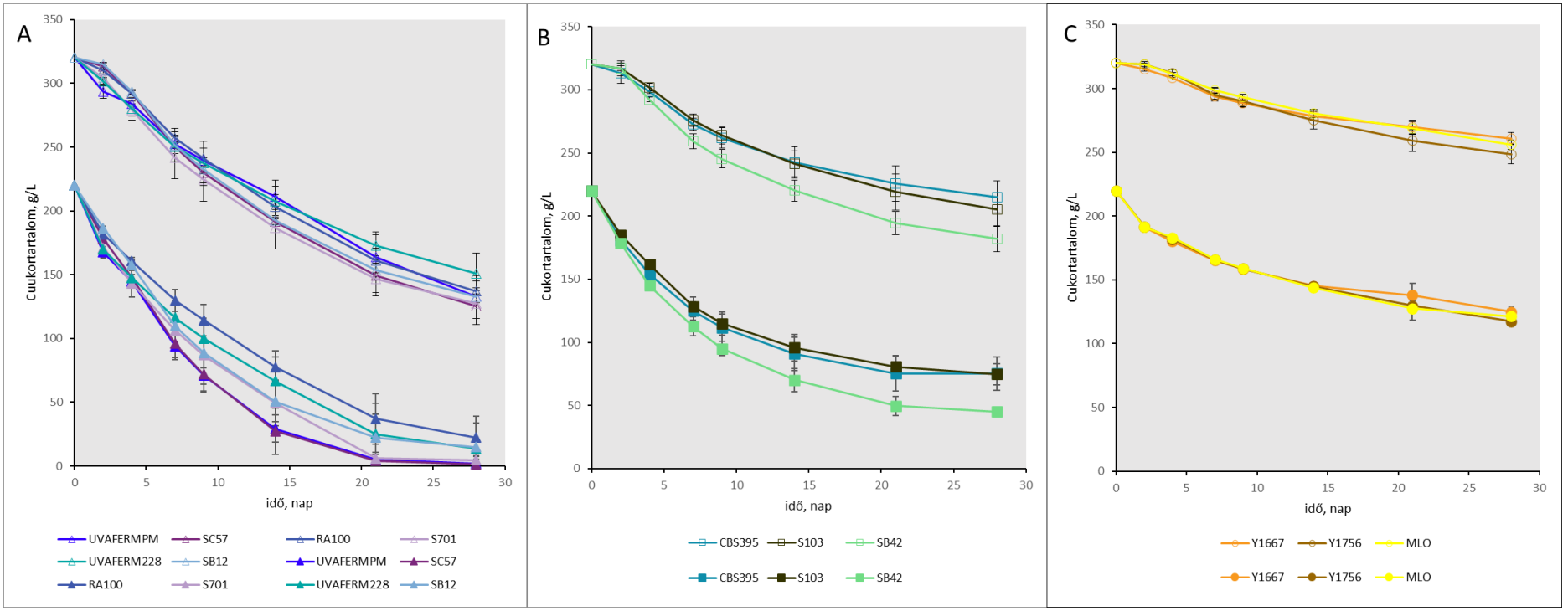
A dolgozat központi részét képezi a célzott, főként nem illékony erjedési anyagcseretermékek analízise, amiben három borélesztő faj, a *S. cerevisiae, S. uvarum* és *S. bacillaris* kiválasztott törzseinek növekvő ozmotikus stressz hatására módosuló metabolit profilját vizsgáltuk 28 nap fermentációt követően. A fajok és törzsek metabolitjait egymáshoz és önmagukhoz hasonlítom, majd egy többváltozós modellben értékelem a létrejött módosulást.

#### 4.3.2.1. Cukor fogyasztási dinamika

A vizsgált fajok cukorfogyasztási dinamikája a 20. ábrán látható. Az alacsonyabb kiindulási cukor koncentráció (220 g/L) esetén a megfigyelt periódus végén csak az UVAFERM®PM, SC57 és S701 *S. cerevisiae* törzsek voltak képesek a cukortartalmat kierjeszteni, az RA100, UVAFERM®228 és SB12 törzsek esetén kisebb mennyiségű cukor maradt a közegben (13,6-22,2 g/L). A 220 g/l cukortartalmat a szelektált *S. cerevisiae* borélesztő törzsek egy teljes érettségben levő szőlő mustjában még kierjesztik, a maradék cukor itt a modelloldat valamilyen szuboptimális tényezőjére utal, amit nem sikerült feltárnunk, de a kísérlet során az összes törzset azonos módon érinti, tehát szisztematikus hibának tekintjük, ami az összehasonlítást nem gátolja.

A vizsgált *S. uvarum* (45,1-75,3 g/L) és *S. bacillaris* törzsek (117,5-125,0 g/L) esetén számottevő a maradék cukor mennyisége. Az erjedési dinamika 220 g/L-en összhangban van az adott fajok előzetes karakterizálásával (Masneuf-Pomarede *et al*., 2010; Magyar és Tóth, 2011; Englezos *et al*., 2015).

Érdekes módon az extrém cukorkoncentráció (320 g/L) nem befolyásolta számottevően a cukorfogyasztás sebességét a *S. uvarum* és *S. bacillaris* törzsek esetén, a görbék hasonló lefutásúak, egy jelentős vertikális eltolódással, a 100 g/L-nyi cukortartalom különbség miatt, ami a számottevő maradék cukortartalomban nyilvánul meg (20. ábra). A 6 *S. cerevisiae* törzs maradék cukortartalmának terjedelme az alacsonyabb cukortartalom mellett mért értékek terjedelméhez hasonló (26 g/L). Az *S. uvarum* törzsek közül mindkét cukor fokozaton az SB42 bizonyult robosztusabbnak a másik két törzshöz képest, a *S. bacillaris* törzsek közt azonban minimális az fajon belüli variabilitás a cukor hasznosítás dinamikáját tekintve.




**20. ábra:** A vizsgált élesztő törzsek cukor fogyasztási dinamikája a kémiailag definiált modell mustban. A: *S. cerevisiae*. B: *S. uvarum*. C: *S. bacillaris*. Kitöltött szimbólumok: 220 g/L, üres szimbólumok: 320 g/L kiindulási cukortartalmat jelölnek. Az adatpontok háromszoros ismétlésű erjesztések átlagértékei szórással (n=3).

#### 4.3.2.2. Az extrém cukortartalom hatása a vizsgált metabolitokra

A borminőséget nagyban befolyásoló, fő erjedési metabolitok mellett számos kisebb koncentrációban termelődő 'minor' anyagcseretermékeknek is jelentősége van a borjelleg alakításában. Ezek közül a kísérletben vizsgált jelentősebb, nem illékony komponenseket az alábbi bekezdések taglalják. (A kis metabolit adatok jelentős százalékának detekciós limit (DL) alatti alakulása (illetve nem normális eloszlása) miatt elemzésük fajonként és cukorfokozatonként kereszttáblaelemzéssel történt.)

***Fő erjedési termékek***

A *S. bacillaris* korábbi vizsgálatokban leírt (Mills *et al*., 2002; Sipiczki 2003; Magyar és Tóth, 2011) erős fruktofíliája itt is megerősítést nyert, azonban ez a tulajdonság a kiindulási cukortartalom által nem befolyásolt paraméter, ezért az egyesével történő elemzésben nem részletezem, a többváltozós modellben azonban figyelembe veszem. Ezen karakter az élesztők esetén aránylag ritka, viszont bizonyos speciális erjesztési helyzetekben kiemelkedően értékes lehet, mint egy nem szokványos botrítiszes alapanyag erjesztése, vagy egy elakadt (fruktóz túlsúlyos) erjedés újraindítása. Az alábbiakban taglalt hozam mutatókhoz (1 g cukorból képzett mennyiségekhez) a közegben mérhető glükóz és fruktóz összegét használtam (13. táblázat).

A *S. bacillaris* törzsek használták a legtöbb cukrot 1 v/v%-nyi etanol termeléséhez, a *Saccharomyces* törzseknél számottevően többet (13. táblázat). A cukor által indukált változás csak a S701 törzs (*S. cerevisiae*) növekvő etanol termelésében nyilvánult meg szignifikánsan. Az extrém cukor koncentráción nem volt képes a 11 további vizsgált törzs számottevően magasabb alkohol képzésre, holott ehhez a kellő szubsztrát mennyiség elérhető lett volna, ugyanakkor az alábbi metabolit eredményekből látható, hogy a kedvezőtlen környezeti körülmények (nagy ozmózisnyomás) miatt nem az etanol, hanem más anyagcseretermék képzése felé tolódott a mérleg (pl. illósavtartalom, glicerintartalom). Az etanol kihozatalt tekintve a vizsgált *S. bacillaris* törzsek mindkét cukortartalmon elkülönülnek a *Saccharomyces* törzsektől, cukor előidézte számottevő változás a Y1667 és MLO törzseknél figyelhető meg, a mutató csökkenésének formájában.

A *S. bacillaris* törzsek glicerin termelése és kimondottan glicerin hozama számottevően magasabb mindkét cukortartalmon, mint a vizsgált *Saccharomyces* törzseké (12-13. táblázat). A vizsgált fajok korábbi munkákban leírt pozitív cukor-függő glicerin termelését jelen eredmények is megerősítik (pl. Magyar *et al*., 2008a; Rantsiou *et al*., 2017). Ha ezeket az erjedés végén mért eredményeket összevetjük a glicerin menedzsment (**4.3.1.** fejezet) vizsgálata során, a 72. órában (3. napon) kapott alacsony kibocsájtott értékekkel, látszólag ellentmondásba ütközünk. Ennek magyarázata az lehet, hogy a glicerin termelés dinamikája lényegesen eltér a *Saccharomyces* törzsekétől, a *Starmerella bacillaris* esetében ez folyamatos vagy az erjedés végén erősödik.

A *S. bacillaris* kiemelkedő glicerin képzése számottevően befolyásolhatja egy bor érzékszervi karakterét, és a kiindulási cukortartalomtól függetlenül értékes paraméter.

Az alkoholos erjedés fő egyensúlyát az etanol/glicerin arány is szemlélteti, ami minden vizsgált élesztő esetében jelentősen változott a kiindulási cukortartalom hatására (13. táblázat), azonban 2-4-szer magasabbnak mutatkozott a *S. bacillaris* törzseknél, mint a két *Saccharomyces* faj törzseinél. Következésképpen a *S. bacillaris* törzsek alkalmasak lehetnek nagy kiindulási cukortartalomból számottevő glicerin mennyiséget és csökkentett alkohol tartalmat képezni, ezáltal jobb bor harmónia érhető el szolgálva az általános fogyasztói ízlés alakulását. Ugyanakkor limitált erjesztési képessége miatt ezen faj valamely *Saccharomyces* élesztővel való kombinált alkalmazásával érhető el komplett erjedés. Quiros *et al.*, 2014; Englezos *et al*., 2016; Röcker *et al*., 2016; Lemos *et al.*, 2019) a *S. bacillaris* alkohol csökkentési potenciáljával bővebben a **4.4.** fejezet foglalkozik.

**12. táblázat:** A fő erjedési anyagcseretermékek a modell mustban 28 napot követően, 220 és 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén.

| Cukor konc. (g/L) | Faj | Törzs | Etanol (v/v%) | Glicerin(g/L) | Ecetsav (g/L) | Fogyasztott almasav (g/L) | Borostyánkősav (g/L) | Glükóz-fruktóz arány |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 220 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | (12,87±0,21)$^{d}$ | (4,67±0,25)$^{a}$* | (0,72±0,01)$^{c}$* | (0,69±0,12)$^{abcd}$ | (0,44±0,01)$^{c}$* | (0,28±0,15)$^{a}$ |
| | | Sc57 | (12,83±0,15)$^{d}$ | (4,67±0,47)$^{a}$* | (0,68±0,07)$^{bcd}$* | (0,56±0,20)$^{ab}$ | (0,32±0,01)$^{b}$ | (0,75±0,44)$^{a}$ |
| | | S701 | (12,57±0,23)$^{cd}$ | (5,13±0,25)$^{ab}$* | (0,78±0,02)$^{c}$* | (0,63±0,12)$^{abc}$ | (0,31±0,02)$^{ab}$ | (0,08±0,01)$^{a}$ |
| | | RA100 | (11,20±2,00)$^{cd}$ | (5,00±0,26)$^{ab}$* | (0,76±0,05)$^{cd}$* | (0,33±0,12)$^{a}$ | (0,25±0,05)$^{b}$ | (0,36±0,16)$^{a}$ |
| | | UVAFERM®228 | (11,60±1,25)$^{cd}$ | (4,93±0,76)$^{a}$* | (0,70±0,06)$^{cd}$* | (0,49±0,06)$^{ab}$ | (0,29±0,04)$^{ab}$ | (0,18±0,01)$^{a}$ |
| | | SB12 | (13,05±0,21)$^{cd}$ | (5,45±0,07)$^{ab}$* | (1,00±0,00)$^{d}$* | (0,46±0,00)$^{a}$ | (0,31±0,02)$^{a}$ | (0,46±0,29)$^{a}$ |
| | | **Átlag** | **(12,35±1,40)** | **(4,98±0,48)** | **(0,77±0,11)** | **(0,53±0,16)** | **(0,32±0,07)** | **(0,35±0,29)** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | (7,57±0,71)$^{bc}$ | (5,80±0,40)$^{ab}$* | (0,52±0,03)$^{b}$* | (0,73±0,06)$^{bcd}$* | (0,31±0,03)$^{b}$* | (0,39±0,07)$^{a}$ |
| | | S103 | (7,60±0,44)$^{bc}$ | (6,53±0,81)$^{abc}$* | (0,46±0,03)$^{b}$* | (0,59±0,06)$^{abc}$ | (0,26±0,05)$^{ab}$ | (0,39±0,04)$^{a}$ |
| | | SB42 | (9,87±0,46)$^{bc}$ | (5,43±0,38)$^{ab}$* | (0,28±0,01)$^{a}$* | (0,73±0,06)$^{bcd}$* | (0,27±0,04)$^{ab}$ | (0,20±0,02)$^{a}$ |
| | | **Átlag** | **(8,35±1,24)** | **(5,92±0,69)** | **(0,42±0,11)** | **(0,68±0,09)** | **(0,28±0,04)** | **(0,33±0,10)** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | (4,37±0,21)$^{a}$ | (7,77±0,70)$^{bc}$* | (0,79±0,14)$^{cd}$ | (0,86±0,10)$^{cde}$ | (0,35±0,02)$^{ab}$* | (4,92±1,06)$^{b}$ |
| | | Y1756 | (4,80±0,26)$^{a}$ | (7,77±0,23)$^{bc}$* | (0,74±0,08)$^{c}$* | (1,09±0,06)$^{e}$* | (0,40±0,03)$^{ab}$ | (5,77±1,40)$^{b}$ |
| | | MLO | (4,63±0,32)$^{a}$ | (7,40±0,56)$^{c}$* | (0,66±0,11)$^{bcd}$* | (0,96±0,10)$^{de}$* | (0,40±0,03)$^{ab}$* | (5,98±1,70)$^{b}$ |
| | | **Átlag** | **(4,60±0,30)** | **(7,64±0,50)** | **(0,73±0,11)** | **(0,97±0,13)** | **(0,39±0,03)** | **(5,56±1,31)** |
| | $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ | | 0.98 | 0,45 | 0,09 | 0,11 | n.s. | 0,57 |
| | $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ | | 1.14 | 0,52 | 0,11 | 0,13 | n.s. | 0,65 |

12. táblázat folytatás

| Cukor konc. (g/L) | Faj | Törzs | Etanol (v/v%) | Glicerin(g/L) | Ecetsav (g/L) | Fogyasztott almasav (g/L) | Borostyánkősav (g/L) | Glükóz-fruktóz arány |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 320 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | $(11{,}33\pm1{,}27)^{BCD}$ | $(9{,}00\pm0{,}26)^{A}$* | $(1{,}23\pm0{,}06)^{C}$* | $(0{,}53\pm0{,}06)^{A}$ | $(0{,}35\pm0{,}05)^{ABC}$ | $(0{,}46\pm0{,}05)^{A}$ |
| | | Sc57 | $(14{,}27\pm1{,}16)^{D}$ | $(8{,}73\pm0{,}15)^{A}$* | $(1{,}30\pm0{,}00)^{C}$* | $(0{,}36\pm0{,}10)^{A}$ | $(0{,}30\pm0{,}02)^{A}$ | $(0{,}47\pm0{,}03)^{A}$ |
| | | S701 | $(13{,}57\pm0{,}42)^{D}$* | $(9{,}63\pm0{,}35)^{A}$* | $(1{,}63\pm0{,}06)^{D}$* | $(0{,}49\pm0{,}06)^{A}$ | $(0{,}30\pm0{,}02)^{A}$ | $(0{,}34\pm0{,}03)^{A}$ |
| | | RA100 | $(13{,}17\pm0{,}64)^{D}$ | $(8{,}37\pm0{,}35)^{A}$* | $(1{,}30\pm0{,}10)^{BCD}$* | $(0{,}29\pm0{,}12)^{A}$ | $(0{,}22\pm0{,}00)^{AB}$ | $(0{,}61\pm0{,}03)^{A}$ |
| | | UVAFERM®228 | $(11{,}53\pm2{,}78)^{ABC}$ | $(8{,}20\pm0{,}56)^{A}$* | $(1{,}30\pm0{,}20)^{BCD}$* | $(0{,}59\pm0{,}15)^{A}$ | $(0{,}27\pm0{,}05)^{AB}$ | $(0{,}44\pm0{,}09)^{A}$ |
| | | SB12 | $(13{,}27\pm0{,}29)^{CD}$ | $(10{,}57\pm0{,}15)^{CDE}$ | $(1{,}80\pm0{,}00)^{D}$* | $(0{,}43\pm0{,}06)^{A}$ | $(0{,}27\pm0{,}02)^{AB}$ | $(0{,}41\pm0{,}02)^{A}$ |
| | | **Átlag** | **(12,86±1,59)** | **(9,08±0,88)** | **(1,43±0,23)** | **(0,45±0,13)** | **(0,28±0,05)** | **(0,46±0,09)** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | $(6{,}50\pm1{,}22)^{AB}$ | $(8{,}30\pm0{,}35)^{AB}$* | $(0{,}86\pm0{,}00)^{ABC}$* | $(0{,}49\pm0{,}06)^{A}$* | $(0{,}21\pm0{,}02)^{BC}$* | $(0{,}69\pm0{,}05)^{A}$ |
| | | S103 | $(8{,}10\pm1{,}25)^{ABC}$ | $(8{,}63\pm1{,}01)^{A}$* | $(0{,}74\pm0{,}01)^{A}$* | $(0{,}53\pm0{,}06)^{A}$ | $(0{,}21\pm0{,}03)^{AB}$ | $(0{,}57\pm0{,}06)^{A}$ |
| | | SB42 | $(10{,}20\pm0{,}78)^{BCD}$ | $(9{,}03\pm0{,}76)^{AC}$* | $(0{,}67\pm0{,}02)^{A}$* | $(0{,}46\pm0{,}00)^{A}$* | $(0{,}26\pm0{,}03)^{C}$ | $(0{,}45\pm0{,}03)^{A}$ |
| | | **Átlag** | **(8,27±1,87)** | **(8,66±0,73)** | **(0,75±0,08)** | **(0,49±0,05)** | **(0,23±0,04)** | **(0,57±0,11)** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | $(3{,}83\pm0{,}32)^{A}$ | $(11{,}50\pm0{,}78)^{BDE}$ | $(1{,}04\pm0{,}14)^{C}$ | $(0{,}69\pm0{,}15)^{A}$ | $(0{,}29\pm0{,}02)^{BC}$* | $(2{,}21\pm0{,}16)^{B}$ |
| | | Y1756 | $(4{,}90\pm0{,}36)^{A}$ | $(11{,}97\pm1{,}51)^{BE}$* | $(1{,}23\pm0{,}25)^{BCD}$* | $(0{,}66\pm0{,}17)^{A}$* | $(0{,}35\pm0{,}05)^{C}$ | $(2{,}79\pm0{,}46)^{B}$ |
| | | MLO | $(4{,}23\pm0{,}29)^{A}$ | $(10{,}93\pm1{,}04)^{BCD}$ | $(0{,}85\pm0{,}01)^{ABC}$* | $(0{,}49\pm0{,}06)^{A}$* | $(0{,}31\pm0{,}04)^{BC}$* | $(2{,}39\pm0{,}16)^{B}$ |
| | | **Átlag** | **(4,32±0,54)** | **(11,47±1,09)** | **(1,04±0,23)** | **(0,62±0,15)** | **(0,32±0,04)** | **(2,46±0,37)** |
| | $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ | | 1,24 | 0,75 | 0,17 | n.s. | n.s. | 0,17 |
| | $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ | | 1,43 | 0,87 | 0,20 | n.s. | n.s. | 0,19 |

A cellákban a törzsek háromszoros ismétléseinek átlag értékei és szórásuk szerepel (n=3), a vastagon szedett értékek a faj átlagok és szórásuk ($n_{S. cerevisiae}$=18; $n_{S. uvarum}$ és *S. bacillaris*=9). Games-Howell post hoc elemzés alapján az egy oszlopon belüli értékek statisztikailag különböznek ($p<0.05$): a kis betűk 220 g/L cukortartalomra vonatkoznak; a nagy betűk 320 g/L cukortartalomra vonatkoznak; a csillag cukor indukált változást jelzi. $LSD_{5\%}$ a legkisebb szignifikáns differenciát jelöli a faj átlagok közt. $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ *S. cerevisiae* és a másik két faj közt; $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ *S. uvarum* és *S. bacillaris* között. n.s.=nem szignifikáns.

**13. táblázat:** A fő erjedési anyagcsertermékek kihozatala (1 g felhasznált cukorra számított mennyisége) a model mustban 28 napot követően, 220 és 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén.

| Cukor konc. (g/L) | Faj | Törzs | Y(etanol)(g/g) | 1v/v% etanolhoz felh. cukor (g) | Y(glicerin)/(g/g) | Y(glicerin/ etanol)/(g/g) | Y(illósav)/(mg/ g) | Y(borostyánkősav)/(g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 220 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | (0,47±0,01)$^{c}$ | (16,94±0,24)$^{a}$ | (0,02±0,00)$^{a}$* | (0,05±0,00)$^{a}$* | (3,29±0,04)$^{b}$ | (2,01±0,02)$^{b}$* |
| | | Sc57 | (0,46±0,01)$^{c}$ | (17,05±0,26)$^{a}$ | (0,02±0,00)$^{a}$* | (0,05±0,00)$^{a}$* | (3,09±0,34)$^{bc}$ | (1,47±0,04)$^{a}$ |
| | | S701 | (0,46±0,01)$^{bc}$ | (17,08±0,29)$^{a}$ | (0,02±0,00)$^{a}$* | (0,05±0,01)$^{a}$* | (3,65±0,10)$^{bc}$* | (1,58±0,11)$^{ab}$ |
| | | RA100 | (0,45±0,07)$^{c}$ | (17,72±3,00)$^{a}$ | (0,03±0,00)$^{ab}$* | (0,06±0,01)$^{ab}$* | (3,93±0,34)$^{b}$ | (1,44±0,21)$^{ab}$ |
| | | UVAFERM®228 | (0,44±0,04)$^{bc}$ | (18,18±1,87)$^{a}$ | (0,02±0,00)$^{a}$* | (0,05±0,00)$^{ab}$* | (3,35±0,25)$^{b}$* | (1,39±0,16)$^{a}$ |
| | | SB12 | (0,47±0,01)$^{c}$ | (16,75±0,22)$^{a}$ | (0,03±0,00)$^{a}$* | (0,05±0,00)$^{ab}$* | (4,58±0,01)$^{c}$* | (1,40±0,11)$^{a}$* |
| | | **Átlag** | **(0,46±0,03)** | **(17,28±1,32)** | **(0,02±0,00)** | **(0,05±0,01)** | **(3,65±0,86)** | **(1,55±0,25)** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | (0,42±0,01)$^{b}$ | (18,91±0,43)$^{a}$ | (0,04±0,00)$^{c}$* | (0,10±0,00)$^{c}$* | (3,64±0,11)$^{bc}$* | (2,15±0,01)$^{b}$* |
| | | S103 | (0,42±0,01)$^{bc}$ | (18,83±0,66)$^{a}$ | (0,05±0,00)$^{c}$* | (0,11±0,01)$^{c}$* | (3,20±0,20)$^{b}$ | (1,84±0,25)$^{ab}$ |
| | | SB42 | (0,45±0,02)$^{bc}$ | (17,75±0,83)$^{a}$ | (0,03±0,00)$^{b}$* | (0,07±0,00)$^{b}$* | (1,61±0,05)$^{a}$ | (1,54±0,22)$^{ab}$ |
| | | **Átlag** | **(0,43±0,02)** | **(18,50±0,77)** | **(0,04±0,01)** | **(0,09±0,02)** | **(2,82±0,93)** | **(1,84±0,32)** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | (0,34±0,01)$^{a}$* | (23,13±0,43)$^{b}$* | (0,08±0,00)$^{d}$* | (0,23±0,02)$^{d}$* | (7,78±1,10)$^{e}$ | (3,50±0,06)$^{c}$* |
| | | Y1756 | (0,35±0,01)$^{a}$ | (22,80±0,87)$^{b}$ | (0,07±0,00)$^{d}$* | (0,21±0,01)$^{d}$* | (6,73±0,57)$^{de}$ | (3,66±0,23)$^{c}$* |
| | | MLO | (0,34±0,02)$^{a}$* | (22,91±1,12)$^{b}$* | (0,07±0,00)$^{d}$* | (0,20±0,00)$^{d}$* | (6,25±0,85)$^{d}$ | (3,80±0,17)$^{c}$* |
| | | **Átlag** | **(0,34±0,01)** | **(22,95±0,76)** | **(0,07±0,00)** | **(0,21±0,01)** | **(6,92±1,01)** | **(3,65±0,19)** |
| | $LSD_{5\%S.c\text{-}other}$ | | 0,02 | 0,91 | 0,01 | 0,01 | 0,76 | 0,21 |
| | $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ | | 0,02 | 1,05 | 0,01 | 0,01 | 0,88 | 0,24 |

13. táblázat folytatás

| Cukor konc. (g/L) | Faj | Törzs | Y(etanol)(g/g) | 1% etanolhoz felh. cukor (g) | Y(glicerin)/(g/g) | Y(glicerin/ etanol)/(g/g) | Y(illósav)/(mg/ g) | Y(borostyánkősav)/ (g/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 320 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | $(0,45\pm0,01)^{A}$ | $(17,46\pm0,52)^{AB}$ | $(0,05\pm0,00)^{A}*$ | $(0,10\pm0,01)^{AB}*$ | $(6,26\pm0,31)^{BCD}$ | $(1,75\pm0,10)^{CD}*$ |
| | | Sc57 | $(0,49\pm0,01)^{A}$ | $(16,27\pm0,35)^{A}$ | $(0,04\pm0,00)^{A}*$ | $(0,08\pm0,01)^{A}*$ | $(5,62\pm0,36)^{BC}$ | $(1,28\pm0,03)^{ABC}$ |
| | | S701 | $(0,46\pm0,01)^{A}$ | $(17,08\pm0,22)^{AB}$ | $(0,04\pm0,00)^{A}*$ | $(0,09\pm0,00)^{A}*$ | $(7,05\pm0,32)^{CD}*$ | $(1,29\pm0,08)^{AB}$ |
| | | RA100 | $(0,47\pm0,01)^{A}$ | $(16,67\pm0,50)^{A}$ | $(0,04\pm0,00)^{A}*$ | $(0,08\pm0,01)^{A}*$ | $(5,95\pm0,80)^{BCD}$ | $(1,00\pm0,07)^{A}$ |
| | | UVAFERM®228 | $(0,47\pm0,10)^{A}$ | $(17,34\pm3,58)^{AB}$ | $(0,04\pm0,00)^{A}*$ | $(0,09\pm0,02)^{AB}*$ | $(6,71\pm0,86)^{BCD}*$ | $(1,37\pm0,21)^{AB}$ |
| | | SB12 | $(0,46\pm0,00)^{AB}$ | $(17,06\pm0,08)^{AB}$ | $(0,05\pm0,00)^{AB}*$ | $(0,10\pm0,00)^{AB}*$ | $(7,96\pm0,13)^{DE}*$ | $(1,20\pm0,06)^{AB}*$ |
| | | **Átlag** | **(0,47±0,04)** | **(16,98±1,33)** | **(0,04±0,00)** | **(0,09±0,01)** | **(6,59±0,91)** | **(1,32±0,25)** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | $(0,38\pm0,05)^{C}$ | $(21,28\pm2,66)^{B}$ | $(0,06\pm0,00)^{C}*$ | $(0,17\pm0,03)^{B}*$ | $(6,29\pm0,40)^{BCD}*$ | $(1,56\pm0,10)^{BC}*$ |
| | | S103 | $(0,40\pm0,03)^{BC}$ | $(19,75\pm1,33)^{AB}$ | $(0,05\pm0,00)^{BC}*$ | $(0,14\pm0,00)^{B}*$ | $(4,70\pm0,46)^{AB}$ | $(1,34\pm0,09)^{ABC}$ |
| | | SB42 | $(0,45\pm0,03)^{ABC}$ | $(17,44\pm1,15)^{AB}$ | $(0,05\pm0,00)^{ABC}*$ | $(0,11\pm0,01)^{AB}*$ | $(3,76\pm0,10)^{A}$ | $(1,49\pm0,19)^{ABC}$ |
| | | **Átlag** | **(0,41±0,05)** | **(19,49±2,31)** | **(0,06±0,01)** | **(0,14±0,03)** | **(4,92±1,15)** | **(1,46±0,15)** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | $(0,27\pm0,03)^{D}*$ | $(29,19\pm2,63)^{C}*$ | $(0,10\pm0,00)^{D}*$ | $(0,38\pm0,01)^{C}*$ | $(9,37\pm1,39)^{E}$ | $(2,62\pm0,24)^{D}*$ |
| | | Y1756 | $(0,30\pm0,03)^{D}$ | $(25,30\pm0,54)^{C}$ | $(0,10\pm0,00)^{D}*$ | $(0,33\pm0,03)^{C}*$ | $(9,90\pm1,52)^{E}$ | $(2,79\pm0,29)^{D}*$ |
| | | MLO | $(0,30\pm0,00)^{D}*$ | $(26,23\pm0,42)^{C}*$ | $(0,10\pm0,00)^{D}*$ | $(0,33\pm0,02)^{C}*$ | $(7,64\pm0,84)^{DE}$ | $(2,80\pm0,21)^{D}*$ |
| | | **Átlag** | **(0,29±0,03)** | **(26,90±2,22)** | **(0,10±0,01)** | **(0,34±0,03)** | **(8,97±1,51)** | **(2,74±0,23)** |
| | $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ | | 0,03 | 1,53 | 0,01 | 0,02 | 0,95 | 0,19 |
| | $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ | | 0,04 | 1,77 | 0,01 | 0,02 | 1,09 | 0,22 |

A cellákban a törzsek háromszoros ismétléseinek átlag értékei és szórásuk szerepel (n=3), a vastagon szedett értékek a faj átlagok és szórásuk ($n_{S. cerevisiae}$=18; $n_{S. uvarum}$ és *S. bacillaris*=9). Games-Howell post hoc elemzés alapján az egy oszlopon belüli értékek statisztikailag különböznek ($p<0.05$): a kis betűk 220 g/L cukortartalomra vonatkoznak; a nagy betűk 320 g/L cukortartalomra vonatkoznak; a csillag cukor indukált változást jelzi. $LSD_{5\%}$ a legkisebb szignifikáns differenciát jelölik a faj átlagok közt. $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ *S. cerevisiae* és a másik két faj közt; $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ *S. uvarum* és *S. bacillaris* között. n.s.=nem szignifikáns.

***Szerves savak***

A *S. cerevisiae* fajra jellemző az ecetsavtermelés cukor-függő természete, ami komoly problémát okozhat egyes édes borkülönlegességek készítése során (pl. Ribereau Gayon *et al*., 2006). Ezzel szemben a *S. uvarum* egyik előnye az alacsony illósav képzés, illetve egyes törzsek esetén annak mérsékelt cukorfüggő mivolta (Magyar *et al*., 2008a). Rantsiou és munkatársai (2017) a *S. bacillaris* ecetsav termelését hasonló kiindulási cukor koncentráció tartományon (200-335 g/L) a cukortartalomtól függetlennek, főként az idő függvényében változóként írta le. Ezzel szemben a jelen vizsgálatban megfigyelt Y1756 és MLO törzsek illósav termelése számottevően nőtt a magasabb cukor fokozaton (12. táblázat). A cukor indukálta változás az SB42 és S103 *S. uvarum* törzseknél volt a legalacsonyabb, a CBS395 a *S. bacillaris*-okkal összevethető mértékben változott, ezt követi a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek változása. A *S. bacillaris* ecetsav termelése az irodalomban ellentmondásos, ami részben törzsfüggéssel magyarázható, de jórészt az elerjesztett cukor kisebb mennyiségével, ami fajlagosan nagyobb hozamot eredményez. Kísérleteimben a 3 faj ecetsavtermelése hasonló mértékű, azonban a *S. bacillaris* ecetsav hozama kiemelkedően magas. Ez a faj limitált erjesztési képessége miatt nem problematikus, hiszen ipari léptékben a teljes erjedéshez egy *Saccharomyces* élesztővel kombinálva ajánlatos alkalmazni (Nisiotou *et al*., 2018; Englezos *et al*., 2018b,c).

A kísérleti körülmények között minden vizsgált törzs esetén almasav fogyasztás volt megfigyelhető mindkét cukor fokozaton. Az ozmotikus stressz okozta változás a *S. uvarum* CBS395, SB42, *S. bacillaris* Y1756 és MLO törzseknél volt jelentős, ami a felhasznált almasavban való csökkenést jelentett (12. táblázat). A *S. bacillaris* negatív cukor függő almasav hasznosítását Rantsiou és munkatársai (2017) is megerősítették.

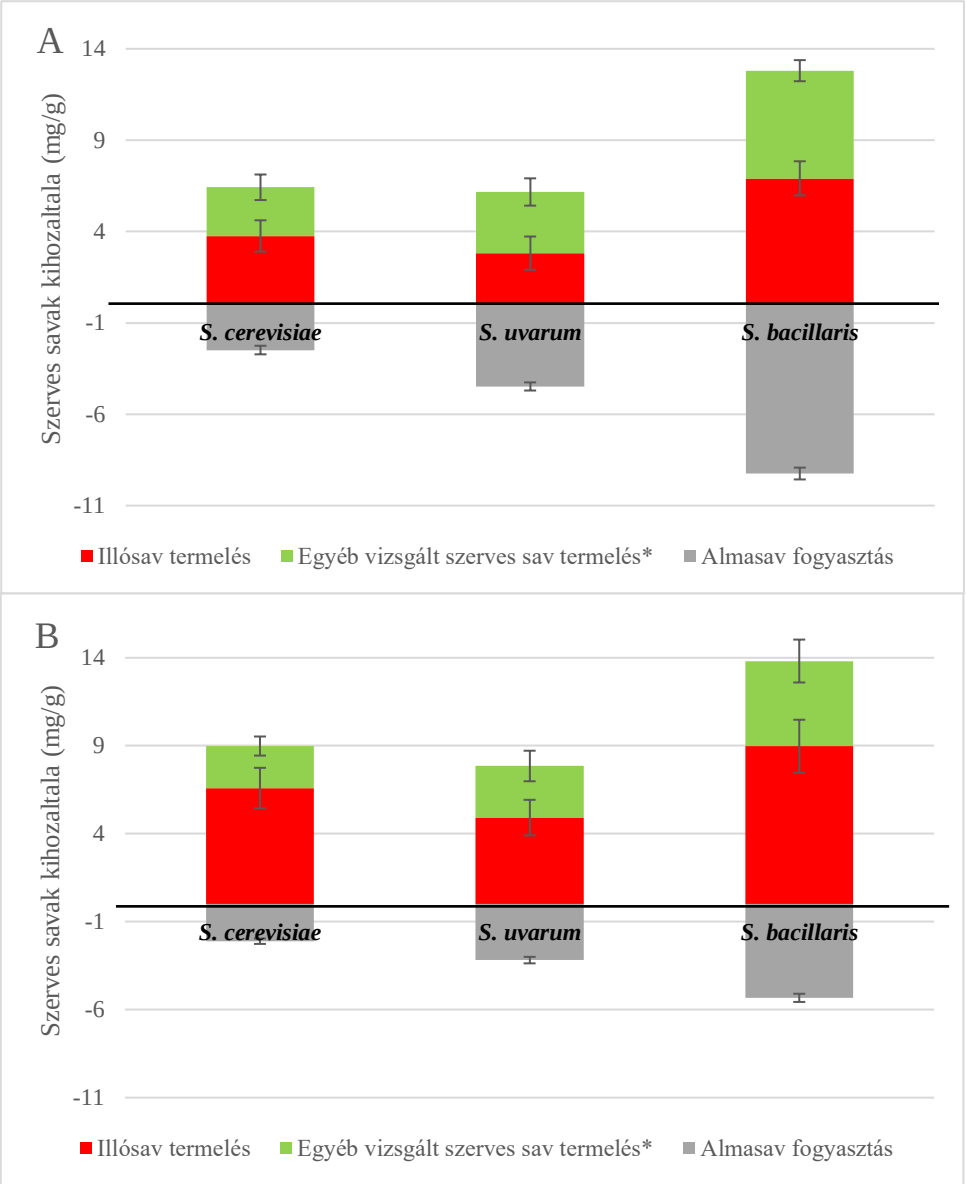
A törzsek borostyánkősav termelése borászati viszonylatban alacsonynak bizonyult mindkét cukor fokozaton (szokásos tartomány borélesztőknél 0,5-2,0 g/L; Radler, 2003). A *S. bacillaris* törzsek borostyánkősav hozama számottevően magasabb a két *Saccharomyces* faj törzseinél a 220 és 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén is. Az Y1667 és MLO (*S. bacillaris*), UVAFERM®PM (*S. cerevisiae*), és CBS395 (*S. uvarum*) borostyánkősav termelését negatívan befolyásolja az emelkedő kiindulási cukortartalom.

Az alkoholos erjedés során keletkező piroszőlősav és fumársav a kierjedt borok szerves savtartalmának alkotója, jellemzően kis koncentrációban vannak jelen (Radler, 2003). Az alacsonyabb cukor fokozaton a *S. bacillaris* törzsek nagyon hasonló mennyiségű piroszőlősavat termeltek, ami kis mértékben növekedett a 320g/L esetén. A *Saccharomyces* fajoknál a termelés átlaga nem változott jelentős mértékben, azonban egyes törzsek termelése igen, sőt az UVAFERM®PM, UVAFERM®228 és CBS395 csak 320 g/L esetén bocsátott piroszőlősavat a közegbe (14. táblázat). Két törzs (S701, SB42) nem termelt kimutatható piroszőlősav mennyiséget.

A fumársavat a vizsgált 6 *S. cerevisiae* törzs nem termelte kimutatható mértékben (DL: 5 mg/L) egyik cukortartalmon sem, míg a vizsgált *S. uvarum* törzsek termelése negatív cukorfüggésűnek adódott. A *S. bacillaris* Y1667 törzs csak 220 g/L-en termelt fumársavat, a másik két törzs termelése nem változott a cukor függvényében. A faj átlagokat tekintve a *S. uvarum* fumársav metabolizmusa magasabb 220 g/L-en a *S. bacillaris*-nál, azonban 320 g/L-en nincs különbség köztük.

220 g/L-en a fajok piroszőlősav és fumársav termelési tendenciája alátámasztja Magyar és munkatársai (2014) megfigyeléseit (100 g/L kiindulási cukortartalom, minimál média, ammónium/glutaminsav N-forrás). Azonban az Englezos és munkatársai (2018a) által vizsgált két *S. bacillaris* törzshöz képest (230 g/L kiindulási cukortartalom, szintetikus must közeg, 200 mg/L összetett N-forrás) jelentősen alacsonyabb mértékben képezték mindkét savat a jelen munkában megfigyelt törzsek. Ebből következtethetünk arra, hogy van, akár számottevő, fajon belüli variabilitás piroszőlősav és fumársav termelés szempontjából fajon belül. A magasabb cukor tartományban detektált változásról jelenleg nincs elérhető irodalmi eredmény összehasonlítás céljából.

Egyes nem-*Saccharomyces* élesztők alkalmazási előnye a savharmónia javítása a termelt nettó szerves savak által, ami bizonyos 'savszegény' évjáratokban kiemelkedően fontos lehet az érzékszervi harmónia eléréséhez. Az összes vizsgált szerves sav cukor hasznosítás függvényében történő alakulását a 21. ábra szemlélteti. A *S. bacillaris* esetén a cukortartalom növekedésével jelentősen növekszik az összes sav metabolizmusa (illósav és egyéb szerves savtermelés, almasav fogyasztás), míg a *Saccharomyces*-ek esetén csak kis mértékben növekszik (21. ábra). A vizsgált *S. bacillaris* törzsek korlátozottan lehetnek alkalmasak savtartalom növelésre, mivel ugyan a nettó szerves sav termelésük számottevően magasabb a *Saccharomyces*-eknél mindkét cukor fokozaton, azonban negatív cukorfüggő almasav felhasználásuk jelentős. Továbbá kombinált erjesztés során ezen tulajdonságok megnyilvánulása függhet pl. a *S. bacillaris* rész populáció érvényesülésétől az erjedés során, a teljes mikrobaközösséget alkotó élesztők szinergens/antagonista együttműködésétől is.




**21. ábra:** A vizsgált metabolizált szerves savtartalom alakulása. A: 220 g/L kiindulási cukortartalom, B: 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén. *borostyánkősav, piroszőlősav, fumársav, D- és L-tejsav. A fekete vízszintes vonal a 0,0 g/L értéket jelöli.

**Minor metabolitok**

A magasabb rendű alkoholok közül a 2,3-butándiol és az acetoin termelés is jelentősen különbözött a vizsgált fajok esetén. A *Saccharomyces*-ek mindkét cukor fokozaton jelentősen magasabb koncentrációban termelték a 2,3-butándiolt, aminek mennyisége pozitívan változik a cukortartalom növekedésével, míg a *S. bacillaris*-nál nem volt jelentős változás a kiindulási cukortartalom függvényében. Ezzel ellentétesen a *S. bacillaris* acetoin termelése kiemelkedő mindkét cukorfokozaton ellensúlyozva az alacsony 2,3-butándiol termelését (mely két komponens reverzibilisen egymásba képes alakulni egy enzimes katalízissel az intracelluláris térben, ugyanakkor egymástól független termelésük is lehetséges). A *S. bacillaris* acetoin termelése

jelentősen meghaladja a borokban általánosan mérhető <80 mg/L-es tartományt, de nem éri el az érzékszervi küszöböt (150 mg/L; Romano et al., 1994). Szekunder metabolitként mindkét molekula a borjelleg kialakításában vesz részt, érzékszervi jelentőségük ezen koncentráció tartományban nem számottevő.

Az acetaldehid az alkoholos erjedés köztes terméke, kis mennyiségben a fermentléből is detektálható, általában 20-80 mg/L koncentrációban (Zamora, 2014), amely tartományban minimális az érzékszervi jelentősége. A kiindulási cukortartalom függvényében mindhárom faj esetén nőtt a termelés, az UVAFERM®PM, SC57, S701, Y1667 és MLO törzseknél csak a magasabb cukor fokozaton sikerült detektálni. A *S. bacillaris* törzsek nem mutatnak eltérést ebből a szempontból a vizsgált *Saccharomyces*-ektől (14. táblázat).

A fent említettek mellett több metabolit (pl. citromsav, D-és L-tejsav, metanol, 2-metil propanol, 3-metil butanol, 2-3-propándiol, etil acetát, etil laktát, hangyasav, 4-aminovajsav) koncentrációja állandó volt, illetve minimálisan változott, az adott mérési módszer ($H^1$ NMR) magas detekciós limitje esetén, és nem adódott különbség sem törzsek, fajok vagy cukortartalom szerint.

Továbbá a táblázatokban nem szerepel a 2-feniletanol, ami egy értékes, rózsa illatért felelős komponens, valamint a *S. cerevisiae* esetén quorum sensing molekulaként azonosított, tehát az alkoholos erjedés során kiemelkedő jelentőségű lehet. Az *S. uvarum*-ot korábban magas 2-fenil-etanol termelőként írták le (pl. Benito *et al*., 2016). Jelen vizsgálatban csak az SB42 és S103 törzsek termelték a detekciós limit (25 mg/L) feletti koncentrációban (csupán néhány mg-mal magasabb koncentrációban), aminek mennyisége nem változott a kiindulási cukortartalom függvényében. Ugyanakkor az $H^1$ NMR mérési módszer nem kimondottan alkalmas kis koncentrációjú illékony komponensek vizsgálatára, valamint pl. a 2-fenil-etanol érzékelési küszöbe sem kellően alacsony. Azonban a minták egy részének igen magas maradék cukortartalma miatt a GC-vel történő illó metabolit vizsgálatok akadályba ütköztek (félő volt a számottevő maradék cukor a minta-párologtatóba való beleégése).

**14. táblázat:** Nem illékony kis metabolitok a modell mustban 28 napot követően, 220 és 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén.

| Cukor konc g/L | Faj | Törzs | Fumársav (mg/L) | Piroszőlősav (mg/L) | Butándiol (mg/L) | Acetoin (mg/L) | Acetaldehid (mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 220 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | N.D. | N.D. | (586,00±54,69) | N.D. | N.D. |
| | | SC57 | N.D. | (19,67±12,12) | (548,00±27,84) | N.D. | N.D. |
| | | RA100 | N.D. | (48,00±10,15) | (442,67±103,02) | (22,67±10,41) | (12,33±8,33) |
| | | S701 | N.D. | N.D. | (538,67±36,35) | (10,00±6,93) | N.D. |
| | | UVAFERM®228 | N.D. | N.D. | (483,33±86,95) | (12,67±8,50) | (9,33±5,77) |
| | | SB12 | N.D. | (33,67±15,31) | (549,67±174,77) | (18,00±2,78) | (11,67±9,81) |
| | | **Átlag** | **N.D.** | **(26,39±21,00)$^{a}$** | **(524,72±93,40)$^{a*}$** | **(13,56±12,02)$^{a}$** | **(10,06±6,04)$^{a*}$** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | (8,00±0,00) | N.D. | (533,00±97,28) | (71,00±18,73) | (19,00±4,24) |
| | | S103 | (5,33±3,46) | (30,00±5,57) | (623,00±119,49) | (41,53±23,62) | (16,33±0,58) |
| | | SB42 | (9,33±0,58) | N.D. | (553,67±87,32) | (14,00±0,00) | (10,33±6,35) |
| | | **Átlag** | **(7,50±3,16)$^{a}$** | **(22,67±15,26)$^{a}$** | **(569,89±97,51)$^{a*}$** | **(42,18±28,92)$^{b}$** | **(14,75±6,52)$^{b*}$** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | (5,00±3,21) | (29,67±3,21) | N.D. | (139,67±29,28) | N.D. |
| | | Y1756 | (5,50±0,71) | (26,00±1,41) | N.D. | (106,50±6,36) | (12,50±11,31) |
| | | MLO | (5,33±6,61) | (27,67±1,53) | (105,67±68,70) | (131,00±33,45) | N.D. |
| | | **Átlag** | **(5,33±2,60)$^{b}$** | **(27,89±2,37)$^{b*}$** | **(101,22±39,67)$^{b}$** | **(127,22±26,01)$^{c}$** | **(9,89±5,93)$^{a*}$** |

14. táblázat folytatás

| Cukor konc g/L | Faj | Törzs | Fumársav (mg/L) | Piroszőlősav (mg/L) | Butándiol (mg/L) | Acetoin (mg/L) | Acetaldehid (mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 320 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | N.D. | (20,33±13,28) | (983,67±124,12) | (34,33±7,77) | (15,67±4,04) |
| | | SC57 | N.D. | (27,33±3,21) | (985,33±99,43) | (22,33±4,73) | (10,00±6,93) |
| | | RA100 | N.D. | (46,00±4,58) | (964,67±20,79) | (37,67±3,51) | (14,67±10,12) |
| | | S701 | N.D. | N.D. | (840,00±22,72) | (22,67±4,73) | (10,00±6,93) |
| | | UVAFERM®228 | N.D. | (24,00±15,21) | (589,00±152,54) | (25,67±7,23) | (11,67±8,08) |
| | | SB12 | N.D. | (34,00±2,65) | (1020,67±71,28) | (32,33±5,77) | (11,00±7,00) |
| | | **Átlag** | **N.D.** | **(28,44±17,60)$^{AB}$** | **(897,22±173,05)$^{A}$*** | **(29,17±7,81)$^{A}$** | **(12,17±7,53)$^{A}$*** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | (5,00±3,21) | (26,67±3,06) | (522,00±192,29) | (35,10±7,39) | (29,67±6,11) |
| | | S103 | (5,00±0,00) | (25,33±3,21) | (855,67±227,85) | (69,33±22,81) | (19,33±3,79) |
| | | SB42 | (6,67±0,58) | N.D. | (806,00±150,25) | (21,33±1,53) | (9,33±5,77) |
| | | **Átlag** | **(5,56±2,09)$^{A}$** | **(23,67±13,20)$^{A}$** | **(727,89±228,41)$^{A}$*** | **(41,92±24,55)$^{A}$** | **(19,44±12,38)$^{B}$*** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | N.D. | (32,67±2,52) | (109,67±75,63) | (159,00±25,87) | (16,67±0,58) |
| | | Y1756 | (5,67±0,58) | (36,67±6,81) | (140,67±34,63) | (142,33±25,79) | (14,33±1,15) |
| | | MLO | (6,67±0,58) | (43,33±3,21) | (101,33±61,20) | (137,00±32,08) | (13,67±1,53) |
| | | **Átlag** | **(5,44±3,14)$^{AB}$** | **(37,56±6,13)$^{B}$*** | **(117,22±72,41)$^{B}$** | **(146,11±26,26)$^{B}$** | **(14,89±1,69)$^{A}$*** |

A cellákban a törzsek háromszoros ismétléseinek átlag értékei és szórásuk szerepel (n=3), a vastagon szedett értékek a faj átlagok és szórásuk ($n_{S. cerevisiae}$=18; $n_{S. uvarum \text{ és } S. bacillaris}$=9). Kereszttábla elemzés alapján kis betűvel jelölve: az adott fajok közt szignifikáns különbség ($p<0.05$) 220 g/L cukor esetén, nagy betűvel jelölve: az adott fajok közt szignifikáns különbség ($p<0.05$) 320 g/L cukor esetén, a csillag a cukor indukált változást jelöli. Detekciós limitek: acetoin 10 mg/L, fumársav 5 mg/L, piroszőlősav 20 mg/L, butándiol 100 mg/L, acetaldehid 10 mg/L.

#### 4.3.2.3. Nitrogén hasznosítás

Egy faj és ipari jelentőségű törzseinek nitrogén igénye meghatározó borászati szempontból és még hangsúlyosabb a nem-*Saccharomyces* fajok esetén, ahol túlnyomó részt kombinált üzemi léptékű alkalmazás fordul elő. Oligo/multi kultúrás erjesztésnél versengés, szinergizmus és antagonizmus is előfordulhat a limitált asszimilálható nitrogén forrásért (Henschke és Jiranek, 2003; Brice *et al*., 2018), amely mechanizmusok leírása az elmúlt években kezdődött (pl. Gobert *et al*., 2017; Rollero *et al*., 2018) és jelenleg is folyik. Extrém cukortartalmú közegekben még hangsúlyosabb a megfelelő YAN a sikeres és teljes erjesztéshez (Vilanova *et al*., 2007). Vizsgálataimban nyomon követtem az összes asszimilálható nitrogén (YAN) mennyiségét, valamint lehetőségeim szerint néhány aminosav egyenkénti metabolizmusát is.

A modell must egy jól beérett szőlő YAN mennyiségét (300 mg/L) és minőségi összetételét utánozta, a minimális fermentációhoz szükséges szint (150-200 mg/L) felett, azonban az optimális mennyiség alatt (400-500 mg/L; Henschke és Jiranek, 2003).

A törzsek YAN hasznosítása a kezdeti érték 30 és 63%-a között ingadozott. A magasabb cukorfokozaton jelentős csökkenés volt megfigyelhető a három *S. bacillaris* törzsnél és a két vizsgált *Saccharomyces* faj egyes törzsei esetén is (SC57, RA100, CBS395, S103). Annak ellenére, hogy a YAN fogyasztás a növekvő cukortartalommal általánosságban növekszik ez a jelen esetben nem teljesül, mivel a vizsgálat cukor tartománya inkább a magas és extrém koncentrációkat foglalja magában. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az extrém cukor tartományban a nitrogén metabolizmus bizonyos mértékben represszált (15. táblázat). Az alacsonyabb cukorfokozaton a *S. bacillaris* abszolút YAN felvétele a *Saccharomyces* törzsekkel összevethető, ami egy korábbi vizsgálattal egybehangzó (Gonzalez *et al*., 2018b). A *S. bacillaris* elerjesztett cukorra számított fajlagos YAN fogyasztása ugyanakkor mintegy kétszerese volt a *S. cerevisiae* átlagos értékeinek, és összevethető a *S. uvarum* átlagával. Az ozmotikus stressz minden faj esetén csökkenést eredményezett a nitrogén felvételben, de legkevésbé a *S. cerevisiae*-t érintette (0,56 mg/g-ról 0,48 mg/g-ra történő változás). A *S. uvarum* és a *S. bacillaris* fajlagos YAN felvétele majdnem feleződött, és a *S. cerevisiae* értékéhez közeli szintre csökkent (1,03 mg/g-ról 0,56 mg/g-ra, illetve 1,18 mg/g-ról 0,50 mg/g-ra). Ez a tulajdonság kimondottan előnyös lehet kevert kultúrás erjesztés esetén magas vagy extrém kiindulási cukortartalmú közegekben.

A prolin a mustokban jelentős mennyiségben fordul elő, így alacsony asszimilálható nitrogén mennyiségű közegek esetén megfelelő tartalék lehetne, ha a borélesztők számottevő mértékben hasznosítanák, azonban oxigén szegény körülmények közt erre nem képesek (Gonzalez *et al*., 2018b; Englezos *et al*., 2018a; Prior *et al*., 2019). Eredményeink ezt alátámasztják: nem volt detektálható prolin hasznosítás a normál cukor tartományban, azonban 320 g/L esetén kis mértékben javult a felvétele. A pozitív cukor indukálta változás mindhárom vizsgált fajra igaz,

azonban a *Saccharomyces*-ek esetén minimális növekedés figyelhető meg, ami nagyban törzs függő: UVAFERM®PM, UVAFERM®228 (*S. cerevisiae*) és CBS395 (*S. uvarum*) esetén. A *S. bacillaris* törzseknél egyöntetűen jelentősebb volt a változás a magasabb cukortartalom hatására (15. táblázat).

Az arginin a természetes mustokban jelentős mennyiségben elérhető, a YAN-nak fontos részét képző N-forrás, korábbi vizsgálatok (munkánként 1-1- törzs vizsgálatával) azt bizonyították, hogy a *S. bacillaris* közepes mértékben preferálja (Gobert *et al*., 2017; Englezos *et al*., 2018a). Ahogy a felvett összes N mennyisége csökkent az arginin hasznosítás is mérséklődik (mg/L-ben kifejezve), azonban százalékos aránya eltérően alakul (15. táblázat). A törzsek egy részénél (UVAFERM®PM, SC57, S701, SB42, Y1667) csökkent a YAN %-ában kifejezett arginin felhasználás, a törzsek felénél nem változik (RA100, UVAFERM®228, CBS395, S103, Y1756, MLO), az SB12 esetén pedig megduplázódik 320 g/L-en (15. táblázat). A *Saccharomyces*-ek közt jelentős volt a fajon belüli variabilitás, ami mérséklődött a magasabb cukor fokozaton. Jelen vizsgálatban a három *S. bacillaris* agrinin felvétele nem különbözött egymástól (adott cukor koncentráción belül), azonban az Y1667 (a YAN százalékában is) és Y1756 törzsek metabolizálása csökkent a cukortartalom növekedésével. Gobert és munkatársai (2017) vizsgálata alapján a *S. bacillaris* jelentősen lassabban és alacsonyabb mennyiségű arginint hasznosított az *S. cerevsiaie*-nél (200 g/L kiindulási cukortartalom, valódi must, 450 mg/L YAN), amit jelen törzsek és erjesztési körülmények közt részben tudunk megerősíteni 220 g/L-en, mivel a *S. cerevisiae* törzsek egy része (UVAFERM®PM, SC57, S701) jelentősen többet fogyasztott a *S. bacillaris*-nál, míg másik része összevethető (RA100, UVAFERM®228, SB12). Egy másik vizsgálatban 2 *S. bacillaris* törzset vizsgálva (230 g/L kiindulási cukor, modell must, 200 mg/L YAN) jelentős különbség adódott az arginin hasznosításban (Englezos *et al*., 2018a), amit 220 g/L-en megerősítenek az eredményeink (Y1667 kiemelkedik), azonban a magasabb cukortartalmon ez a különbség már nem jelentős.

Bár az alkalmazott modelloldat nem tartalmazott alanint, ami a mustban nem jelentős aminosav, a $^{1}$H NMR vizsgálati technika lehetővé tette az alanin koncentráció (alanin termelés) mérését is. A *S. uvarum* törzsek esetén nem volt detektálható alanin termelés, míg a *S cerevisiae* esetén ez törzsfüggő tulajdonság, a három *S. bacillaris* törzsnél termelés volt megfigyelhető. A termelés mértékét a kiindulási cukortartalom nem befolyásolta számottevően, azonban az SC57 *S. cerevisiae,* csak 320 g/L-en termelte (15. táblázat). A *S. bacillaris* alanin termelése 3 nap elteltével hibahatáron belülinek adódott Gobert *et al.* (2017) munkájában és preferált N-forrásként szerepel, míg Englezos *et al.* (2018a) vizsgálatában 270 órát követően az alanin koncentrációja 170%-os növekedést mutatott, amihez képest a jelen vizsgálat törzsei átlagosan 10-15 mg/L-rel több alanint termeltek 28 nap erjesztést követően.

A vizsgált 3 faj 12 törzse eltérően reagált N hasznosítás szempontjából a cukortartalom növekedésére és feltehetően a többi alkoholos erjedés alatt jelentkező stresszre (mint erjesztési hőmérséklet, N-forrás limitáció, etanol toxicitás, stb.) is eltérő választ adna. Összességében az fajon belüli változékonyság jelentősnek bizonyult, emiatt átfogó, fajra vonatkozó következtetéseket nem érdemes levonni. Azonban ezen eredmények is megerősítik azt az általánosan megfogalmazható szükséget, hogy a kevert kultúrás erjesztések kompatibilitási kérdéseit érdemes részletekbe menően, törzs szinten vizsgálni.

**15. táblázat:** A vizsgált élesztő fajok néhány nitrogén hasznosítási tulajdonsága a modell mustban 28 nap elteltével, 220 és 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén

| Cukor konc. (g/L) | Faj | Törzs | YAN hasznosítás (mg/L) | Prolin hasznosítás (mg/L) | Arginin | | Alanin termelés (mg/L) | Specifikus YAN haszn./cukor |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | hasznosítás (mg/L) | N a YAN %-ában | | |
| 220 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | (141,21±12,95)$^{ab}$ | N.D. | (106,67±21,13)$^{a}$* | (12,24±2,44) | N.D. | (0,48±0,06)$^{a}$ |
| | | Sc57 | (196,29±4,60)$^{ab}$* | (0,15±0,27) | (124,33±17,21)$^{abc}$* | (10,31±1,43) | N.D. | (0,73±0,02)$^{bc}$ |
| | | S701 | (122,85±5,22)$^{c}$ | N.D. | (95,00±1,00)$^{abcd}$ | (12,68±0,13) | N.D. | (0,40±0,02)$^{a}$ |
| | | RA100 | (191,04±2,45)$^{b}$* | N.D. | (64,00±13,53)$^{abc}$ | (5,46±1,15) | (39,67±4,04) | (0,79±0,03)$^{cd}$ |
| | | UVAFERM®228 | (143,43±13,53)$^{ab}$ | N.D. | (68,00±38,00)$^{ab}$ | (7,75±2,32) | N.D. | (0,51±0,07)$^{ab}$ |
| | | SB12 | (129,62±4,68)$^{c}$ | N.D. | (27,33±28,44)$^{cd}$ | (3,41±0,59) | (40,33±1,53) | (0,42±0,02)$^{a}$ |
| | | **Átlag** | **(154,07±31,08)** | **(0,03±0,11)$^{a}$*** | **(91,60±44,74)** | **(8,64±2,18)** | **(13,33±19,46)$^{a}$** | **(0,56±0,15)** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | (211,74±4,35)$^{d}$* | N.D. | (54,00±14,73)$^{cd}$ | (4,17±1,13) | N.D. | (1,23±0,01)$^{e}$ |
| | | S103 | (219,63±2,33)$^{d}$* | N.D. | (59,67±11,59)$^{cd}$ | (4,39±0,86) | N.D. | (1,28±0,08)$^{e}$ |
| | | SB42 | (139,43±14,17)$^{ab}$ | N.D. | (88,67±11,93)$^{abc}$* | (10,31±1,40) | N.D. | (0,59±0,08)$^{ab}$ |
| | | **Átlag** | **(190,27±39,01)** | **N.D.** | **(67,44±19,56)** | **(6,29±1,13)** | **N.D.** | **(1,03±0,35)** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | (138,54±15,67)$^{a}$* | N.D. | (53,33±10,26)$^{bcd}$* | (6,21±1,20) | (54,00±1,73) | (1,00±0,13)$^{de}$ |
| | | Y1756 | (172,90±2,55)$^{ab}$* | (3,40±3,86) | (39,50±7,78)$^{cd}$* | (3,69±0,74) | (63,50±4,58) | (1,24±0,02)$^{e}$ |
| | | MLO | (173,12±6,98)$^{ab}$* | (2,53±4,38) | (33,67±17,05)$^{d}$ | (3,11±1,61) | (49,33±4,16) | (1,29±0,012)$^{e}$ |
| | | **Átlag** | **(161,52±19,29)** | **(1,98±3,30)$^{a}$*** | **(42,17±14,08)** | **(4,33±1,18)** | **(55,44±6,82)$^{b}$** | **(1,18±0,16)** |
| | $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ | | n.s | - | 27,71 | - | - | 0,18 |
| | $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ | | n.s. | - | 31,99 | - | - | 0,21 |

15. táblázat folytatás

| Cukor konc. (g/L) | Faj | Törzs | YAN hasznosítás (mg/L) | Prolin hasznosítás (mg/L) | Arginin | | Alanin termelés (mg/L) | Specifikus YAN haszn./cukor |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | hasznosítás(mg/L) | N a YAN %-ában | | |
| 320 | *S. cerevisiae* | UVAFERM®PM | (144,71±6,51)$^{A}$ | (12,30±6,00) | (25,66±9,01)$^{A}$* | (2,92±1,01) | N.D. | (0,58±0,08)$^{AB}$ |
| | | Sc57 | (142,06±4,67)$^{A}$* | N.D. | (41,00±9,97)$^{ABC}$* | (4,70±1,14) | (18,14±21,36) | (0,48±0,01)$^{ABC}$ |
| | | S701 | (125,22±6,18)$^{B}$ | (3,97±2,52) | (18,33±8,50)$^{ABCD}$ | (2,35±1,10) | N.D. | (0,40±0,04)$^{A}$ |
| | | RA100 | (142,59±3,83)$^{CD}$ | (6,65±6,82) | (28,66±26,16)$^{ABC}$ | (3,32±1,50) | (48,00±4,04) | (0,50±0,03)$^{ABC}$ |
| | | UVAFERM®228 | (136,44±6,94)$^{CD}$ | (13,80±0,71) | (36,00±19,86)$^{AB}$ | (8,38±0,59 | N.D. | (0,54±0,02)$^{ABC}$ |
| | | SB12 | (119,75±8,23)$^{AB}$ | (0,10±0,17) | (58,33±7,63)$^{CD}$ | (7,93±1,00) | (22,00±21,07) | (0,39±0,04)$^{A}$ |
| | | **Átlag** | **(135,13±11,01)** | **(6,14±6,82)$^{A}$*** | **(29,93±29,54)** | **(4,26±2,21)** | **(16,11±21,15)$^{A}$** | **(0,48±0,08)** |
| | *S. uvarum* | CBS395 | (119,04±9,61)$^{C}$* | (9,87±9,66) | (31,00±6,00)$^{CD}$ | (4,24±0,82) | N.D. | (0,64±0,03)$^{C}$ |
| | | S103 | (114,54±8,51)$^{C}$* | (0,14±0,25) | (39,66±18,72)$^{CD}$ | (5,71±2,67) | N.D. | (0,52±0,05)$^{ABC}$ |
| | | SB42 | (126,60±1,30)$^{CD}$ | N.D. | (42,33±7,00)$^{ABC}$* | (5,43±0,91) | N.D. | (0,53±0,01)$^{ABC}$ |
| | | **Átlag** | **(120,06±8,34)** | **(3,34±6,88)$^{A}$*** | **(37,67±13,11)** | **(5,13±1,47)** | **N.D.** | **(0,56±0,06)** |
| | *S. bacillaris* | Y1667 | (95,70±10,96)$^{D}$* | (18,63±7,64) | (18,33±6,66)$^{CD}$* | (3,08±1,14) | (43,00±2,65) | (0,57±0,10)$^{BC}$ |
| | | Y1756 | (88,93±3,38)$^{D}$* | (17,61±4,36) | (14,67±5,04)$^{BCD}$* | (2,75±0,92) | (48,33±6,81) | (0,46±0,05)$^{AB}$ |
| | | MLO | (85,02±12,88)$^{E}$* | (18,30±5,57) | (21,67±9,45)$^{D}$ | (4,22±1,81) | (40,33±4,73) | (0,48±0,11)$^{ABC}$ |
| | | **Átlag** | **(89,88±9,81)** | **(18,18±8,42)$^{B}$*** | **(18,22±15,88)** | **(3,35±1,90)** | **(43,89±5,60)$^{B}$** | **(0,50±0,09)** |
| | $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ | | 8,42 | 6,03 | 14,80 | - | - | n.s. |
| | $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ | | 9,72 | 6,96 | 17,09 | - | - | n.s. |

A cellákban a törzsek ismétléseinek átlag értékei és szórásuk szerepel (n=3), a vastagon szedett értékek a faj átlagok és szórásuk ($n_{S.\ cerevisiae}$=18; $n_{S.\ uvarum}$ és *S. bacillaris*=9). Games-Howell post hoc elemzés alapján az egy oszlopon belüli értékek statisztikailag különböznek ($p<0.05$): a kis betűk 220 g/L cukortartalomra vonatkoznak; a nagy betűk 320 g/L cukortartalomra vonatkoznak; a csillag cukor indukált változást jelzi. $LSD_{5\%}$ a legkisebb szignifikáns differenciát jelölik a faj átlagok közt. $LSD_{5\%S.c\text{-}többi}$ *S. cerevisiae* és a másik két faj közt; $LSD_{5\%S.u.\text{-}S.b.}$ *S. uvarum* és *S. bacillaris* között. n.s.=nem szignifikáns. N.D.=nem detektált. Detekciós limit: prolin esetében a fogyasztást a bemért és visszamért érték különbségéből számítottam (a visszamért érték detekciós limite 150 mg/L, ugyanakkor minden mintában meghaladta ezt az értéket), alanin 35 mg/L.). Az alanin esetén kereszttábla elemzés alapján kis betűvel jelölve: az adott fajok közt szignifikáns különbség ($p<0.05$) 220 g/L cukor esetén, nagy betűvel jelölve: az adott fajok közt szignifikáns különbség ($p<0.05$) 320 g/L cukor esetén, csillag cukor indukált változás.

#### 4.3.2.4. Többváltozós metabolit profil vizsgálat

A vizsgált anyagcseretermékek fenti részletes elemzése után, a célzott metabolit profil normális eloszlású tagjainak együttes vizsgálata összetettebb képet adhat a három fajról és törzseikről.

10 fontosabb anyagcsere termék alapján történt a törzsek vizsgálata főkomponens analízissel, a kiindulási cukor koncentrációk szerint (22. ábra), amik két faktorba tömörítve a variancia 64,10%-át (220g/L) illetve 71,43%-át (320g/L) magyarázzák. Tekintve, hogy például illékony komponensek vizsgálata nem történt (amik a nem magyarázott variancia jelentős részéért felelnek feltehetően), ez elfogadható, magas arány. A score ploton a megfigyelések (az egyes vizsgált törzsek elhelyezkedése a dimenzió csökkentett térben), a bi-ploton a megfigyelések és a főkomponensekbe tömörített eredeti változók irányultsága láthatók.

Az első főkomponens magasabb értékei nagyobb glicerin termelést, G/F arányt és fruktóz hasznosítást írnak le, negatív értékei nagyobb arginin hasznosítást. A második főkomponens pozitív térfele magasabb etanol és 220 g/L-en illósav termelést írnak le, míg negatív értékeit az almasav hasznosítás határozza meg. A borostyánkősav a 3. míg az YAN a 4. faktorban járul hozzá számottevően a variancia magyarázatához (az 22. ábra diagramjain ez 2D-re vetítve látható). A két eltérő kiindulási cukortartalom összehasonlításában az egyes változók nem módosultak számottevően (pl. előjel váltás nem mutatkozott).

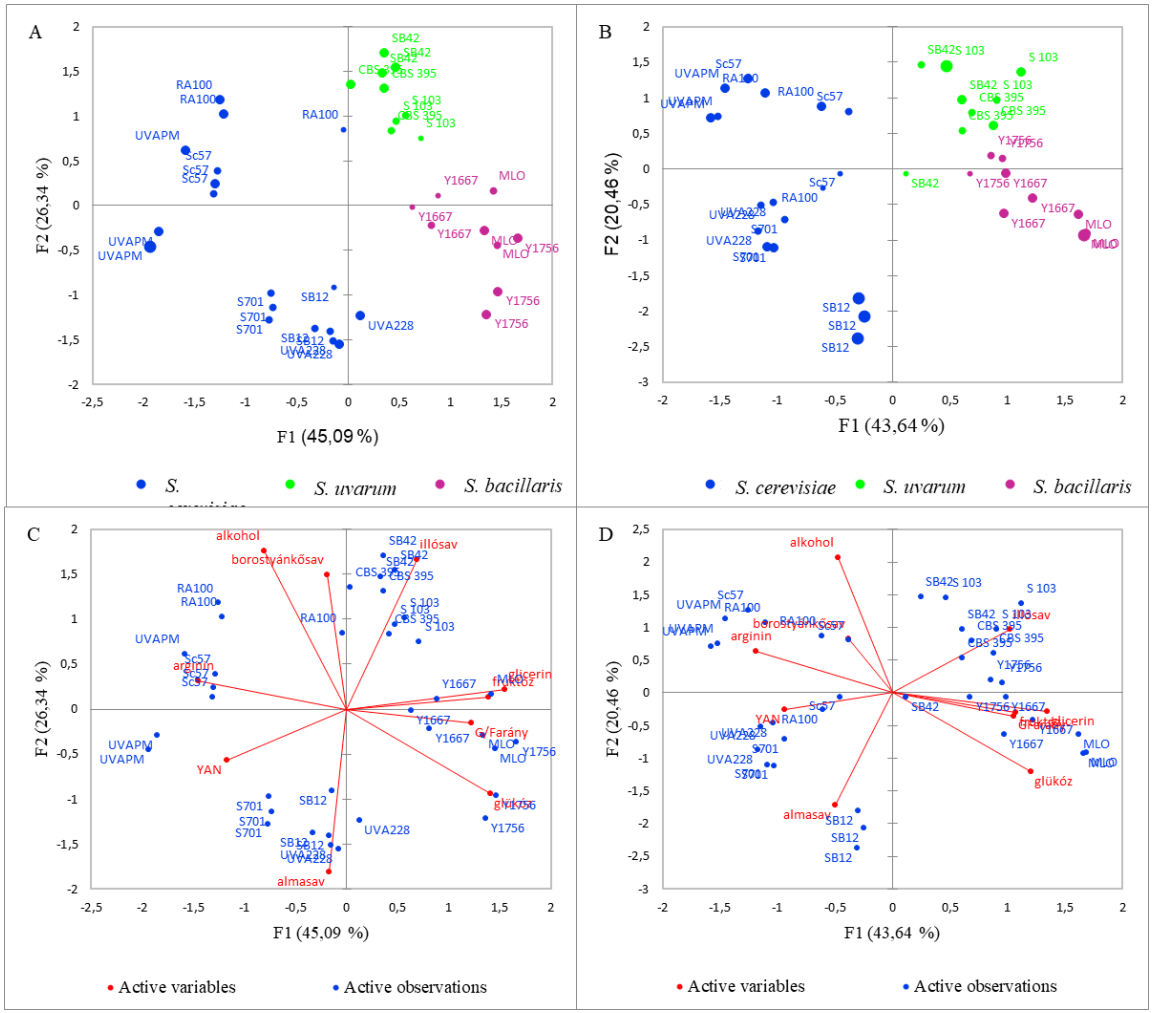
A vizsgálatba vont anyagcseretermékek alapján a 3 vizsgált faj jól elkülönül egymástól mindkét cukorfokozaton (a korreláció mentes tér más-más negyedébe esnek az adott fajba sorolt törzsek). A *S. cerevisiae* fajon belül reprezentált variabilitás erősen megnyilvánul a törzsek nagyobb szóródásában. Egy-egy adott törzs két cukorfokozat közti metabolit profil változását az M2-3. ábra szemlélteti. A PCA elemzésbe vont változók alapján a 100 g/L kiindulási cukortartalom változás törzsenként eltérő választ eredményezett, ezért faj szinten kevés megállapítás vonható le. Összességében elmondható, hogy a 2 dimenzióban ábrázolt korrelációmentes térben a megfigyelések számotevően nem mozdultak el, a *S. cerevisiae* és *S. bacillaris* szóródása 320 g/L-en nagyobb. A két cukortartalmat összevetve, 320 g/L-en a *S. uvarum* és *S. bacillaris* csoport középpontok közti távolság csökkent (*S. cerevisiae* esetén inkább kétpólusú a megfigyelések elrendeződése, ezért nem szerencsés a csoport középpontjához viszonyítani).

Jelen vizsgálatban pozitívan korrelál a glicerin termelés, G/F arány és fruktóz hasznosítás, valamint az etanol és borostyánkősav termelés. Míg gyengébben, de pozitívan korrelál 220 g/L-en az alkohol és illósav, borostyánkősav és illósav termelés, amik 320 g/L-en függetlenek egymástól. Egymástól függetlennek bizonyultak: a cukor felhasználás mértéke, -összetétele, a glicerin termelés és az almasav felhasználás; illetve az illósav termelés és glükóz fogyasztás, az etanol termelés és az elfogyasztott YAN. A borostyánkősav termelés 220 g/L-en negatívan korrelál az

almasav fogyasztással, míg a magasabb cukorfokozaton egymástól függetlenül alakulnak. A termelt etanol a felhasznált glükózzal negatívan korrelál (220 g/L-en erősebb, 320g/L-en gyengébb az összefüggés).

A fenti összefüggések alapján egyértelműen megkülönböztethető a *S. bacillaris* törzsek anyagcsere tevékenysége a vizsgált *Saccharomyces*-ektől, a cukorfokozatok jelentette eltérés törzsi szinten értelmezhető.

A kiindulási cukortartalom a fent taglalt fontosabb fő és minor anyagcseretermékek alakulását jelentősen befolyásolta. A változások tendenciái fajonként, törzsenként eltérően alakulnak. A *S. bacillaris* egyes reakciói a magasabb cukor jelentette stresszre eltérőnek adódtak a vizsgált *Saccharomyces*-ekhez képest. A faj értékes tulajdonságú törzseinek jelentősége lehet a közel jövőben kevert kultúrás erjesztések során, hiszen több korábban és/vagy ebben a munkában leírt és borászati szempontból jelentős tulajdonsága kiváló (pl. extrém cukor tartományban moderált N igény). Továbbá a borminőséget kevésbé befolyásoló, azonban az erjedés lefutására hatással bíró, illetve több törzs együttes használatához fontos paraméter alapján is alkalmasnak bizonyul (pl. nettó pozitív, alanin termelés).




**22. ábra:** A vizsgált normális eloszlású metabolitok főkomponens analízisének score-plotja (A: 220 g/L, B: 320 g/L cukortartalomnál) és- bi-plotja (C: 220 g/L, D: 320 g/L cukortartalomnál). *S. cerevisiae*: UVAPM, UVA228, S701, SC57, RA100, SB12; *S. uvarum*: CBS395, S103, SB42; *S. bacillaris*: Y1667, Y1756, MLO.

### 4.4. Félüzemi léptékű kevert kultúrás kísérleti erjesztés

A laborléptékű kísérleti eredményeket követően egy félüzemi erjesztési kísérlet zárja vizsgálataimat, ahol a cél az volt, hogy az utóbbi években terjedő nem-*Saccharomyces* élesztő inokulálási stratégiákat összehasonlítsuk egy *S. bacillaris* törzs esetén valós borászati körülmények közt. Célom volt továbbá, hogy analitikai és érzékszervi értékelés során információt nyerjünk a *S. bacillaris* jelenlétéből adódó módosult metabolit mintázatról, módosult bor karakterről.

Az erjesztéshez használt törzsek kiválasztása során figyelembe vettük korábbi kísérleti eredményeinket, ami a *S. bacillaris* esetén tapasztalt nem jelentős törzsek közti eltérés miatt az izolálás közege alapján történt (pl. aszúbogyó felületét preferáltuk görögdinnyéhez képest). A *S. cerevisiae* partner kiválasztása szintén előző eredményeink alapján történt, továbbá nem kívántam az alkalmazott törzspalettát tovább szélesíteni, így starter kultúraként az Uvaferm® PM és 228 közül állt módomban választani. A 228 megbízható, kiegyensúlyozott, moderált cukorfogyasztással jellemezhető saját előkísérleteim alapján is, továbbá mind a gyakorlatban, mind pedig borászati témájú kísérleti munkában gyakran alkalmazott starter. Alkalmasabb párnak tűnt, mint a rendkívül robosztus PM, olyan szempontból, hogy az aránylag lassú felszaporodású *S. bacillaris* törzsnek lehetőséget hagyjon megnyilvánulni.

1hL-es, hőmérséklet szabályozott (16 °C) koracél tartályokban, 60 L-es nem sterilizált must mennyiség beoltása történt két párhuzamosban:

1. kontrollként, hagyományosan csak *S. cerevisiae*-vel (kereskedelmi starter kultúra rehidratálást követően, Uvaferm®228);
2. ko-inokulációval: *S. cerevisiae* (Uvaferm®228) és *S. bacillaris* (Y1756 törzs YEPD ferde agarról YEPD levesben, majd valódi mustban való felszaporítással készített anyaélesztő kultúra 2 v/v%- nyi beoltása) egyidejű beoltásával;
3. szekvenciális beoltással: *S. bacillaris* (Y1756), majd 96 óra után *S. cerevisiae* (Uvaferm®228).

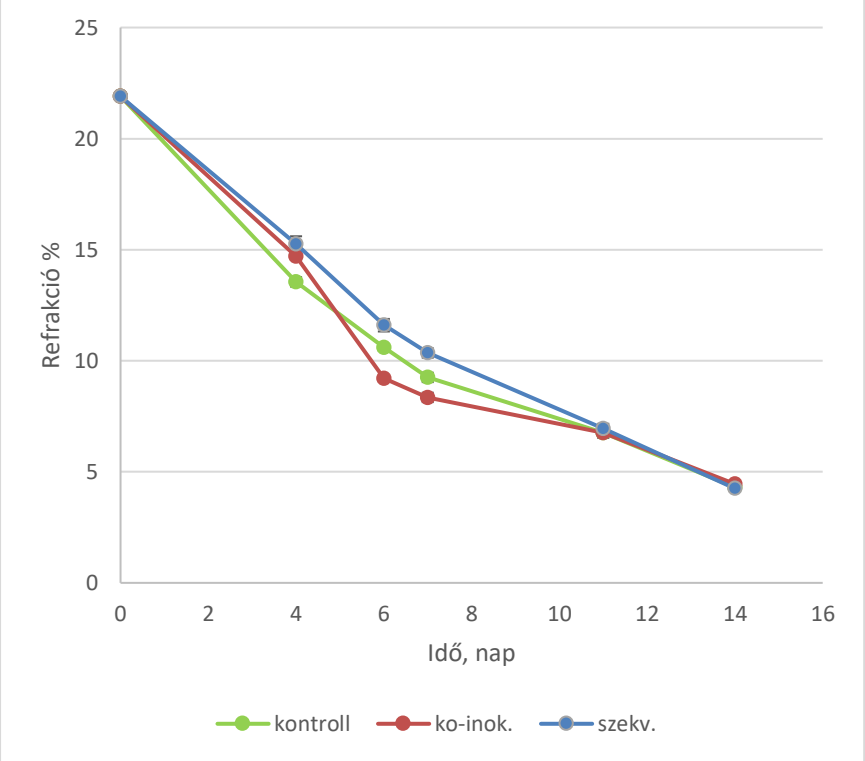
Az erjedés 0. és 4. napján minden tartály Uvavital komplex tápanyag kiegészítésben részesült.

Több dolgot is szem előtt kell tartani az eredmények értékelése során a korábbi steril must/modell mustban történő monokultúrás vizsgálatokhoz képest: a kezdeti autochton élesztőbiota összetételét módosította a nem-*Saccharomyces* ráoltás, azonban jelenlétüket nem szüntette meg teljesen. A nem-*Saccharomyces* inokuláció ellenére az erjesztés második felében a *Saccharomyces* dominancia nyilvánul majd meg. Tehát az erjedés dinamikai különbségek, amennyiben jelentkeznek, várhatóan nem lesznek számottevőek, és ez erjedés

végére eliminálódnak. Az együtt erjesztő törzsek lehetnek egymásra neutrális, szinergens vagy antagonista hatással is.

Az erjedés lefutását az oldható szárazanyag tartalom mérésén keresztül követtük nyomon, amit az 23. ábra szemléltet. Az erjedés 4. napján a kontroll (csak *S. cerevisiae*) tartályokban csökkent legnagyobb mértékben a cukortartalom, a ko-inokulált és szekvenciális (a mérésig csak *S. bacillaris*-sal beoltott) tartályok közt – meglepő módon - nem volt különbség. (Mikroszkópos vizsgálat alapján a 4. napon a szekvenciális tartályokban még csak *S. bacillaris* sejtek voltak észlelhetők). Tehát a két törzs együttes jelenléte összességében lassabb cukor fogyasztást eredményezett, mint az önálló *S. cerevisiae* esetében. A 4. és 6. nap közt a ko-inokulált tartályokban az erjedés lefutása meredekebbé vált, mint a kontroll tartályokban, (feltehetően a 4. napra vette át a dominanciát a *S. cerevisiae*), azonban ez az eltérés is csökkent majd eltűnt a 10. napra. Összességében elmondható, hogy a nagy számban inokulált ismerten lassú szaporodású és a *S. cerevisiae*-hez képest lassan erjesztő *S. bacillaris* starter nem okozott számottevő lemaradást a kontrollhoz képest egyik stratégiával sem, tehát nem gyakorolt antagonista hatást. A ko-inokulálás nem eredményezett javulást az erjedési dinamikában az erjedés kezdetén a szekvenciális beoltáshoz képest, tehát szinergens hatást sem tudtam kimutatni.

Az alkoholos erjedés lefutásának szempontjából biztonságosnak tekinthető minkét alternatív stratégia, mivel minden kísérleti bor szárazra erjedt (16. táblázat).



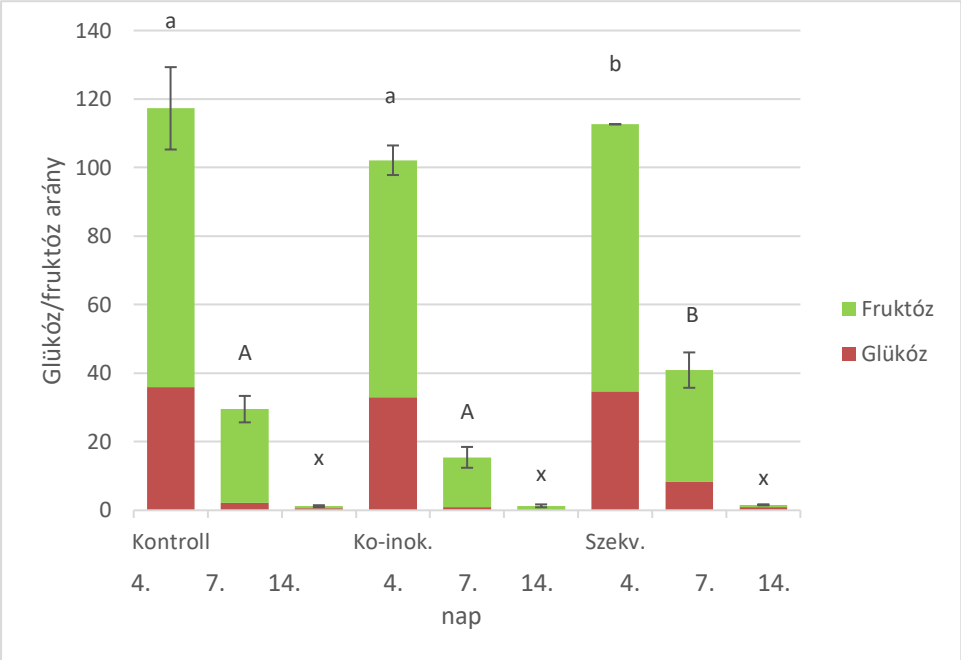

**23. ábra:** A kísérleti erjesztések átlagos dinamikája, annak szórásával (n=2)

A cukor fogyása mellett érdemes a glükóz-fruktóz arányt is nyomon követni, hiszen az erősen fruktofil *S. bacillaris* eltérően módosíthatja az el nem erjesztett cukor összetételét. Továbbá a G/F arány árulkodik az erjesztésben való részvételéről is a különböző inokulálási módokon.

Az erjedés 4. napján a maradék cukor teljes mennyiség (G plusz F) a ko-inokulált tartályban valamivel kisebb, mint a szekvenciális kezelésű tartályban, ami magyarázható a kétszeres mennyiségű élesztősejt jelenlétével. A G/F arányban azonban csak minimális különbségeket tapasztaltunk a különböző kezelések között, ellentétben a várakozásainkkal. A szekvenciális technika esetén az erjedés 4. napjáig önmagában erjesztő *S. bacillaris* közel azonos eredményt produkált a másik két oltási móddal. A steril közegben történő, monokultúrás, mikrovinifikációs erjesztések sokszoros glükóz túlsúlyát (Magyar *et al*., 2008a; Magyar és Tóth, 2011; Ranstiou *et al*., 2017; valamint lásd **4.3.2.** fejezet) nem produkálta a *S. bacillaris* egyik beoltási módon sem, amit egyéb (a kísérlet indításához képest részben később megjelenő) irodalmi adatok is megerősítenek (Englezos *et al*., 2016; Englezos *et al*., 2018c; Nisiotou *et al*., 2018). Más kísérleti elrendezésben pedig, az erjedés során a 4. és 7. napon nagyobb különbségről számolnak be a beoltási módozatok között, mint jelent esetben, azonban ez szintén megszűnik az erjedés végére (Englezos *et al*., 2019).

A 7. napon az elerjesztett cukor mennyiségében is jelentős a különbség a 24. ábra alapján: a szekvenciális tartályokban számottevően magasabb a cukortartalom (glükóz túlsúllyal), ahol a *S. cerevisiae*-nek a ráoltást követően rövidebb ideje volt felszaporodni/ cukrot fogyasztani. A *S. cerevisiae* a kontroll tartályokban közepes, addig a ko-inokulált tartályok cukortartalma a legalacsonyabb.

A fent említett eltérések mind a maradék cukortartalom, mind a G/F arány tekintetében az erjesztés végére elmosódtak, minden tartály szárazra erjedt. Mivel egy teljes érettségben levő szőlő mustját erjesztettük sem a cukor mennyisége, sem pedig a kezdeti kedvező G/F arány (1:1) nem tette indokolttá, hogy fajélesztő beoltással ne fogyjon el a redukáló cukortartalom túlnyomó része. Valamint az erjedés során a két faj cukor preferenciája kiegészíti egymást, ebből a szempontból versengéssel nem kell számolni, sőt a *S. bacillaris* ajánlható extrém glükofil élesztőkkel kombinálva kiegyensúlyozott erjedési profil elérésére.




**24. ábra:** A kísérleti borok glükóz-fruktóz arányának átlaga az erjedés 4. (ráoltás előtt), a 7. napján (megközelítőleg a felénél) és a 14. napon (kierjedt újborból). Az eltérő kis és nagy betűk szignifikáns eltérést jelentenek egytényezős varianciaanalízis Tukey'Post hoc elemzése alapján az adott erjedési napon belül ($p<0,05$; $n=2$)

A kierjedt borok alapanalízise rendkívül hasonló, nincs szignifikáns különbség a kezelések közt, a fő boralkotók szempontjából, amit két módon is értelmezhetünk. Egyrészt megnyugtató, hogy nem befolyásolja a nem-*Saccharomyces* élesztő használat a fontos minőség meghatározó komponenseket negatív irányba, mint a titrálható sav-, alkohol- vagy illósav koncentráció. Ugyanakkor a *S. bacillaris* eredetileg, önálló erjesztés során leírt metabolit mintázata nagyon gyengén nyilvánul meg, ami megkérdőjelezi, hogy milyen mértékben volt képes az erjesztésben részt venni, vagy felveti, hogy változik-e együttes erjesztés során az anyagcseréje.

Akár számottevő alkohol tartalom csökkenést és glicerin tartalom növekedést lehetett volna prognosztizálni a beoltott nem-*Saccharomyces* inokuláció eredményeként, azonban ez csak kis mértékben nyilvánul meg, amit alátámaszt, hogy a látható eltérés egytényezős ANOVA alapján a szignifikancia határon billeg, $p=0,1$ esetén igazolható is (alkohol: $F=6,672$, $p=0,078$; glicerin: $F=8,435$, $p=0,058$). Az elmúlt években felmerült egyes nem-*Saccharomyces*-ek használata kombinált erjesztésre (Quiros *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2015; Englezos *et al.*, 2016; Röcker *et al.*, 2016; Lemos *et al.*, 2019) kimondottan alkohol csökkentés és harmónia javítás céljából, azonban adott paraméterek mellet a vizsgált élesztő pár erre korlátozottan tűnt alkalmasnak, mivel legnagyobb mértékű csökkenés mindössze 0,6v/v%-os volt (ko-inokuláció).

A termelt illósav értékekben nincs különbség a monokultúrás és kombinált beoltások között, mennyisége még valós üzemi léptékű erjesztésben is elfogadható lenne. Korábbi vizsgálatok más *S. bacillaris* törzsek esetén *S. cerevisiae*-vel való kombinált erjesztés során az alacsony ecetsav képzést figyeltek meg (pl. Comitini *et al.*, 2011; Englezos *et al*., 2017). Egy korábbi vizsgálatban laboratóriumi léptékben a ko-inokulációval szemben a szekvenciális beoltás bizonyult előnyösebbnek, mivel jelentős ecetsav tartalom csökkenés volt megfigyelhető (átlag csökkenés 1,20 g/L-ről 0,64 g/L-re) (Rantsiou *et al*., 2012). Ezzel szemben Lencioni és munkatársai (2018) szintén laboratóriumi léptékben *S. cerevisiae* és *S. bacillaris* tiszta és ko-kultúrás erjesztését összevetve 14 °C-on nem figyelt meg különbséget, 20 °C-on azonban kisebb mértékű volt az illósav képzés a kombinált beoltás esetén. A fent citált vizsgálatokból is látható, hogy a *S. bacillaris* monokultúrában magasabb, egyes törzsek kimondottan magas (Englezos *et al*., 2016) illósavat termelnek, míg kevert kultúrában ez változó mértékben mérséklődik, az intraspecifikus variabilitásnak köszönhetően. Összességében a *S. bacillaris* ecetsav termelése elfogadható, de erősen törzsfüggő. Bár a faj sok borászatilag értékes tulajdonsággal rendelkezik, ez a tulajdonsága nem tartozik a kiemelkedők közé, hiszen egyéb nem-*Saccharomyces*-ek sokkal előnyösebbnek bizonyultak (Bely *et al*., 2008; Domizio *et al*., 2011).

Összességében, jelen körülmények közt inkább elhanyagolható a hatása a kombinált faj használatnak a bor alapvető alkotóira, annak ellenére, hogy az irodalomban számos sikeres kombinált erjesztési eredmény található az elmúlt évekből (pl. Cominiti *et al*., 20111; Englezos *et al*., 2018b,c; Nisiotou *et al*., 2018; Englezost *et al*., 2019).

Ebből a szempontból a kísérlet tekinthető ’sikertelen’ erjesztésnek azonban, ha ipari implementációra gondolunk akkor ez relatív, hiszen a bor nem akadt el az erjedésben, a végtermék nem lett hibás, bár a várt előnyök sem nyilvánultak meg. Több lehetséges magyarázat is állhat a ’sikertelenség’ hátterében:

(1) Feltételezhető a két törzs egymással való kompatibilitásának részleges hiánya, nem-megfelelősége, a *S. cerevisiae* dominanciája nem-, vagy nagyon limitáltan engedte érvényre jutni a *S. bacillaris*-t, ami megnyilvánul mind az etanol mind a glicerin koncentrációban.

(2) A must összetevői közt volt jelen olyan komponens, ami a *S. bacillaris* szaporodását akadályozta, míg a *S. cerevisiae*-t nem.

(3) A must spontán biotájában volt/ak olyan törzs/ek, amivel nem volt kompatibilis a *S. bacillaris* törzs, bár a nagy élősejtszámú inokuláció miatt a gátlás inkább valószínűtlen, illetve elképzelhető, hogy a *S. bacillaris* a spontán biota egésze fölött nem volt képes dominálni (különösen a szekvenciális beoltásnál).

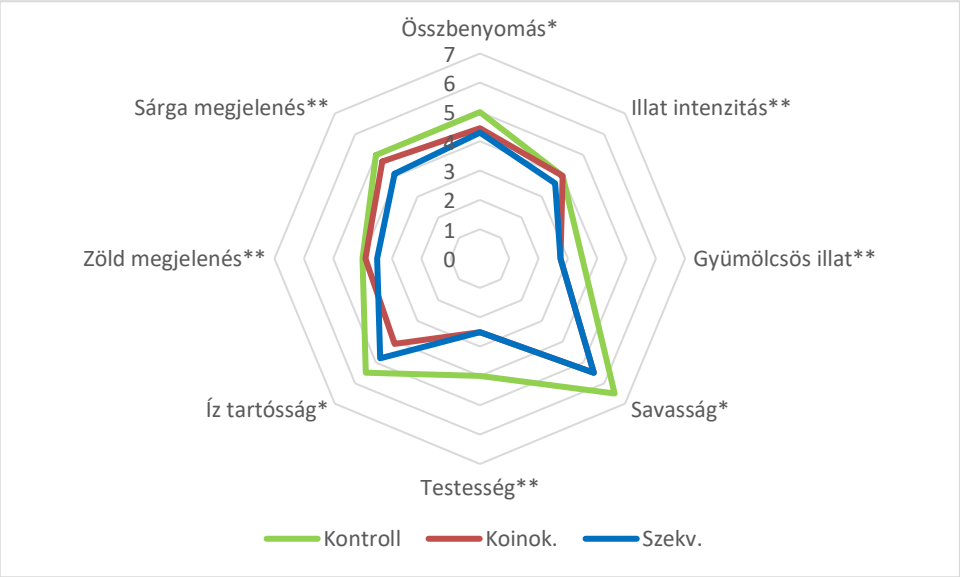
16. táblázat: A kierjedt újborok alapanalízise. Az eltérő betűk egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post hoc elemzése szerinti szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$; n=2)

| | Alkohol(v/v %) | Titrálható sav (g/L) | pH | Red.cukor (g/L) | Illósav (g/L) | Glicerin (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kontroll | (13,57±0,10)[a] | (6,60±0,3)[a] | (3,56±0,01)[a] | (1,2±0,3)[a] | (0,31±0,00)[a] | (6,09±0,05)[a] |
| Ko-inok. | (12,93±0,06)[a] | (6,60±0,1)[a] | (3,58±0,01)[a] | (1,3±0,4)[a] | (0,30±0,30)[a] | (6,86±0,22)[a] |
| Szekv. | (13,28±0,28)[a] | (6,35±0,1)[a] | (3,57±0,02)[a] | (1,6±0,1)[a] | (0,30±0,02)[a] | (6,36±0,24)[a] |

Az érzékszervi vizsgálatot egy vezetett vakkóstoló keretében, belövő bort követően végeztük 10 borkóstolásban jártas tagból álló (nem fogyasztói) panel segítségével a mennyiségi leíró analízissel (QDA). A profilanalízis alapján az értékelt illat leíró tulajdonságok többségében nem adódott eltérés a *S. bacillaris* jelenléte miatt, amit a faj neutrális aromatermelő mivolta alapján nem is vártunk. A bor testességében, krémességében sem tapasztaltunk pozitív elmozdulást a kontrollhoz képest. A legtöbb tulajdonság a *S. bacillaris* alkalmazásánál mindkét beoltási mód esetén egymáshoz közel alakult analitikai vizsgálatok alapján is (16. táblázat).

A megjelenésben a szekvenciális beoltási mód alulmaradt a másik két technikához képest, ami magyarázható az első 4 napban kizárólagos *S. bacillaris* jelenléttel, hiszen az erjedés lassabban indítja, így később érthető el a $CO_2$ oxidációtól védő hatása a folyadék felületén. A *S. cerevisiae* kontroll a gyümölcsös illat, savasság, testesség, íz tartósság, valamint az összebenyomás szempontjából számottevően magasabbnak adódott a nem-*Saccharomyces* jelenléthez képest (25. ábra).

Mindezek alapján a jelenleg együttesen alkalmazott Uvaferm®228 *S. cerevisiae* és Y1756 *S. bacillaris* nem ajánlható kombinált erjesztésre, mivel minimális eltérést eredményezett mind a bor alapvető analitikai tulajdonságaiban, mind érzékszervi karakterében (és érzékszervileg főként negatív a változás). Ugyanakkor, különös tekintettel az irodalomban közölt néhány sikeres kísérletre, nem szabad ebből az egy kísérleti összeállításból messzemenő következtetéseket levonni, sőt általánosítani sem. Más paraméterekkel rendelkező mustban, azonos élesztő fajok más-más törzsei ettől függetlenül alkalmasak lehetnek oligostarterként való alkalmazásra.




**25. ábra:** A kísérleti borok profilanalízisének részlete: a beoltási módok szerint eltérést mutató illat és íz leíró tulajdonságok, összbenyomás. A pókháló diagram értékei a párhuzamos tételek és a bírálatok átlag értékei (n=2 x 10), a * szignifikáns különbséget jelöl $p<0,05$, a ** szignifikáns különbséget jelöl $p<0,001$.

## 4.5. Új tudományos eredmények

1. A *S. bacillaris* kriotoleranciáját – normál borászati körülmények között – nem erősítettem meg. Kevert tenyészetben, hidegerjesztésnél nem javasolt, sőt a hőmérséklettel pl. lehűtéssel lehet szabályozni a részvételét/visszaszorítását. Ebben a tulajdonságban meglepően kicsi volt a fajokon belüli variabilitás. A *S. bacillaris* szaporodása alacsony hőmérsékleten, nagy cukortartalom mellett jelentősen kevésbé szorul vissza.

2. 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. A közepes szénláncú zsírsavak jövőbeni üzemi alkalamzása során ez utóbbi eredmény komoly limitációja lehet az erjedés gátlásnak, továbbá a minimális hatékony koncentráció meghatározásakor feltétlenül figyelembe kell venni.

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

5. 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.

# 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. **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.
2. **A *S. bacillaris* szaporodási képességéről** különböző környezeti stresszfaktorok közt a következő megállapításokat teszem.
    - A *S. bacillaris* hidegtűrése az irodalomból 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.
    - 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. Azonban 6 °C-on a *S. bacillaris* növekedése nagy mértékben visszaszorul cukor koncentrációtól függetlenül.
    - A *S. bacillaris* esetén a két stressztényező 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).

3. **A közepes szénláncú telített zsírsavak gátló hatásáról** kevés volt az irodalmi adat.
    - 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 limitált közepes szénláncú zsírsav toleranciája miatt megkérdőjeleződik alkalmassága.
4. **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 stresszhatást 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.
5. **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 cukortartalméhoz a vizsgált *S. bacillaris* és *S. uvarum* törzsek esetén, számottevő maradék cukortartalommal.
    - A *S. bacillaris* illósav képzése számottevő intraspecifikus variabilitást mutat, jelen esetben 2 törzs a kiindulási cukor függvényében több ecetsavat termelt, míg egy esetben ez nem igazolható. Az irodalomban eltérő adatok találhatók, ami tovább erősíti a fenti megállapítást. 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 faj értékes tulajdonságú törzseinek jelentősége lehet a közel jövőben kevert kultúrás erjesztések során, hiszen több korábban és/vagy ebben a munkában leírt és borászati szempontból jelentős tulajdonsága kiváló, és az eltérő stresszválaszok jól kompenzálhatják az erjedés során fellépő problémákat.

6. **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, valamint 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.

# 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fajélesztő használat az élelmiszeriparban jelentős átalakuláson megy keresztül, amelynek egyik legfontosabb színtere a borászat. Új irányzatként a különböző nem-*Saccharomyces* élesztők általános jellemzése és szelektált törzseinek borászati körülmények közötti jellemzése jelenleg is zajlik. A különböző kombinált erjesztések használatával a korábban jól definiált képességű *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzsek tulajdonságai is átértékelődnek, illetve újabb szempontok merülnek fel, mint együtt erjesztési képesség, egymást támogató nitrogén hasznosítás stb.

Ennek az óriási munkaigényű és horderejű kérdéskörnek egy részletével foglalkoztam a doktori képzésem során: a magas-, vagy extrém kiindulási cukortartalom szaporodásra és erjesztési metabolitokra gyakorolt hatásával, különböző borászati jelentőségű élesztőfajok esetén. A *S. bacillaris* eddig több szempontból még nem, vagy érintőlegesen definiált tulajdonságait hasonlítottam a két legelterjedtebb *Saccharomyces* élesztőhöz különböző stresszhatások közt.

A fenti stresszhatások közül fő fókuszban a magas, vagy extrém kiindulási cukortartalom áll, aminek szaporodásra és metabolit képzésre gyakorolt hatását egyaránt vizsgáltam. Valamint önmagában és a cukortartalommal kombinációban az alacsony erjedési hőmérsékletet és az előbbiektől függetlenül a közepes szénláncú zsírsavak szaporodás gátló hatását. Vizsgálataimat egy félüzemi léptékű kombinált erjesztési kísérlet zárta.

A *S. bacillaris* kiemelkedő ozmotoleranciája, fruktofiliája, mérsékelt etanol termelése, magas glicerin termelése, általános mikrobiológiai értelemben vett hidegtűrése a faj irodalomból is ismert értékei közé tartozik, valamint jelen munkában is megerősítést nyert. Hidegtűrését borászati viszonyok közt vizsgálva megállapítható, hogy mérsékelt, a *S. uvarum* kriotoleranciájától elmarad. Ozmotoleranciáját a borászati viszonyok közt reális hőmérséklet tartományra kiterjesztve vizsgáltam, ami alapján elmondható, hogy az erős cukortűrése dominál 12 °C-on, azonban 6 °C-os hőmérsékleten már jelentősen visszaszorul a szaporodása.

A *S. bacillaris* extrém cukortartalomra adott metabolit profil változása a vizsgált *Saccharomyces*-ektől jelentősen eltérő. Például az extrém cukortartalmon jelentkező mérsékelt nitrogén igénye és gyenge prolin hasznosítása előnyös lehet egy kevert kultúrás erjesztés során különösen, ha magas cukortartalmú, nitrogén szegény must erjesztése a cél.

A *S. bacillaris* illósav termelését korábban a kiindulási cukortartalomtól függetlennek írták le egyes vizsgálatok során, míg jelen munkában intraspecifikus variabilitásnak köszönhetően az ellenkezőjét is megfigyeltem. Az ecetsav termelés, annak mennyisége, és esetenként cukor-függő képzése miatt nem tartozik a nem-*Saccharomyces* faj előnyei közé.

A *S. bacillaris* közepes szénláncú telített zsírsavakkal szembeni toleranciája gyenge, a vizsgált *Saccharomyces*-ekhez képest elmarad. Ebben a vizsgálatban kiemelkedő ellenállást a vizsgált *Z. bailii* törzsek mutattak. Mivel a zsírsavakat erjedésgátlásra a jövőben a borászatban is alkalmazni tervezik, a *Zygosaccharomyces balli* erős toleranciáját szem előtt kell tartani.

Ugyan monokultúrás *S. bacillaris* erjesztési kísérletekben kiemelkedően alacsony etanol és magas glicerin képzés figyelhető meg, a faj nem képes a szőlőmust önálló, teljes kierjesztésére. Kombinált alkalmazás esetén mérsékelten, az együtt használt törzsek kompatibilitásától függően nyilvánulhatnak meg a fenti előnyös tulajdonságok. Továbbá rossz versengőként, megkérdőjeleződik az együtt erjesztésben való részvételének mértéke.

Összességében *S. bacillaris*-t ígéretes starter jelöltnek tartom, több előnyös tulajdonsággal, ugyanakkor fontos kiemelni, hogy sok értékes tulajdonsága mellett, bizonyos limitációit is szem előtt kell tartani egy üzemi alkalmazás során. Eredményeim alapján a jövőben kevert kultúrás beoltással (a kombinálandó törzsek kompatibilitásának széleskörű ellenőrzésével) kimondottan alkalmas lehet magas vagy extrém cukortartalmú, akár botrítizálódott alapanyag erjesztésére.

## 7. SUMMARY

The starter culture employment changing profoundly in the food industry, in which oenology is a leading branch. The use of yeast starter culture is under continuous development in the food industry, and particularly in the winemaking. As a new trend, there is ongoing work on the general description of various non-*Saccharomyces* yeasts and on the characterisation of their selected strains in winemaking environment. The earlier well-defined properties of *S. cerevisiae* and *S. uvarum* is revised during combined fermentations, moreover, there are emerging new aspects as co-fermentation capability or synergistic nitrogen utilisation etc.

During my doctoral research, I have been focusing on a narrower section of this immense topic, namely the influence of high- or extremely high initial sugar concentration on the growth and metabolism of some wine-related yeast species. The poorly or non-defined properties of *S. bacillaris* were compared with the two most important and used *Saccharomyces* yeasts in various stress conditions.

As stress factor high- or extremely high initial sugar concentration was in the main focus. Besides, low temperature during fermentation was investigated on its own and in combination with sugar concentration. Moreover, the inhibition of medium-chain fatty acids was monitored independently from the earlier factors. As the last step in my research, in a pilot fermentation *S. bacillaris*- *S. cerevisiae* combined fermentation was examined.

The well-known traits of *S. bacillaris*, as outstanding osmotolerance, fructophilic behaviour, moderate ethanol-, high glycerol production, and its cold tolerance in 'general microbiological'-term are confirmed in this work. The cold tolerance of the species, in the oenologically relevant temperature range was found to be moderate, that is considerably weaker than in *S. uvarum*. Its osmotolerance was monitored in the above-mentioned temperature range, where the strong sugar tolerance was dominant at 12 °C, while at 6 °C its growth was reduced considerably.

The initial sugar induced-change in the metabolite profile of *S. bacillaris* proved to be different from that of the investigated *Saccharomyces* species. As an example, the moderate nitrogen demand and slight proline utilisation at the extremely high sugar level of *S. bacillaris* could be beneficial during co-culture fermentation, especially in high sugar, low nitrogen-containing musts.

The volatile acid production of *S. bacillaris* was described earlier as independent of the sugar level, while in this work due to the intraspecific variability both dependent and independent strains were observed. This trait, and in general the volume of the produced volatile acidity is not a strength of this non-*Saccharomyces* species.

*S. bacillaris* showed higher sensitivity towards medium-chain fatty acids than the investigated *Saccharomyces* yeasts, while an outstanding tolerance was found in case of *Zygosaccharomyces*

*bailii*. Since medium-chain fatty acids are planned to be used as inhibitory agents in oenology as well, during industrial application in the future this feature must be kept in mind.

Although the low ethanol and high glycerol production is highlighted in monoculture *S. bacillaris* fermentation, the species on its own is not capable of fermenting a grape juice completely. During combined fermentation, these beneficial properties and their manifestation were dependent on the compatibility of the co-fermenting strains. Moreover, the real level of contribution of *S. bacillaris*, as a non-robust, slow fermenter, in a co-fermentation is to be checked thoroughly.

All in all, *S. bacillaris* is a valuable starter candidate with multiple beneficial traits, although some of its limitations must be emphasized, especially during industrial applications. According to the findings of this thesis research, *S. bacillaris* could be quite a suitable participant in mixed culture fermentation, especially in the fermentation of high- or extreme sugar-containing, or even botrytized musts, obviously not without a wide strain compatibility-check.

# 8. MELLÉKLET

## M1. IRODALOMJEGYZÉK


Alonso, A., Belda, I., Santos, A., Navascues, E., Marquina, D. (2015). Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape musts. Food Control, 51, 129-134.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology, 215(3), 403-410.

Andorra, I., Berradre, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J. M., Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. European Food Research and Technology, 231(2), 215-224.

Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. Food Microbiology, 28(8), 1483-1491.

Andorra, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamon, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. Lwt-Food Science and Technology, 49(1), 8-13.

Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. Australian Journal of Grape and Wine Research, 15(1), 1-8.

Antunovics, Z., Csoma, H., Sipiczki, M. (2003). Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized Tokaj wines. Bull. O.I.V. 76, 380-397.

Arroyo-Lopez, F. N., Orlic, S., Querol, A., Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. International Journal of Food Microbiology, 131(2-3), 120-127.

Avbelj, M., Zupan, J., Kranjc, L., Raspor, P. (2015). Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A Symphony of ARO Genes and Aromatic Alcohols. [Article]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(38), 8544-8550.

Avbelj, M., Zupan, J., Raspor, P. (2016). Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(18), 7841-7852.

Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. European Food Research and Technology, 235(2), 303-313.

Babikova P., Baron M., Kumsta, M., Sotolar, R. (2012) Increasing the efficiency of sulfur dioxide in wine by using of saturated higher fatty acids. Acta Universitas. Agriculturae et Silviensis Mendelensis Brun., 60(1), 17-22.

Bagheri, B., Zambelli, P., Vigentini, I., Bauer, F. F., Setati, M. E. (2018). Investigating the Effect of Selected Non-*Saccharomyces* Species on Wine Ecosystem Function and Major Volatiles. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6.

Balikci, E. K., Tanguler, H., Jolly, N. P., Erten, H. (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. Yeast, 33(7), 313-321.

Balmaseda A., Bordons A., Reguant, C., Bautista-Gallego, J. (2018). Non-*Saccharomyces* in Wine: Effect Upon *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation. Frontiers in Microbiology, 9(534), 1-8.

Bánszky, L., Ujhelyi, G., Pomázi, A., Maráz, A. (2003). Population dynamics of *Candida stellata* during botrytized wine fermentation. In: 23rd International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Hungary. Diamond-Congress Ltd, Budapest, Book of Abstracts: 89.

Bardi, L., Crivelli, C., Marzona, M. (1998). Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. Canadian Journal of Microbiology, 44(12), 1171-1176.

Baron, M., Kumsta, M., Prokes, K., Tomaskova, L., Tomkova, M. (2017). The inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* population during alcoholic fermentation of grape must by octanoic, decanoic and dodecanoic acid mixture. Paper presented at the 40th World Congress of Vine and Wine, Sofia, Bulgaria.

Bauer, F.F., Pretorius I.S. (2000). Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. South African Journal of Enology and Viticulture, 21(Special Issue):27-51.

Beijerinck M. W. (1898). Ueber Regeneration der Sporenbildung bei Alkoholhefen wo diese Funktion im Verschwinden begriffen ist. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung 2, 4,721-730.

Belda, I., Navascues, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S. (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(4), 1911-1922.

Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. Fems Yeast Research, 4(6), 625-632.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I., Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. International Journal of Food Microbiology, 122(3), 312-320.

Bellut K., Arendt E. K. (2019). Chance and Challenge: Non-Saccharomyces Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. Journal of the American Society of Brewing Chemists- The Science of Beer, 77(2), 77-91.

Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbuhler, B., Schuttler, A., Ebert, K., Rauhut, D. (2016). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. European Food Research and Technology, 241(5), 707-717.

Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E., Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. Food Research International, 122, 432-442.

Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 50(1), 107-119.

Bisson, L. F., Karpel, J. E., Ramakrishnan, V., Joseph, L. (2007). Functional Genomics of Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Advances in Food and Nutrition Research, Vol 53, 53, 65-121.

Bokulich, N. A., Ohta, M., Richardson, P. M., Mills, D. A. (2013). Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. PLoS ONE, 8(6).

Brice, C., Cubillos, F. A., Dequin, S., Camarasa, C., Martinez, C. (2018). Adaptability of the Saccharomyces cerevisiae yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. PLoS ONE 13(2): e0192383.

Budroni M., Zara G., Ciani M., Comitini F. (2017). Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts. In Brewing Technology, Szerk. Kanauchi M., IntechOpen Ltd. London, Egyesült Királyság, 1291-1460.

Cabras P., Angioni A. (2000) Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4), 967–973.

Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., Ciani, M. (2016). Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-*Saccharomyces* Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine. Frontiers in Microbiology, 7.

Canonico, L., Comitini, F., Ciani, M. (2018). *Torulaspora delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. Food Microbiology, 74, 100-106. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.009

Capucho, I., Sanromao, M. V. (1994). Effect of ethanol and fatty-acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. Appllied Microbiology and Biotechnology, 42(2-3), 391-395.

Caruso, M., Capece, A., Salzano, G., Romano, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. Letters in Applied Microbiology, 34(5), 323-328.

Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 85(2), 159-164.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. Fems Yeast Research, 10(2), 123-133.

Ciani, M., Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. Current Opinion in Food Science, 1, 1-6.

Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. Frontiers in Microbiology, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00555

Commission Regulation (EC) No. 607/2009: Laying down certain detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No. 479/2008 as regards protected designations of origin and geographical indications, traditional terms, labelling and presentation of certain wine sector products Elérhető: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/ALL/?uri=CELEX%3A32009R0607 (2020.06.05.)

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. Food Microbiology, 28(5), 873-882.

Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. International Journal of Food Microbiology, 205, 7-15.

Csernus, O., Pomázi, A., Magyar, I. (2014). Isolation, characterisation and selection of wine yeast strains in Etyek-Buda wine district, Hungary. Acta Alimentaria, 43(3), 489-500.

Csoma, H., Sipiczki, M. (2008). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. Fems Yeast Research, 8(3), 509-509.

De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M. (2011). An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 99(2), 189-200.

Dellaglio, F., Zapparoli, G., Malacrino, P., Suzzi, G., Torriani, S. (2003). *Saccharomyces bayanus var. uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines. Annals of Microbiology, 53(4), 411-425.

Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J. L., Le Jeune, C. (2004). Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. Journal of Applied Microbiology, 97(6), 1140-1148.

Dettmer, K., Hammock, B. D. (2004). Metabolomics - A new exciting field within the "omics" sciences. Environmental Health Perspectives, 112(7), A396-A397.

Divol, B., Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. Journal of Applied Microbiology, 99(1), 85-93.

Domenech, G. R., Martinez, G. L., Barrera, E., Poblet, M., Rozes, N., Cordero-Otero, R. (2018). Enhancing the tolerance of the *Starmerella bacillaris* wine strain to dehydration stress. Annals of Microbiology, 68(10), 667-676.

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. International Journal of Food Microbiology, 147(3), 170-180.

Duarte, F. L., Pimentel, N. H., Teixeira, A., Fonseca, A. (2012). *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 102(4), 653-658.

Eder, M. L. R., Conti, F., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W., Rosa, A. L. (2019). *Vitis* species, vintage, and alcoholic fermentation do not drive population structure in *Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina)* species. Yeast, 36(6), 411-420.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina)* in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. International Journal of Food Microbiology, 199, 33-40.

Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Cocolin, L. (2016). *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(12), 5515-5526.

Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L. (2017). *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. Current Opinion in Food Science, 17, 30-35.

Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Dequin, S., Camarasa, C. (2018a). Specific Phenotypic Traits of *Starmerella bacillaris* Related to Nitrogen Source Consumption and Central Carbon Metabolite Production during Wine Fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 84(16).

Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Giacosa, S., Ortiz-Julien, A., Cocolin, L. (2018b). Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Research International, 109, 298-309.

Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Fracassetti, D., Cocolin, L. (2018c). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chemistry, 257, 350-360.

Englezos, V., Rantsiou, K., Giacosa, S., Segade, S. R., Rolle, L., Cocolin, L. (2019). Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starmerella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 289, 106-114.

Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R.T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G.A.N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., Wishart, D.S. (2019) NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. Metabolites. 9:123.

Eperjesi, I., Horváth, Cs., Sidlovits D., Pásti, Gy., Zilai, Z. (2010). Borészati Technológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Erasmus, D. J., Cliff, M., van Vuuren, H. J. J. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. American Journal of Enology and Viticulture, 55(4), 371-378.

Ferreira, J., Du Toit, M., Du Toit, W. J. (2006). The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. Australian Journal of Grape and Wine Research, 12(1), 50-56.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology, 48(1-2), 155-171.

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. Fems Yeast Research, 8(7), 979-995.

Fleet, G. H., Heard, G. M. (2003). Yeast growth during fermentation. In G.H. Fleet szerk. Wine microbiology and biotechnology. CRC Press, Boca Raton Fl, USA. 27-54.

Garcia-Marino, M., Trigueros, A., Escribano-Bailon, T. (2010). Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. Journal of Food Composition and Analysis, 23(5), 455-462.

Giaramida, P., Ponticello, G., Di Maio, S., Squadrito, M., Genna, G., Barone, E., Oliva, D. (2013). *Candida zemplinina* for Production of Wines with Less Alcohol and More Glycerol. South African Journal of Enology and Viticulture, 34(2), 204-211.

Giudici, P., Zambonelli, C., Passarelli, P., Castellari, L. (1995). Improvement Of Wine Composition With Cryotolerant *Saccharomyces* Strains. American Journal of Enology and Viticulture, 46(1), 143-147.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. Food Microbiology, 33(2), 271-281.

Gobert, A., Tourdot-Marechal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y. Z., Quintanilla-Casas, B., Alexandre, H. (2017). Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. Frontiers in Microbiology, 8, 13.

Godden, P., Wilkes, E., Johnson, D. (2015). Trends in the composition of Australian wine 1984-2014. Australian Journal of Grape and Wine Research, 21, 741-753.

Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schutz, B., Bansbach, M., Schafer, H., Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by $H^{-1}$ NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(23), 5610-5619.

Gonzalez, B., Mas, A., Beltran, G., Cullen, P. J., Torija, M. J. (2017). Role of Mitochondrial Retrograde Pathway in Regulating Ethanol-Inducible Filamentous Growth in Yeast. Frontiers in Physiology, 8.

Gonzalez, B., Vazquez, J., Cullen, P. J., Mas, A., Beltran, G., Torija, M. J. (2018a). Aromatic Amino Acid-Derived Compounds Induce Morphological Changes and Modulate the Cell Growth of Wine Yeast Species. Frontiers in Microbiology, 9.

Gonzalez, B., Vazquez, J., Morcillo-Parra, M. A., Mas, A., Torija, M. J., Beltran, G. (2018b). The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. Food Microbiology, 74, 64-74.

Gonzalez-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. European Food Research and Technology, 240(5), 999-1012.

Grangeteau, C., Gerhards, D., von Wallbrunn, C., Alexandre, N., Rousseaux, S., Guilloux-Benatier, M. (2016). Persistence of Two Non-*Saccharomyces* Yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the Cellar. Frontiers in Microbiology, 7.

Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N., Guillamon, J. M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. Food Microbiology 31(1):25-32.

Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., Dickinson, J. R. (2008). The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. Applied and Environmental Microbiology, 74(12), 3920-3920.

Henschke, P. A., Jiranek, V. (2003). Yeasts- metabolism of nitrogen compounds. In G.H. Fleet szerk. Wine microbiology and biotechnology. CRC Press, Boca Raton Fl, USA. 77-164.

Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. Australian Journal of Grape and Wine Research, 12(2), 150-160.

Hubmann, G., Guillouet, S., Nevoigt, E. (2011). Gpd1 and Gpd2 Fine-Tuning for Sustainable Reduction of Glycerol Formation in Saccharomyces cerevisiae. Applied and Environmental Microbiology, 77(17), 5857-5867.

International Organisation of Vine and Wine (2018). Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts (2 vol.) Elérhető: http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis (2020.06.05.)

Jackson, R. S. (2008). Wine Science Principles and Applications Introduction. Wine Science: Principles and Applications, 3rd Edition, 1-14.

James S. A., Collins M. D., Roberts I. N. (1996). Use of an rRNA Internal Transcribed Spacer Region To Distinguish Phylogenetically Closely Related Species of the Genera

*Zygosaccharomyces* and *Torulaspora.* International Journal of Systematic Bacteriology, 46(1), 189-194.

James, S. A., Stratford, M. (2003). Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In Boekhout T. és Robert V. szerk. Yeasts in Food, Elsevier Ltd. Amsterdam. Hollandia, 171–196.

Jemec, K. P., Raspor, P. (2005). Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite cultures dictates bioprocess kinetics. Food Microbiology, 22(4), 293-300.

Jewison, T., Knox, C., Neveu, V., Djoumbou, Y., Guo, A. C., Lee, J., Wishart, D. S. (2012). YMDB: the Yeast Metabolome Database. Nucleic Acids Research, 40(D1), D815-D820.

Jimenez-Marti, E., Gomar-Alba, M., Palacios, A., Ortiz-Julien, A., Olmo, M. L. (2011). Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must: relevance of the osmotic stress response. Applied Microbiology and Biotechnology, 89(5), 1551-1561.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A. (1995). Regulation of Hydrogen-Sulfide Liberation in Wine-Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen. Applied and Environmental Microbiology, 61(2), 461-467.

Jolly, N. P., Augustyn, O.P.R., Pretorius, I.S. (2003a). The Effect of Non-Saccharomyces Yeasts on Fermentation and Wine Quality. South African Journal of Enology and Viticulture. 24(2):55-62.

Jolly, N. P., Augustyn, O.P.R., Pretorius, I.S. (2003b). The Use of Candida pulcherrima in Combination with Saccharomyces cerevisiae for the Production of Chenin blanc Wine. South African Journal of Enology and Viticulture. 24(2):63-69.

Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non- *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. Fems Yeast Research, 14(2), 215-237.

Jones, G. V. (2012). Climate, Grapes, and Wine: Structure and Suitability in a Changing Climate. XXVIII. International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (2010). International Symposium on the Effect of Climate Change on Production and Quality of Grapevines and Their Products, 931, 19-28.

Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H. (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in greece. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21(8-9), 1599-1602.

Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 23(5), 735-739.

Kemsawasd, V., Viana, T., Ardo, Y., Arneborg, N. (2015). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(23), 10191-10207.

Kerényi Z. (2013). Tokaj. In: F. Mencarelli és P. Tonutti szerk. Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification. John Wiley & Sons; Oxford. 269–276.

Kim, D. H., Lee, S. B., Jeon, J. Y., Park, H. D. (2019). Development of air-blast dried non-*Saccharomyces* yeast starter for improving quality of Korean persimmon wine and apple cider. International Journal of Food Microbiology, 290, 193-204.

King, A., Dickinson, J. R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. Yeast, 16(6), 499-506.

Kovács M., Stuparevic I., Mrsa V., Maráz A. (2008). Characterization of Ccw7p cell wall proteins and the encoding genes of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains: relevance for flor formation. Fems Yeast Research, 8, 1115-1126.

Kovács E. (2014). Többváltozós adatelemzés. Typotex Kiadó Budapest.

Kumar, G. R., Ramakrishnan, V., Bisson, L. F. (2010). Survey of Hydrogen Sulfide Production in Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. American Journal of Enology and Viticulture, 61(3), 365-371.

Kun-Farkas G., Mecser M. (2018). Study of the fermentation abilities of *Torulaspora delbrueckii* yeast in a brewing environment. 3rd International Conference of Food Science and Technology. Budapest 2018. december 03-05. Abstract Booklet. ISBN 978-963-269-794-9.

Lemos-Junior, W. F., Duarte, V. D., Treu, L., Campanaro, S., Nadai, C., Giacomini, A., Corich, V. (2018). Whole genome comparison of two *Starmerella bacillaris* strains with other wine yeasts uncovers genes involved in modulating important winemaking traits. Fems Yeast Research, 18(7).

Lemos-Junior, W. J. F., Nadai, C., Crepalde, L. T., de Oliveira, V. S., de Matos, A. D., Giacomini, A., Corich, V. (2019). Potential use of *Starmerella bacillaris* as fermentation starter for the production of low-alcohol beverages obtained from unripe grapes. International Journal of Food Microbiology, 303, 1-8.

Lencioni, L., Taccari, M., Ciani, M., Domizio, P. (2018). *Zygotorulaspora florentina* and *Starmerella bacillaris* in multistarter fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to reduce volatile acidity of high sugar musts. Australian Journal of Grape and Wine Research, 24(3), 368-372.

Li, L. L., Ye, Y. R., Pan, L., Zhu, Y., Zheng, S. P., Lin, Y. (2009). The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. Biochemical and Biophysical Research Communications, 387(4), 778-783.

Liccioli, T., Chambers, P. J., Jiranek, V. (2011). A novel methodology independent of fermentation rate for assessment of the fructophilic character of wine yeast strains. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38(7), 833-843.

Lleixa, J., Martin, V., Portillo, M. D., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A. (2016). Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Frontiers in Microbiology, 7.

Lockshin L., Rasmussen, M. (2000). The Nature and Roles of a Wine Brand. Australia and New Zealand Wine Industry Journal, 15(4), 17–24.

Lopez-Malo, M., Querol, A., Guillamon, J. M. (2013). Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus var. uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. PLoS ONE, 8(3).

Lorenzo, C., Bordiga, M., Perez-Alvarez, E. P., Travaglia, F., Arlorio, M., Salinas, M. R., Garde-Cerdan, T. (2017). The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine. Food Research International, 99, 328-335.

Ma, M. G., Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(3), 829-845.

Magyar I. (1996). Study on the Yeast Flora of Tokaj Wine District. 11 th International Oenological Symposium, International Association for Winery Technology and Management, June 03-05, 1996. Proceedings. Breisach (Németország), 29-40.

Magyar I., Kardos, C., Pomázi, A., Maráz, A. (2000). Dynamics of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations during fermentation of Tokaj Aszu wines. VI -éme Symposium International d'Oenologie, Bordeaux, 10-12 Juin 1999. Proceedings in "Oenologie 99", Paris (Franciaország), 394-398.

Magyar, I., Bene, Z. (2006). Morphological and taxonomic study on mycobiota of noble rotted grapes in the Tokaj wine district. Acta Alimentaria, 35(2), 237-246.

Magyar I., Tóth T., Pomázi A. (2008a). Oenological characterization of indigenous yeasts involved in fermentation of Tokaji Aszú. Bull OIV. 2008;81:35–43.

Magyar I., Tóth T., Lavielle-Piot M. (2008b). Borból és mustból izolált *Zygosaccharomyces* törzsek glükóz és fruktóz hasznosításának vizsgálata, Borászati füzetek, 18(4), 7-12.

Magyar, I. (2011). Botrytized Wines. Advances in Food and Nutrition Research, Vol 63: Speciality Wines, 63, 147-206.

Magyar, I., Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata, Candida zemplinina, Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 28(1), 94-100.

Magyar, I., Nyitrai-Sardy, D., Lesko, A., Pomazi, A., Kallay, M. (2014). Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces* wine yeasts. International Journal of Food Microbiology, 178, 1-6.

Magyar I., Soós J. (2016). Botrytized wines – current perspectives. International Journal of Wine Research. 8:29-39.

Malacrino, P., Tosi, E., Caramia, G., Prisco, R., Zapparoli, G. (2005). The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress. Letters in Applied Microbiology, 40(6), 466-472.

Manfroi, L., Silva, P. H. A., Rizzon, L. A., Sabaini, P. S., Gloria, M. B. A. (2009). Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. Food Chemistry, 116(1), 208-213.

Marks, V. D., van der Merwe, G. K., van Vuuren, H. J. J. (2003). Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. Fems Yeast Research, 3(3), 269-287. doi: 10.1016/s1567-1356(02)00201-5

Martini, A. (1992). Biodiversity and Conservation of Yeasts. Biodiversity and Conservation, 1(4), 324-333.

Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D. (2010). Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus var. uvarum* wine yeast strains. International Journal of Food Microbiology, 139(1-2), 79-86.

Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Albertin, W. (2015). The yeast *Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina)* shows high genetic diversity in winemaking environments. Fems Yeast Research, 15(5).

Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. International Journal of Food Microbiology, 157(2), 245-250.

Mendoza, L. M., de Nadra, M. C. M., Farias, M. E. (2007). Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. Biotechnology Letters, 29(7), 1057-1063.

Michel M., Meier-Dörnberg T., Jacob F., Methner F. J., Wagner R. S., Hutzler M. (2016). Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. Journal of the Institute of Brewing, 122(4), 569-587.

Mills, D. A., Johannsen, E. A., Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 68(10), 4884-4893.

Morata, A., Suarez-Lepe, J.A. (2016). New biotechnologies for wine fermentation and ageing. In Advances. In Food Biotechnology, Szerk. Ravishankar Rai, V., John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex, UK, pp. 287–301.

Mortimer, R., Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. Research in Microbiology, 150(3), 199-204.

Muratore, G., Asmundo, C. N., Lanza, C. M., Caggia, C., Licciardello, F., Restuccia, C. (2007). Influence of *Saccharomyces uvarum* on volatile acidity, aromatic and sensory profile of Malvasia delle Lipari wine. Food Technology and Biotechnology, 45(1), 101-106.

Naumov, G. I., Masneuf, I., Naumova, E. S., Aigle, M., Dubourdieu, D. (2000). Association of *Saccharomyces bayanus var. uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. Research in Microbiology, 151(8), 683-691.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., Antunovics, Z., Sipiczki, M. (2002). *Saccharomyces bayanus var. uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. Applied Microbiology and Biotechnology, 59(6), 727-730. doi: 10.1007/s00253-002-1077-6

Naumov, G. I., Naumova, E. S., Martynenko, N. N., Masneuf-Pomarede, I. (2011). Taxonomy, Ecology, and Genetics of the Yeast *Saccharomyces bayanus*: A New Object for Science and Practice. Microbiology, 80(6), 735-742.

Naumova, E. S., Naumov, G. I., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M., Dubourdieu, D. (2005). Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. Yeast, 22(14), 1099-1115.

Neumann, P. A., Matzarakis, A. (2014). Potential climate change impacts on winegrape must density and titratable acidity in southwest Germany. Climate Research, 59(2), 161-172.

Nisiotou, A., Spiropoulos, A. E., Nychas, G. J. E. (2007). Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 73(21), 6705-6713.

Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C. S., Michaelidis, C., Tassou, C., Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. Food Research International, 111, 498-508.

Noda-Garcia, L., Liebermeister, W., & Tawfik, D. S. (2018). Metabolite-Enzyme Coevolution: From Single Enzymes to Metabolic Pathways and Networks. Annual Review of Biochemistry, Vol 87, 87, 187-216.

Ohta, E., Nakayama, Y., Mukai, Y., Bamba, T., Fukusaki, E. (2016). Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 121(4), 399-405.

Palma, M., Guerreiro, J. F., Sa-Correia, I. (2018). Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological Genomics Perspective. Frontiers in Microbiology, 9.

Peng, C. T., Viana, T., Petersen, M. A., Larsen, F. H., Arneborg, N. (2018). Metabolic footprint analysis of metabolites that discriminate single and mixed yeast cultures at two key time-points during mixed culture alcoholic fermentations. Metabolomics, 14(7). doi: 10.1007/s11306-018-1391-3

Pereira, F. B., Guimaraes, P. M. R., Gomes, D. G., Mira, N. P., Teixeira, M. C., Sa-Correia, I., Domingues, L. (2011). Identification of candidate genes for yeast engineering to improve bioethanol production in very high gravity and lignocellulosic biomass industrial fermentations. Biotechnology for Biofuels, 4.

Pereira, G. V. D., Neto, D. P. D., Junqueira, A. C. D., Karp, S. G., Letti, L. A. J., Magalhaes, A. I., Soccol, C. R. (2019). A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. Food Reviews International.

Perez-Torrado, R., Oliveira, B. M., Zemancikova, J., Sychrova, H., Querol, A. (2016). Alternative Glycerol Balance Strategies among *Saccharomyces* Species in Response to Winemaking Stress. Frontiers in Microbiology, 7.

Peters K, Thevelein J. M. (2014). Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism. In Piskur J. és Compagno C. szerk., Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism, Springer Verlag, Berlin, Németország, 21-57.

Pfliegler, W. P., Horvath, E., Kallai, Z., Sipiczki, M. (2014). Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis. Microbiological Research, 169(5-6), 402-410.

Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. Food Microbiology, 21(4), 439-447.

PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent Protocol (2001) Applied Biosystems, NY, USA.

Prior, K. J., Bauer, F. F., Divol, B. (2019). The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. Food Microbiology, 79, 75-84.

Pulvirenti, A., Nguyen, H. V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C. (2000). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. Fems Microbiology Letters, 192(2), 191-196.

Quiros, M., Rojas, V., Gonzalez, R., Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. International Journal of Food Microbiology, 181, 85-91.

Radler F. (2003). Metabolism of organic acids. In G.H. Fleet szerk. Wine microbiology and biotechnology. (1993). Harwood Academic Publishers, Sydney, Australia. 165-183.

Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J. E., Pulvirenti, A., Giudici, P. (1999). *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. Fems Microbiology Letters, 177(1), 177-185.

Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Cocolin, L. (2012). *Candida zemplinin*a Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces* cerevisiae in Sweet Wine Fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 78(6), 1987-1994.

Rantsiou, K., Campolongo, S., Alessandria, V., Rolle, L., Torchio, F., Cocolin, L. (2013). Yeast populations associated with grapes during withering and their fate during alcoholic fermentation of high-sugar must. Australian Journal of Grape and Wine Research, 19(1), 40-46.

Rantsiou, K., Englezos, V., Torchio, F., Risse, P. A., Cravero, F., Gerbi, V., Cocolin, L. (2017). Modeling of the Fermentation Behavior of *Starmerella bacillaris*. American Journal of Enology and Viticulture, 68(3), 378-385.

Remize, F., Barnavon, L., Dequin, S. (2001). Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering, 3(4), 301-312.

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernandez-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 134(3), 201-210.

Restrepo S., Espinoza L., Ceballos A., Urtubia A. (2019) Production of Fatty Acids during Alcoholic Wine Fermentation under Selected Temperature and Aeration Conditions. American Journal of Enology and Viticulture,70, 169-176.

Ribereau-Gayon P. (2006). Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Wine Yeasts. In Ribereau-Gayon P. szerk., Handbook of enology Wiley and Sons Ltd. New York, USA. f53-79.

Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., Grossmann, M. (2016). Usage of different aerobic non-*Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. European Food Research and Technology, 242(12), 2051-2070.

Rodrigues, A. J., Raimbourg, T., Gonzalez, R., Morales, P. (2016). Environmental factors influencing the efficacy of different yeast strains for alcohol level reduction in wine by respiration. Lwt-Food Science and Technology, 65, 1038-1043.

Rodriguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., Caballero, A. C. (2010). Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. International Journal of Food Microbiology, 138(1-2), 19-25.

Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Segade, S. R., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2018). Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: a comparative study. Australian Journal of Grape and Wine Research, 24(1), 62-74.

Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B. (2018). Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. Frontiers in Microbiology, 9(196), 1-12.

Romano, P., Marchese, R. (1998). Metabolic characterization of *Kloeckera apiculata* strains from star fruit fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 73(4), 321-325.

Romano, P., Suzzi, G. (2003). In G.H. Fleet szerk. Wine microbiology and biotechnology. CRC Press, Boca Raton Fl, USA. 77-164.

Rosa, A. L., Miot-Sertier, C., Laizet, Y., Salin, F., Sipiczki, M., Bely, M., Albertin, W. (2018). Draft Genome Sequence of the *Starmerella bacillaris (syn., Candida zemplinina)* Type Strain CBS 9494. Microbiology Resource Announcements, 7(3).

Rossouw, D., Heyns, E. H., Setati, M. E., Bosch, S., Bauer, F. F. (2013). Adjustment of Trehalose Metabolism in Wine Saccharomyces cerevisiae Strains To Modify Ethanol Yields. 79(17):5197-5207.

Rossouw, D., Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. Food Microbiology, 55, 32-46.

Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V. (2019). Non-Saccharomyces Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture. 10:1-13.

Rul, F., Monnet, V. (2015). How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality. Current Opinion in Food Science, 2, 100-105.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamon, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiological Research, 157(4), 267-274.

Sadoudi, M., Tourdot-Marechal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacon, J. J., Ballester, J., Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Food Microbiology, 32(2), 243-253.

Santos, J., Sousa, M. J., Carcloso, H., Inacio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., Leao, C. (2008). Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. Microbiology-Sgm, 154, 422-430.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". Nature methods. 9(7): 671-675.

Selye, J., Bajusz, E. (1960). A stress-kutatás újabb eredményei és a stress-elmélet szerepe a modern kórtani munkában. Athenaeum Ny., Budapest. 1-2.

Sipiczki, M. (2003). *Candida zemplinina* sp nov., an osmotolerant an psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 2079-2083.

Sipiczki, M. (2004). Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. Journal of Basic Microbiology, 44(6), 471-479.

Sipiczki, M., Csoma, H., Antunovics, Z., Pfliegler, W. (2010). Biodiversity in yeast populations associated with botrytised wine making. Mitteilungen Klosterneuburg, 60(3), 387-394.

Sipiczki, M. (2019). Yeast two- and three-species hybrids and high-sugar fermentation. Microbial Technology. 0(0):1-8.

Snoek, T., Verstrepen, K. J., Voordeckers, K. (2016). How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? Current Genetics, 62(3), 475-480.

Son, H. S., Hwang, G. S., Kim, K. M., Kim, E. Y., van den Berg, F., Park, W. M., Hong, Y. S. (2009). $H^{-1}$ NMR-Based Metabolomic Approach for Understanding the Fermentation Behaviors of Wine Yeast Strains. Analytical Chemistry, 81(3), 1137-1145.

Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, 109(1), 13-24.

Stribny, J., Gamero, A., Perez-Torrado, R., Querol, A. (2015). *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of

aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. International Journal of Food Microbiology, 205, 41-46.

Suzzi, G., Schirone, M., Sergi, M., Marianella, R. M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Tofalo, R. (2012). Multistarter from organic viticulture for red wine Montepulciano d'Abruzzo production. Frontiers in Microbiology, 3.

Szőke, B., Farkas, T., Gerőcs, A., Nemesi-Barnás, K., Olasz, F., Májer, J. (2015). A Balatoni Borrégió borainak helyi jellegét kiemelő új élesztő starterkultúrák létrehozása és a borászati technológiába illesztése. Borászati Füzetek. Különkiadvány:58-61.

Taillandier, P., Portugal, F. R., Fuster, A., Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. Food Microbiology, 24(1), 95-100.

Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 30(7), 1959-1967.

Ter Schure, E. G., van Riel, N. A. W., Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Fems Microbiology Reviews, 24(1), 67-83.

Teslic, N., Patrignani, F., Ghidotti, M., Parpinello, G. P., Ricci, A., Tofalo, R., Versari, A. (2018a). Utilization of 'early green harvest' and non-*Saccharomyces* cerevisiae yeasts as a combined approach to face climate change in winemaking. European Food Research and Technology, 244(7), 1301-1311.

Teslic, N., Zinzani, G., Parpinello, G. P., Versari, A. (2018b). Climate change trends, grape production, and potential alcohol concentration in wine from the "Romagna Sangiovese" appellation area (Italy). Theoretical and Applied Climatology, 131(1-2), 793-803.

Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. Food Microbiology, 29(1), 18-26.

Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 79(3-4), 345-352.

Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamon, J. M., Mas, A., Rozes, N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. International Journal of Food Microbiology, 85(1-2), 127-136.

Torriani, S., Zapparoli, G., Suzzi, G. (1999). Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces* sensu stricto strains isolated from Amarone wine - Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 75(3), 207-215.

Tosi, E., Azzolini, M., Guzzo, F., Zapparoli, G. (2009). Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine. Journal of Applied Microbiology, 107(1), 210-218.

Tóth-Márkus, M., Magyar, I., Kardos, K., Banszky, L., Maraz, A. (2002). Study of Tokaji Aszu wine flavour by solid phase microextraction method. Acta Alimentaria, 31(4), 343-354.

Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., Grieco, F. (2016). The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. Frontiers in Microbiology, 7.

Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-Lopez, F. N., Barrio, E., Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces wine* species and their hybrids during grape juice fermentation. International Journal of Food Microbiology, 134(3), 237-243.

Varela, J., Varela, C. (2016). Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration. Current Opinion in Biotechnology, 56, 88-96.

Valera, M. J., Morcillo-Parra, M. A., Zagorska, I., Mas, A., Beltran, G., Torija, M. J. (2019). Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. International Journal of Food Microbiology, 289, 174-181.

van Breda, V., Jolly, N., van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. International Journal of Food Microbiology, 163(2-3), 80-88.

Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1998). 44 - Saccharomyces Meyen ex Reess. In. C. P. Kurtzmann és J. W. Fell szerk. The Yeasts (Fourth Edition) A Taxonomic Study. 358-371.

Viegas, C. A., Rosa, M. F., Sacorreia, 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.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology. 77:145–157.

Vilela, A. (2019). Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. Fermentation-Basel, 5(1).

Wang, Y. Q., Ye, D. Q., Zhu, B. Q., Wu, G. F., Duan, C. Q. (2014). Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. Food Chemistry, 163, 6-15.

Wang, Y. Q., Ye, D. Q., Liu, P. T., Duan, L. L., Yan, G. L. (2016). Synergistic effects of branched-chain amino acids and phenylalanine addition on major volatile compounds in wine during alcoholic fermentation. South African Journal of Enology and Viticulture, 37(2), 169-175.

Zamora F. (2014). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In Piskur J. és Compagno C. szerk., Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism, Springer Verlag, Berlin, Németország 3-23.

Zagorc, T., Maraz, A., Cadez, N., Jemec, K. P., Peter, G., Resnik, M., Raspor, P. (2001). Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. Food Microbiology, 18(4), 441-451.

Zhang, B. Q., Shen, J. Y., Duan, C. Q., Yan, G. L. (2018). Use of Indigenous *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia pulcherrima* Co-fermentation With *Saccharomyces cerevisiae* to Improve the Aroma Diversity of Vidal Blanc Icewine. Frontiers in Microbiology, 9.

Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M. F., Andrich, G. (2013). Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 115(1), 43-49.

Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M. F., Andrich, G. (2014). A Mathematical Model to Evaluate the Kinetics of D-glucose and D-fructose Fermentations by *Saccharomyces bayanus* at Increasing Ethanol Concentrations. South African Journal of Enology and Viticulture, 35(1), 114-124.

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. International Journal of Food Microbiology, 151(2), 210-215.

Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Sergan, M., Raspor, P. (2013). Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(10), 2496-2505.

**M2. A dolgozat kísérleteinek törzs használata**

M1. táblázat: A kísérleti munkában felhasznált törzsekkel a dolgozatban elvégzett tanulmányok (az előkísérletektől eltekintve)

| Élesztő faj | Törzs | Hőmérséklet stressz | Cukor stressz | Kombinált HxC stressz* | MCFA stressz | Intrecelluláris glicerin képz. | Metabolikus profil vizsg. | Félüzemi erjesztés |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S cerevisiae* | Uvaferm®PM | + | + | + | + | + | + | - |
| | RA100 | + | - | - | + | - | + | - |
| | SC57 | + | - | - | - | - | + | - |
| | Uvaferm®228 | - | - | - | + | - | + | + |
| | S701 | - | - | - | + | - | + | - |
| | SB12 | + | - | - | - | - | + | - |
| | PM321 | - | - | - | + | - | - | - |
| *S. uvarum* | CBS395$^{T}$ | + | + | - | + | - | + | - |
| | SB42 | - | - | - | + | - | + | - |
| | S103 | + | - | + | + | + | + | - |
| | TKH1 | - | - | - | + | - | - | - |
| | E105 | - | - | - | + | - | - | - |
| *S. bacillaris* | Y1667$^{T}$ | + | + | + | + | - | + | - |
| | Y1756 | + | + | + | + | + | + | + |
| | MLO | + | + | + | + | - | + | - |
| | ROYAL1 | - | - | - | + | - | - | - |
| | SJ1 | - | - | - | + | - | - | - |
| *Z. bailii* | Y954$^{T}$ | - | - | - | + | - | - | - |
| | Z6 | - | - | - | + | - | - | - |
| | Z22 | - | - | - | + | - | - | - |
| | PM614 | - | - | - | + | - | - | - |
| | DS3 | - | - | - | + | - | - | - |

*HxC= hőmérséklet és cukor kombinált stressz

**M3. A statisztikai próbák rövid leírása és feltétel vizsgálata**

- Erjedési hőmérséklet stressz:

A maximális sejtkoncentráció és a fajlagos szaporodási sebességi maximum elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 3 különböző erjedési hőmérséklet és 3 élesztő faj. Fajonként egy törzs két párhuzamosának elemzése.

A törzsek maximális sejtkoncentrációjának, erjesztési hőmérséklet szerinti összehasonlításakor a reziduumok normalitása teljesül Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(9)=0,890$; $p=0,198$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem mindig teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: 6 °C-on Levene teszt alapján ($F(4;10)= 9,053$; $p=0,002$); 12 °C-on Levene teszt alapján ($F(4;10)= 0,912$; $p=0,493$); 20 °C-on Levene teszt alapján ($F(4;10)= 1,772$; $p=0,211$). Az ANOVA eredménye törzsek és hőfok szerint: 6 °C-on $F(4;10)= 4,716$; $p<0,05$; 12 °C-on $F(4;10)= 9,029$; $p<0,05$; 20°C-on $F(4;10)= 15,971$; $p<0,05$.

A fajok fajlagos szaporodási sebesség maximumának, erjesztési hőmérséklet szerinti összehasonlításakor reziduumok normalitása teljesül Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(9)=0,900$; $p=0,250$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem mindig teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: 6 °C-on Levene teszt alapján ($F(4;10)= 2,105$; $p=0,155$); 12 °C-on Levene teszt alapján ($F(4;10)= 3,831$; $p=0,039$); 20 °C-on Levene teszt alapján ($F(4;10)= 2,440$; $p=0,115$). Az ANOVA eredménye törzsek és hőfok szerint: 6 °C-on $F(4;10)= 6,244$; $p<0,05$; 12 °C-on $F(4;10)= 2,639$; $p=0,97$; 20 °C-on $F(4;10)= 234,882$; $p<0,05$.

A fajok szerinti vizsgálat esetén a fajlagos szaporodási sebesség maximumának reziduumainak normalitása teljesül Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(9)=0,900$; $p=0,250$), maximális sejtszám reziduumainak normalitása teljesül Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(9)=0,890$; $p=0,198$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem mindig teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: *S. cerevsiaie* Levene teszt alapján ($F(2,6)= 2,450$; $p=0,167$); *S. uvarum* Levene teszt alapján ($F(2,6)=9,257$; $p=0,015$); Y1667 Levene teszt alapján ($F(2,6)= 0,716$; $p=0,526$), Y1756 Levene teszt alapján ($F(2,6)= 1,895$; $p=0,230$), MLO Levene teszt alapján ($F(2,6)= 1,895$; $p=0,230$). Az ANOVA eredménye: *S. cerevsiaie* ($F(2,6)= 487,122$; $p<0,05$); *S. uvarum* ($F(2,6)=47,061$; $p<0,05$); Y1667 ($F(2,6)=1644,041$; $p<0,05$), Y1756 ($F(2,6)= 793,243$; $p<0,05$), MLO ($F(2,6)= 535,017$; $p<0,05$).

- Kiindulási cukortartalom jelentette stressz

A maximális sejtkoncentráció és a fajlagos szaporodási sebességi maximum elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 3 különböző kiindulási cukor koncentráció és 3 élesztő faj. Fajonként egy törzs három párhuzamosának elemzése.

A törzsek maximáls sejtkoncentrációjának, cukortartalom szerinti összehasonlításakor a reziduumok normalitása teljesül a ferdeség (0,002) és csúcsosság (0,929) alapján. A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül: 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 1,760$; $p=0,213$); 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 2,514$; $p=0,108$); 320 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 2,198$; $p=0,142$). Az ANOVA eredménye törzsek és hőfok szerint: 220 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 533,828$; $p<0,05$; 270 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 189,369$; $p<0,05$; 320 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;15)= 332,704$; $p<0,05$.

A törzsek fajlagos szaporodási sebesség maximumának, cukortartalom szerinti összehasonlításakor reziduumok normalitása teljesül a ferdeség és standard hibájának hányadosa (0,659), valamint a csúcsosság és standard hibájának hányadosa alapján (1,897) alapján. A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül: 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 0,182$; $p=0,942$); 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 0,397$; $p=0,807$); 320 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 3,592$; $p=0,060$). Az ANOVA eredménye törzsek és hőfok szerint: 220 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 15,598$; $p<0,05$; 270 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 12,557$; $p<0,05$; 320 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 9,488$; $p<0,05$.

A törzsek generációs idejének, cukortartalom szerinti összehasonlításakor reziduumok normalitása teljesül a ferdeség és standard hibájának hányadosa (1,390), valamint a csúcsosság és standard hibájának hányadosa alapján (1,512) alapján. A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül: 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 12,649$; $p=0,010$); 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 5,425$; $p=0,014$); 20 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(4;13)= 3,608$; $p=0,045$). Az ANOVA eredménye törzsek és hőfok szerint: 220 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 64,960$; $p<0,05$; 270 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 3669,418$; $p<0,05$; 320 g/L kiindulási cukortartalom $F(4;13)= 16000,901$; $p<0,05$.

- Az erjedési hőmérséklet és a kiindulási cukortartalom kombinált hatása a növekedésre

A Drop-teszt alapján megállapított növekedési % elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 7 különböző kiindulási cukorkoncentráció, 3 különböző erjedési hőmérséklet és 3 élesztő faj. Fajonként egy törzs (vagy *S. bacillaris* esetén 3 törzs átlaga) három párhuzamosának elemzése. Valamint a *S. bacillaris* esetén a Drop-teszt alapján megállapított növekedési % elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 7 különböző kiindulási cukorkoncentráció, 3 különböző erjedési hőmérséklet és 3 *S. bacillaris* törzs.

A fajok hőfok szerinti összehasonlításakor Box-Cox transzformációt (0,7) követően reziduumok normalitása teljesül a ferdeség (-0,619) és csúcsosság (0,410) alapján. A homogenitás esetenként feltétele sérül, ezért Games-Howell Post Hoc összehasonlítást alkalmazok: 6 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,751$; $p=0,493$); 6°C, 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15= 0,078$; $p=0,925$); 6 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 3,592$; $p=0,060$); 6 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,325$; $p=0,729$); 6 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 12,490$; $p<0,001$); 6 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 2,080$; $p=0,168$); 12 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,938$; $p=0,418$); 12 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 2,325$; $p=0,140$); 12 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,364$; $p=0,702$); 12 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,213$; $p=0,811$); 12 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 1,443$; $p=0,275$); 12 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 2,100$; $p=0,165$); 20 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 8,045$; $p<0,001$); 20 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,760$; $p=0,489$); 20 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 1,497$; $p=0,263$); 20 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 4,558$; $p<0,01$); 20 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 4,336$; $p<0,001$); 20 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján ($F(2;15)= 0,724$; $p=0,505$). A fajokat hőfok és kiindulási cukortartalom szerint összehasonlító ANOVA eredménye: $F(1)= 132,575$; $p<0,05$, valamint a tényezők közti interakció szignifikáns ($F(28;288)=11,059$; $p<0,05$), ezért a tényezőket szintenként is teszteltem. Az ANOVA eredménye kiindulási cukortartalom és hőfok szerint: 6 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 9,832$; $p<0,05$; 6 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15= 23,643$; $p<0,05$; 6 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 3,577$; $p<0,05$; 6 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 20,352$; $p<0,05$; 6 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 12,490$; $p<0,001$; 6 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 3,581$; $p<0,05$; 12 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 3,321$; $p<0,05$; 12 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 2,525$; $p=0,496$; 12 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 36,668$; $p<0,05$; 12 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 10,968$; $p<0,05$; 12 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 22,215$; $p<0,05$; 12 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 89,950$; $p<0,05$; 20 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 1,789$; $p=0,207$; 20 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 3,831$; $p<0,05$; 20 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 6,334$; $p<0,05$; 20 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom $F(2;15)= 10,926$; $p<0,05$; 20 °C,

420 g/L kiindulási cukortartalom F(2;15)= 12,572; p<0,05; 20 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom F(2;15)= 16,006; p<0,05.

A *S. bacillaris* törzsenkénti összehasonlítása 20 °C-on szintén Box-Cox transzformációt (0,7) követően történt, ahol a reziduumok normalitása teljesül a ferdeség (-0,619) és csúcsosság (0,410) alapján. A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül: 20 °C, 25 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 4,805;p=0,020); 20 °C, 220 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 4,284;p=0,028); 20 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 0,530;p=0,717); 20 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 0,454;p=0,767); 20 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 7,382;p=0,005); 20 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 1,927;p=0,182); 20 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom Levene teszt alapján (F(2;9)= 0,275;p=0,888). Az ANOVA eredménye *S. bacillaris* törzsenkénti összehasonlítása 20 °C-on: 20 °C 25 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)=1,895;p=0,188; 20C, 220 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)= 1,504;p=0,273; 20 °C, 270 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)= 4,125;p=0,310; 20 °C, 320 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)= 12,577; p<0,05; 20 °C, 370 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)= 8,649; p<0,05;20 °C, 420 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)= 5,311; p<0,05; 20 °C, 470 g/L kiindulási cukortartalom F(2;9)= 21,692;p<0,05.

- Közepes szénláncú zsírsav stressz

A Drop-teszt alapján megállapított növekedési % elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 5 különböző MCFA koncentráció, és 4 élesztő faj. Fajonként öt törzs három párhuzamosával történt a vizsgálat. Valamint a Drop-teszt alapján megállapított növekedési % elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 5 különböző MCFA koncentráció, és 20 élesztő törzs. Törzsenként három párhuzamossal történt a vizsgálat.

A növekedést faj/törzs és MCFA koncentráció szerint összehasonlító ANOVA eredménye: F(12;280)= 16,397; p<0,05, valamint a tényezők közti interakció szignifikáns (F(1)=7767,102; p<0,05), ezért a tényezőket szintenként is teszteltem.

0 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált fajok eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(60)=0,986; p=0,711). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok (F(3;56)=2,986; p<0,05). ). Az ANOVA eredménye (F(3;56)=0,199; p=0,897).

10 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált fajok eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(60)=0,976; p=0,272). A homogenitás feltétele

Levene teszt alapján teljesül (F(3;56)=1,980; p=0,127). Az ANOVA eredménye (F(3;56)=38,853; p<0,05).

20 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált fajok eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(60)=0,986; p=0,724). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(3;56)=4,131; p<0,05). Az ANOVA eredménye (F(3;56)=38,787; p<0,05).

40 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált fajok eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(60)=0,963; p=0,067). A homogenitás feltétele Levene teszt nem teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok (F(3;56)=10,662; p<0,05). Az ANOVA eredménye (F(3;56)=8,866; p<0,05).

80 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált fajok eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak a ferdeség és standard hibájának hányadosa (2,43), valamint a csúcsosság és standard hibájának hányadosa alapján (2,49) alapján. A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok (F(3;56)=26,833; p<0,05). Az ANOVA eredménye (F(3;56)=180,100; p<0,05).

0 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,906; p=0,118). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,248; p=0,904). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=0,062; p=0,992).

0 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. uvarum* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,973; p=0,901). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=1,374; p=310). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=0,024; p=0,999).

0 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. bacillaris* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,943; p=0,417). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,450; p=0,770). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,450; p=0,770). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=0,110; p=0,976).

0 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *Z. bailii* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,979; p=0,960). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=1,249; p=0,351). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=1,022; p=0,442).

10 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,936; p=0,330). A homogenitás

feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,704; p=0,607). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=0,001; p=1,000).

10 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. uvarum* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,976; p=0,931). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,770; p=0,569). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=1,449; p=288).

10 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. bacillaris* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,960; p=0,693). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,736; p=0,588). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=4,214; p<0,05).

10 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *Z. bailii* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,925; p=0,232). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=3,045; p=0,070). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=3,026; p=0,071).

20 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,896; p=0,082). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,380; p=0,818). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=4,514; p<0,05).

20 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. uvarum* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,932; p=0,289). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=1,203; p=0,368). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=0,670; p=0,627).

20 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. bacillaris* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,918; p=0,179). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=2,730; p=0,090). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=5,723; p<0,05).

20 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *Z. bailii* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,979; p=0,959). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,973; p=0,464). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=7,777; p<0,05).

40 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}$(15)=0,954; p=0,597). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül (F(4;10)=0,619; p=0,659). Az ANOVA eredménye (F(4;10)=4,194; p<0,05).

40 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. uvarum* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(15)=0,930$; $p=0,270$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem teljesül ($F(4,10;)=5,559$; $p<0,05$), ezért Games-Howell Post Hoc analízist alkalmaztam. Az ANOVA eredménye ($F(4;10)=5,373$; $p<0,05$).
40 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. bacillaris* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(15)=0,932$; $p=0,291$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(4;10)=0,244$; $p=0,907$). Az ANOVA eredménye ($F(4;10)=2,346$; $p=0,125$).
40 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *Z. bailii* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(15)=0,956$; $p=0,623$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(4;10)=1,064$; $p=0,423$). Az ANOVA eredménye ($F(4;10)=8,934$; $p<0,05$).
80 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *S. cerevisiae* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(15)=0,967$; $p=0,807$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(4;10)=0,796$; $p=0,554$). Az ANOVA eredménye ($F(4;10)=10,807$; $p<0,05$).
80 mg/L MCFA szint mellett a vizsgált *Z. bailii* törzsek eltérő növekedésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(15)=0,971$; $p=0,866$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(4;10)=1,554$; $p=0,260$). Az ANOVA eredménye ($F(4;10)=12,074$; $p<0,05$).

- Intracelluláris glicerin menedzsment

A sejten belüli és kívül glicerin koncentráció elemzése ANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 4 különböző mintavételi időpont és 3 élesztő faj. Fajonként egy törzs két párhuzamosával történt a vizsgálat.
UVAFERM®PM 72 óra alatti intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján teljesül ($K_{SW}(8)=0,919$; $p=0,281$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem teljesül , ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok ($F(3;12)=4,591$; $p<0,038$). Az ANOVA eredménye ($F(3;12)=71,361$; $p<0,05$).
S103 72 óra alatti intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(8)=0,926$; $p=0,338$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(3;12)=1,859$; $p=0,215$). Az ANOVA eredménye ($F(3;12)=38,286$; $p<0,05$).
Y1756 72 óra alatti intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(8)=0,942$; $p=0,529$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(3;12)=0,252$; $p=0,858$). Az ANOVA eredménye ($F(3;12)=1,552$; $p=0,275$).

A vizsgált törzsek 0. órában intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,938$; $p=0,561$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=1,094$; $p=0,393$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=49,849$; $p<0,05$).
A vizsgált törzsek 4. órában intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,940$; $p=0,585$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=1,783$; $p=0,247$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=9,065$; $p<0,05$).
A vizsgált törzsek 24. órában intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,906$; $p=0,287$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=6,161$; $p<0,05$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=353,387$; $p<0,05$).
A vizsgált törzsek 72. órában intracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,941$; $p=0,592$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján nem teljesül, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok ($F(2;9)=1,554$; $p=0,260$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=65,970$; $p<0,05$).
A vizsgált törzsek 72. órában extracelluláris glicerin termelésének reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,924$; $p=0,427$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,263$; $p=0,777$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=55,702$; $p<0,05$).

- Metabolikus profil vizsgálat

Az etanol, glicerin, illósav, fogyott almasav, borostyánkősav koncentrációjának elemzése MANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 2 eltérő kiindulási cukortartalom és 3 élesztő faj, vagy 12 élesztő törzs. Fajonként három törzs három párhuzamosával történt a vizsgálat.
A 220 g/L cukortartalmon a vizsgált fajok főbb metabolitjai Box- Cox (0,2) transzfomációt, Winzorizációt követően sem egy, sem több dimenziós outlierrel nem rendelkeznek. Egy dimenziós eloszlásuk Shapiro-Wilk teszt alapján normális: alkohol tartalom ($K_{SW}(36)=0,955$; $p=0,152$); glicerin tartalom ($K_{KS}(36)=0,943$; $p=0,064$); illósav tartalom ($K_{SW}(36)=0,971$; $p=0,447$); fogyott YAN tartalom ($K_{SW}(36)=0,957$; $p=0,173$); arginin tartalom ($K_{KS}(36)=0,957$; $p=0,177$); G/F tartalom ($K_{KS}(36)=0,950$; $p=0,105$); fogyott almasav tartalom ($K_{SW}(36)=0,965$; $p=0,301$); borostyánkősav tartalom ($K_{SW}(36)=0,955$; $p=0,155$); glükóz koncentráció ($KKS(36)=0,143$; $p=0,059$); fruktóz koncentráció ($K_{SW}(36)=0,128$; $p=0,143$) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol tartalom ($F(2;33)=2,807$; $p=0,075$); glicerin tartalom ($F(2;33)=2,961$; $p=0,066$); illósav tartalom ($F(2;33)=3,464$; $p<0,05$); YAN tartalom ($F(2;33)=10,700$; $p<0,05$); arginin tartalom ($F(2;33)=2,223$; $p=0,124$); G/F arány ($F(2;33)=9,957$; $p<0,05$); almasav tartalom ($F(2;33)=1,760$; $p=0,188$); borostyánkősav tartalom ($F(2;33)=2,764$; $p=0,078$); glükóz koncentráció ($F(2;33)=6,679$; $p<0,05$); fruktóz tartalom ($F(2;33)=9,844$;

p<0,05). A törzsenkénti MANOVA eredménye (Wilk's λ<0,001; F(96)=10,341; p<0,05) alkohol tartalom (F(11;24)=1,449; p=0,215); glicerin tartalom (F(11;24)=74,689; p<0,01); illósav tartalom (F(11;24)=77,046; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(11;24)=3,868; p=0,03); borostyánkősav tartalom (F(11;24)=5,221; p<0,01).A fajonkénti MANOVA eredménye (Wilk's λ=0,002; F(24)=37,745; p<0,05), ezért a tényezőket szintenként is teszteltem.; alkohol tartalom (F(2;32)=184,636; p<0,01); glicerin tartalom (F(2;32)=50,582; p<0,01); illósav tartalom (F(2;32)=25,773; p<0,01); almasav tartalom (F(2;32)=32,608; p<0,01); borostyánkősav tartalom (F(2;32)=10,776; p<0,01).

A 320 g/L cukortartalmon a vizsgált fajok főbb metabolitjai Box- Cox (0,3) transzfomációt, Winzorizációt követően sem egy, sem több dimenziós outlierrel nem rendelkeznek. Reziduumaik egy dimenziós eloszlásuk normális: alkohol tartalom ($K_{KS}$(36)=0,135; p=0,097); glicerin tartalom ($K_{KS}$(36)=0,982; p=0,824); illósav tartalom ($K_{SW}$(36)=0,957; p=0,173); YAN tartalom ($K_{SW}$(36)=0,963; p=0,263); arginin tartalom ($K_{KS}$(36)=0,957; p=0,178); G/F tartalom ($K_{KS}$(36)=0,978; p=0,672); almasav tartalom ($K_{SW}$(36)=0,959; p=0,200); borostyánkősav tartalom ($K_{SW}$(36)=0,967; p=0,358); glükóz koncentráció a feredeség (0,074) és a csúcsosság alapján (-0,631); fruktóz koncentráció ($K_{SW}$(36)=0,117; p=0,200) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol tartalom (F(2;33)=15,578; p<0,05); glicerin tartalom (F(2;33)=4,578; p<0,05); illósav tartalom (F(2;33)=1,614; p=0,214); YAN tartalom (F(2;33)=12,105; p<0,05); arginin tartalom (F(2;33)=3,280; p=0,050); G/F arány (F(2;33)=0,358; p=0,701); almasav tartalom (F(2;33)=1,760; p<0,05); borostyánkősav tartalom (F(2;33)=1,171; p=0,323); glükóz koncentráció (F(2;33)=39,223; p<0,05); fruktóz tartalom (F(2;33)=20,189; p<0,05). A törzsenkénti MANOVA eredménye (Wilk's λ<0,001; F(34)=19,051; p<0,05); alkohol tartalom (F(11;24)=34,661; p<0,01); glicerin tartalom (F(11;24)=24,750; p<0,01); illósav tartalom (F(11;24)=27,826; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(11;24)=14,176; p<0,01); borostyánkősav tartalom (F(11;24)=9,647; p<0,01). A fajonkénti MANOVA eredménye (Wilk's λ=0,002; F(34)=34,957; p<0,05); alkohol tartalom (F(2;32)=129,052; p<0,01); glicerin tartalom (F(2;32)=16,843; p<0,01); illósav tartalom (F(2;32)=31,925; p<0,01); almasav tartalom (F(2;32)=4,263; p=0,012); borostyánkősav tartalom (F(2;32)=13,770; p<0,01).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA CBS395 (Wilk's λ<0,001; F(1)=615,824; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=1766,744; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=46,290; p<0,01); illósav tartalom (F(1;5)<0,001; p=0,991); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=7,005; p=0,057); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=2,349; p=0,200).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA MLO (Wilk's λ=0,001; F(1)=236,443; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=881,846; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=0,334; p=0,594); illósav tartalom

(F(1;5)=71,367; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=1,985; p=0,232); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=2,377; p=0,198).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA RA100 (Wilk's λ=0,008; F(1)=236,443; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=254,391; p<0,05); glicerin tartalom (F(1;5)=12,467; p=0,024); illósav tartalom (F(1;5)=27,959; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=0,172; p=0,699); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=3,664; p=0,128).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA S103 (Wilk's λ=0,001; F(1)=198,872; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=635,952; p<0,05); glicerin tartalom (F(1;5)=15,739; p=0,017); illósav tartalom (F(1;5)=36,878; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=5,245; p=0,084); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=0,237; p=0,652).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA S701 (Wilk's λ<0,001; F(1)=659,753; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=34,804; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=0,049; p=0,835); illósav tartalom (F(1;5)=2673,445; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=5,368; p=0,081); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=13,495; p=0,021).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA SB12 (Wilk's λ<0,001; F(1)=6111,861; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=22,528; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=1,846; p=0,246); illósav tartalom (F(1;5)=180,243; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=22888,446; p<0,01); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=4,715; p=0,096).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA SB42 (Wilk's λ=0,001; F(1)=397,868; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=129,890; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=26,438; p<0,01); illósav tartalom (F(1;5)=0,370; p=0,576); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=133,759; p<0,01); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=14,668; p=0,019).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA SC57 (Wilk's λ=0,010; F(1)=255,439; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=21,434; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=7,501; p=0,052); illósav tartalom (F(1;5)=172,528; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=0,500; p=0,519); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=27,374; p<0,01).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA UVAFERM®228 (Wilk's λ=0,001; F(1)=239,435; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=1,249; p=0,326); glicerin tartalom (F(1;5)=2,583; p=0,183); illósav tartalom (F(1;5)=481,177; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=20,025; p=0,011); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=0,332; p=0,595).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA UVAFERM®PM (Wilk's λ=0,005; F(1)=55,222; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=254,391; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=12,467; p=0,013); illósav tartalom (F(1;5)=27,959; p<0,01); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=0,172; p=0,699); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=3,664; p=0,128).

A 2 cukortartalom közötti MANOVA Y1667 (Wilk's λ=0,006; F(1)=1379,635; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=1052,192; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=20,379; p=0,011); illósav tartalom (F(1;5)=0,155; p=714); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=0,267; p=0,633); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=3,964; p=0,117).
A 2 cukortartalom közötti MANOVA RA100 (Wilk's λ<0,001; F(1)=236,443; p<0,05); alkohol tartalom (F(1;5)=32,275; p<0,01); glicerin tartalom (F(1;5)=29,003; p<0,01); illósav tartalom (F(1;5)=17,727; p=0,014); fogyott almasav tartalom (F(1;5)=67,174; p<0,01); borostyánkősav tartalom (F(1;5)=9,006; p=0,040).

Az etanol, glicerin, illósav, borostyánkősav kihozatalánalának, a glicerin/etanol aránynak és az 1%etanolhoz felhasznált cukor mennyiségének elemzése MANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 2 eltérő kiindulási cukortartalom és 3 élesztő faj, vagy 12 élesztő törzs. Fajonként három törzs három párhuzamosával történt a vizsgálat.
220 g/L-en a törzsek főbb metabolitjainak kihozatalának reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: alkohol kihozatal (KSW(36)=0,967; p=0,361); cukor 1% etanolhoz a ferdeség és standard hibája (2,039) és a csúcsosság és standard hibája alapján (2,820), glicerin kihozatal ($K_{SW}$(36)=0,973; p=0,521), illósav kihozatal a ferdeség és standard hibája (1,944) és a csúcsosság és standard hibája alapján (2,081), borostyánkősav kihozatal ($K_{SW}$(36)=0,963; p=0,264), glicerin/etanol arány ($K_{SW}$(36)=0,986; p=0,921) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol kihoztal (F(11;24)=1,520; p=0,188); cukor 1% etanolhoz (F(11;24)=4,707; p<0,05); glicerin kihozatal (F(11;24)=2,186; p=0,053); illósav kihozatal (F(11;24)=4,179; p<0,05); borostyánkősav kihozatal (F(11;24)=2,778; p<0,05); glicerin/etanol arány (F(11;24)=2,074; p=0,066). A MANOVA eredménye törzsenként (Wilk's λ<0,05; F(66)=14,216; p<0,05); alkohol kihozatal (F(11;24)=60,214; p<0,001); cukor 1% etanolhoz (F(11;24)=13,655; p<0,001), glicerin kihozatal (F(11;24)=210,132; p<0,001), illósav kihozatal (F(11;24)=45,952; p<0,01), borostyánkősav kihozatal (F(11;24)=92,382; p<0,001), glicerin/etanol arány (F(11;24)=196,072; p<0,001). A MANOVA eredménye fajonként (Wilk's λ=0,236; F(56)=4,941; p<0,05); alkohol kihozatal (F(2;33)=5,947; p<0,008); cukor 1% etanolhoz (F(2;33)=4,721; p=0,016), glicerin kihozatal (F(2;33)=6,137; p<0,008), illósav kihozatal (F(2;33)=12,598; p<0,001), borostyánkősav kihozatal (F(2;33)=10,742; p<0,001), glicerin/etanol arány (F(2;33)=5,307; p=0,010).
320 g/L-en a törzsek főbb metabolitjainak kihozatalának reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: alkohol kihozatal ($K_{SW}$(36)=0,979; p=0,707); cukor 1% etanolhoz a ferdeség és standard hibája (1,54) és a csúcsosság és standard hibája alapján (3,05); glicerin kihozatal ($K_{SW}$(36)=0,969;

p=0,410), illósav kihozatal ($K_{SW}$(36)=0,966; p=0,326), borostyánkősav kihozatal ($K_{SW}$(36)=0,968; p=0,383), glicerin/etanol arány (KSW(36)=0,956; p=0,161) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol kihoztal (F(11;24)=4,050; p<0,05); cukor 1% etanolhoz (F(11;24)=3,975; p<0,05); glicerin kihozatal (F(11;24)=1,258; p=0,305); illósav kihozatal (F(11;24)=2,138; p=0,058); borostyánkősav kihozatal (F(11;24)=2,646; p<0,05); glicerin/etanol arány (F(11;24)=3,010; p<0,05). A MANOVA eredménye törzsenként (Wilk's λ<0,05; F(66)=12,603; p<0,05); alkohol kihozatal (F(11;24)=24,433; p<0,001); cukor 1% etanolhoz (F(11;24)=22,316; p<0,001), glicerin kihozatal (F(11;24)=86,926; p<0,001), illósav kihozatal (F(11;24)=20,325; p<0,001), borostyánkősav kihozatal (F(11;24)=63,727; p<0,001), glicerin/etanol arány (F(11;24)=91,173; p<0,001). A MANOVA eredménye fajonként (Wilk's λ=0,282; F(56)=4,115; p<0,05); alkohol kihozatal (F(2;33)=7,273; p<0,008); cukor 1% etanolhoz (F(2;33)=7,612; p<0,008), glicerin kihozatal (F(2;33)=8,410; p<0,001), illósav kihozatal (F(2;33)=12,318; p<0,001), borostyánkősav kihozatal (F(2;33)=11,531; p<0,001), glicerin/etanol arány (F(2;33)=8,433; p<0,001).

A 2 cukortartalom között; az *S. cerevisiae* törzsek főbb metabolitjainak kihozatalának reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: alkohol kihozatal a ferdeség és standard hibája (2,650) és a csúcsosság és standard hibája alapján (2,673); cukor 1% etanolhoz a ferdeség és standard hibája (2,651) és a csúcsosság és standard hibája (1,785) alapján; glicerin kihozatal a ferdeség és standard hibája (0,468) és a csúcsosság és standard hibája (-0,849) alapján, illósav kihozatal a ferdeség (1,001) és a csúcsosság (1,539); borostyánkősav kihozatal alapján a ferdeség és standard hibája (2,171) és a csúcsosság és standard hibája (0,947); glicerin/etanol arány a ferdeség (0,070) és a csúcsosság (1,384) alapján (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol kihoztal (F(1;34)=6,484; p<0,05); cukor 1% etanolhoz (F(1;34)=5,605; p<0,05); glicerin kihozatal (F(1;34)=0,029; p=0,865); illósav kihozatal (F(1;34)=0,002; p=0,965); borostyánkősav kihozatal (F(1;34)=1,484; p=0,232); glicerin/etanol arány (F(1;34)=0,680; p=0,415). A MANOVA eredménye (Wilk's λ=0,072; F(29)=62,612; p<0,05); alkohol kihozatal (F(1;34)=0,863; p=0,359); cukor 1% etanolhoz (F(1;34)=0,989; p=0,327), glicerin kihozatal (F(1;34)=9,295; p<0,05), illósav kihozatal (F(1;34)=40,184; p<0,05), borostyánkősav kihozatal (F(1;34)=3,235; p=0,081), glicerin/etanol arány (F(1;34)=7,768; p<0,05).

A 2 cukortartalom között; az *S. uvarum* törzsek főbb metabolitjainak kihozatalának reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: alkohol kihozatal a ferdeség (-0,823) és a csúcsosság alapján (-0,563); cukor 1% etanolhoz a ferdeség (0,951) és a csúcsosság (-0,148) alapján; glicerin kihozatal

a ferdeség (1,000) és a csúcsosság (-0,114) alapján, illósav kihozatal a ferdeség (0,384) és a csúcsosság (0,123); borostyánkősav kihozatal alapján a ferdeség és standard hibája (3,28) és a csúcsosság és standard hibája (0,897); glicerin/etanol arány a ferdeség (0,710) és a csúcsosság (-0,734) alapján (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol kihoztal ($F(1;16)=4,829$; $p<0,05$); cukor 1% etanolhoz ($F(1;16)=1,043$; $p=0,322$); glicerin kihozatal ($F(1;16)=0,169$; $p=0,686$); illósav kihozatal ($F(1;16)=0,027$; $p=0,872$); borostyánkősav kihozatal ($F(1;16)=0,386$; $p=0,543$); glicerin/etanol arány ($F(1;16)=0,082$; $p=0,778$). A MANOVA eredménye (Wilk's $\lambda=0,026$; $F(11)=69,346$; $p<0,05$); alkohol kihozatal ($F(1;16)=0,001$; $p=0,971$); cukor 1% etanolhoz ($F(1;16)=0,716$; $p=0,410$), glicerin kihozatal ($F(1;16)=40,061$; $p<0,05$), illósav kihozatal ($F(1;16)=25,014$; $p<0,05$), borostyánkősav kihozatal ($F(1;16)=5,754$; $p<0,05$), glicerin/etanol arány ($F(1;16)=32,191$; $p<0,05$).

A 2 cukortartalom között; az *S. bacillaris* törzsek főbb metabolitjainak kihozatalának reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: alkohol kihozatal a ferdeség (-0,823) és a csúcsosság alapján (-0,563); cukor 1% etanolhoz a ferdeség (0,951) és a csúcsosság (-0,148) alapján; glicerin kihozatal a ferdeség (1,000) és a csúcsosság (-0,114) alapján, illósav kihozatal a ferdeség (0,384) és a csúcsosság (0,123); borostyánkősav kihozatal alapján a ferdeség és standard hibája (3,28) és a csúcsosság és standard hibája (0,897); glicerin/etanol arány a ferdeség (0,710) és a csúcsosság (-0,734) alapján (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk esetenként nem homogén Levene teszt alapján, ezért Games- Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: alkohol kihoztal ($F(1;16)=2,332$; $p=0,146$); cukor 1% etanolhoz ($F(1;16)=2,900$; $p=0,108$); glicerin kihozatal ($F(1;16)=0,640$; $p=0,436$); illósav kihozatal ($F(1;16)=1,174$; $p=0,295$); borostyánkősav kihozatal ($F(1;16)=3,033$; $p=0,101$); glicerin/etanol arány ($F(1;16)=2,124$; $p=0,164$). A MANOVA eredménye (Wilk's $\lambda=0,049$; $F(11)=35,228$; $p<0,05$); alkohol kihozatal ($F(1;16)=16,97$; $p<0,05$); cukor 1% etanolhoz ($F(1;16)=7,13$; $p<0,05$), glicerin kihozatal ($F(1;16)=40,061$; $p<0,05$), illósav kihozatal ($F(1;16)=1,694$; $p=0,074$), borostyánkősav kihozatal ($F(1;16)=6,931$; $p<0,05$), glicerin/etanol arány ($F(1;16)=90,659$; $p<0,05$).

A fogyott YAN, arginin koncentrációjának és a specifikus YAN felhasználás elemzése MANOVA-val. A vizsgálat szempontjai: 2 eltérő kiindulási cukortartalom és 3 élesztő faj, vagy 12 élesztő törzs. Fajonként három törzs három párhuzamosával történt a vizsgálat.

220 g/L kiindulási cukortartalmon vizsgált fajok nitrogénnel kapcsolatos tulajdonságainak reziduumai normális eloszlást követnek Shapiro-Wilk teszt alapján egy dimenzióban: YAN ($K_{SW}(36)=0,957$; $p=0,173$), arginin ($K_{SW}(36)=0,957$; $p=0,177$), YAN felhasználás cukor függvényében ($K_{SW}(36)=0,962$; $p=0,248$) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett).Az adatsor reziduumainak szórása nem minden esetben homogén Levene teszt

alapján, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: YAN ($F(33)=10,700$; $p<0,05$), arginin ($F(33)=2,2323$; $p=0,124$), YAN felhasználás cukor függvényében ($F(33)=1,081$; $p=0,351$). A MANOVA eredménye törzsenként (Wilk's $\lambda=0,001$; $F(33)=18,829$; $p<0,05$); YAN ($F(11)=50,136$; $p<0,01$); arginin ($F(11)=6,257$; $p<0,01$); YAN felhasználás cukor függvényében ($F(11)=102,219$; $p<0,01$). A MANOVA eredménye fajonként (Wilk's $\lambda=0,056$; $F(6)=33,204$; $p<0,05$); YAN ($F(2)=18,241$; $p<0,01$); arginin ($F(2)=9,125$; $p<0,01$); YAN felhasználás cukor függvényében ($F(2)=232,417$; $p<0,01$).

320 g/L kiindulási cukortartalmon vizsgált fajok nitrogénnel kapcsolatos tulajdonságainak reziduumai normális eloszlást követnek Shapiro-Wilk teszt alapján egy dimenzióban: YAN ($K_{SW}(36)=0,963$; $p=0,263$), arginin ($K_{SW}(36)=0,957$; $p=0,178$), YAN felhasználás cukor függvényében ($K_{SW}(36)=0,988$; $p=0,951$) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Az adatsor reziduumainak szórása nem minden esetben homogén Levene teszt alapján, ezért Games-Howell Post Hoc elemzést alkalmazok: YAN ($F(33)=12,105$; $p<0,05$), arginin ($F(33)=3,280$; $p=0,050$), YAN felhasználás cukor függvényében ($F(33)=0,519$; $p=0,600$). A MANOVA eredménye törzsenként (Wilk's $\lambda=0,001$; $F(33)=23,594$; $p<0,05$); YAN ($F(11)=43,487$; $p<0,01$); arginin ($F(11)=11,370$; $p<0,01$); YAN felhasználás cukor függvényében ($F(11)=80,536$; $p<0,01$). A MANOVA eredménye fajonként (Wilk's $\lambda=0,072$; $F(6)=28,100$; $p<0,05$); YAN ($F(2)=18,594$; $p<0,01$); arginin ($F(2)=11,880$; $p<0,01$); YAN felhasználás cukor függvényében ($F(2)=184,801$; $p<0,01$).

A 2 cukortartalom között; az *S. cerevisiae* törzsek nitrogénnel kapcsolatos tulajdonságainak reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: YAN a ferdeség és standard hibája (0,477) és a csúcsosság és standard hibája alapján (1,754); arginin a ferdeség és standard hibája (0,659) és a csúcsosság és standard hibája (1,450) alapján; YAN felhasználás cukor függvényében a ferdeség és standard hibája (1,435) és a csúcsosság és standard hibája alapján (0,297) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk homogén Levene teszt alapján, YAN ($F(1;16)=2,932$; $p=0,096$), arginin ($F(1;16)=0,136$; $p=0,714$), YAN felhasználás cukor függvényében ($F(1;16)=0,009$; $p=0,926$). A MANOVA eredménye (Wilk's $\lambda=0,948$; $F(32)=0,588$; $p=0,627$).

A 2 cukortartalom között; az *S. uvarum* törzsek nitrogénnel kapcsolatos tulajdonságainak reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális Shapiro-Wilk teszt alapján: YAN ($K_{SW}(18)=0,942$; $p=0,308$), arginin ($K_{SW}(18)=0,929$; $p=0,186$), YAN felhasználás cukor függvényében ($K_{SW}(18)=0,921$; $p=0,134$) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett). Szórásuk homogén Levene teszt alapján, YAN ($F(1;16)=4,433$; $p=0,051$), arginin ($F(1;16)=0,006$; $p=0,940$), YAN felhasználás cukor függvényében ($F(1;16)=0,092$; $p=0,765$). A MANOVA eredménye (Wilk's $\lambda=0,614$; $F(14)=2,866$; $p=0,074$).

A 2 cukortartalom között; az *S. bacillaris* törzsek nitrogénnel kapcsolatos tulajdonságainak reziduumainak egy dimenziós eloszlása normális: YAN a ferdeség és standard hibája (0,391) és a csúcsosság és standard hibája alapján (1,479); arginin a ferdeség és standard hibája (1,120) és a csúcsosság és standard hibája (0,716) alapján; YAN felhasználás cukor függvényében a ferdeség és standard hibája (0,341) és a csúcsosság és standard hibája alapján (0,094) (több dimenziós normális eloszlásuk ebből feltételezett Szórásuk homogén Levene teszt alapján, YAN ($F(1;16)=1,185$; $p=0,293$), arginin ($F(1;16)=0,021$; $p=0,885$), YAN felhasználás cukor függvényében ($F(1;16)=0,051$; $p=0,824$).A MANOVA eredménye (Wilk's $\lambda=0,464$; $F(14)=5,400$; $p<0,05$); YAN ($F(1;16)=3,590$; $p=0,076$); arginin ($F(1;16)=0,220$; $p=0,646$), YAN felhasználás cukor függvényében ($F(1;16)=1,645$; $p=0,218$).

A vizsgált fermentációs metabolitok: etanol, glicerin, illósav, fogyott almasav, borostyánkősav, YAN, arginin, glükóz, fruktór, G/F arány elemézse főkomponens analízissel. A vizsgálat szempontjai: 2 eltérő kiindulási cukortartalom és 3 élesztő faj, vagy 12 élesztő törzs. Fajonként három törzs három párhuzamosával történt a vizsgálat.

A termelt metabolitok főkomponens elemzésének eredménye szignifikáns a következők alapján: Barlett féle szfericitás teszt ($\chi^2(45)=585,865$; $p<0,001$); KMO statisztika ($KMO=0,675$). A változókat (10) két magyarázó változóba lehet tömöríteni Scree plot alapján, ami a fajok kiindulási cukortartalom alapján történő változását 66,96%-ban (F1=44,64%; F2=22,32%) magyarázza. A megjobb elválasztás érdekében Varimax rotációt alkalmaztam.

A 220 g/L-en termelt metabolitok főkomponens elemzésének eredménye szignifikáns a következők alapján: Barlett féle szfericitás teszt ($\chi^2(45)=288,294$; $p<0,001$); KMO statisztika ($KMO=0,592$). A változókat (10) két magyarázó változóba lehet tömöríteni Scree plot alapján, ami a fajok kiindulási cukortartalom alapján történő változását 64,10%-ban (F1=43,64%; F2=20,46%) magyarázza. A megjobb elválasztás érdekében Varimax rotációt alkalmaztam.

A 320 g/L-en termelt metabolitok főkomponens elemzésének eredménye szignifikáns a következők alapján: Barlett féle szfericitás teszt ($\chi^2(45)=340,169$; $p<0,001$); KMO statisztika ($KMO=0,584$). A változókat (10) két magyarázó változóba lehet tömöríteni Scree plot alapján, ami a fajok kiindulási cukortartalom alapján történő változását 71,43%-ban (F1=45,09%; F2=26,34%) magyarázza. A megjobb elválasztás érdekében Varimax rotációt alkalmaztam.

A fumársav, piroszőlősav, butándiol, acetoin és acetaldehid koncentrációjának analízise kereszttábla elemzéssel. A vizsgálat szempontjai: 2 eltérő kiindulási cukortartalom és 3 élesztő faj. Fajonként három törzs három párhuzamosával történt a vizsgálat.

A vizsgált fajok által termelt kisebb metabolitok nem követnek normális eloszlást, ezért a fenti analízistől eltérően kereszttábla elemzéssel értékelem alakulásukat.

A 220 g/L kiindulási cukortartalom esetén vizsgált komponensek esetén a fajok közti kereszttáblában a peremeloszlások alapján, nem minden cellában magasabb a várható érték, mint 1 és 5-nél kisebb értékek is előfordulnak, ezért Fischer Exact tesztje alapján értékelem az adatokat: prolin (Exact T.=10,746; p=0,103), alanin (Exact T.=22,688; p<0,05), fumársav (Exact T.=25,783; p<0,05), piroszőlősav (Exact T.=11,652; p<0,05), 2,3-butándiol (Exact T.=33,720; p<0,05), acetoin (Exact T.=33,894; p<0,05), acetaldehid (Exact T.=10,876; p=0,070).

A 320 g/L kiindulási cukortartalom esetén vizsgált komponensek esetén a fajok közti kereszttáblában a peremeloszlások alapján, nem minden cellában magasabb a várható érték, mint 1 és 5-nél kisebb értékek is előfordulnak, ezért Fischer Exact tesztje alapján értékelem az adatokat: prolin (Exact T.=10,461; p<0,05), alanin (Exact T.=24,963; p<0,05), fumársav (Exact T.=32,909; p<0,05), piroszőlősav (Exact T.=13,551; p<0,05), 2,3-butándiol (Exact T.=36,850; p<0,05), acetoin (Exact T.=32,899; p<0,05), acetaldehid (Exact T.=13,510; p<0,05).

A 2 cukortartalom között; az *S. cerevisiae* törzsek kisebb metabolit képzése esetén esetén a cukor fokozatok közti kereszttáblában a peremeloszlások alapján, nem minden cellában magasabb a várható érték, mint 1 és 5-nél kisebb értékek is előfordulnak, ezért Fischer Exact tesztje alapján értékelem az adatokat: prolin (Exact T.=7,200; p<0,05), alanin (Exact T.=0,120; p=0,500), fumársav (mindkét cukor fokozaton konstans), piroszőlősav (Exact T.=2,857; p=0,176), 2,3-butándiol (mindkét cukor fokozaton konstans), acetoin (mindkét cukor fokozaton konstans), acetaldehid (Exact T.=7,481; p<0,05).

A 2 cukortartalom között; az *S. uvarum* törzsek kisebb metabolit képzése esetén esetén a cukor fokozatok közti kereszttáblában a peremeloszlások alapján, nem minden cellában magasabb a várható érték, mint 1 és 5-nél kisebb értékek is előfordulnak, ezért Fischer Exact tesztje alapján értékelem az adatokat: prolin (Exact T.=2,250; p=0,235), alanin (mindkét cukor fokozaton konstans), fumársav (Exact T.<0,001; p=0,765), piroszőlősav (Exact T.=0277; p=0,500), 2,3-butándiol (mindkét cukor fokozaton konstans), acetoin (mindkét cukor fokozaton konstans), acetaldehid (Exact T.=0,400; p=0,500).

A 2 cukortartalom között; az *S. bacillaris* törzsek kisebb metabolit képzése esetén esetén a cukor fokozatok közti kereszttáblában a peremeloszlások alapján, nem minden cellában magasabb a várható érték, mint 1 és 5-nél kisebb értékek is előfordulnak, ezért Fischer Exact tesztje alapján értékelem az adatokat: prolin (Exact T.=14,40; p<0,05), alanin (mindkét cukor fokozaton konstans), fumársav (Exact T=0,277; p=0,500), piroszőlősav (Exact T.=1,059 p=0,500), 2,3-butándiol (mindkét cukor fokozaton konstans), acetoin (Exact T.=1,059 p=0,500), acetaldehid (Exact T.=14,400; p<0,05).

- Félüzemi erjesztési kísérlet

A 4. és 7. napi G/F arány, glicerin, etanol illósav és titrálhatósav koncnetrációjának elemzése egyesével ANOVA-val. A vizsgálat szempontja: 3 eltérő beoltási technika. Beoltási módonként két párhuzamossal történt a vizsgálat.

A különböző oltási technikákkal erjesztett borok 4. napi G/F arányának reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,957$; $p=0,217$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,234$; $p=0,417$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=115,614$; $p<0,05$).

A különböző oltási technikákkal erjesztett borok 7. napi G/F arányának reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,924$; $p=0,427$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,301$; $p=0,577$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=177,717$; $p<0,05$).

A különböző oltási technikákkal erjesztett borok glicerin koncentrációjának reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,274$; $p=0,825$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,212$; $p=0,450$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=8,435$; $p=0,059$).

A különböző oltási technikákkal erjesztett borok illósav koncentrációjának reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,924$; $p=0,427$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,261$; $p=0,447$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=115,614$; $p<0,05$).

A különböző oltási technikákkal erjesztett borok alkohol tartalmának reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,743$; $p=0,458$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,363$; $p=0,741$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=6,672$; $p=0,079$).

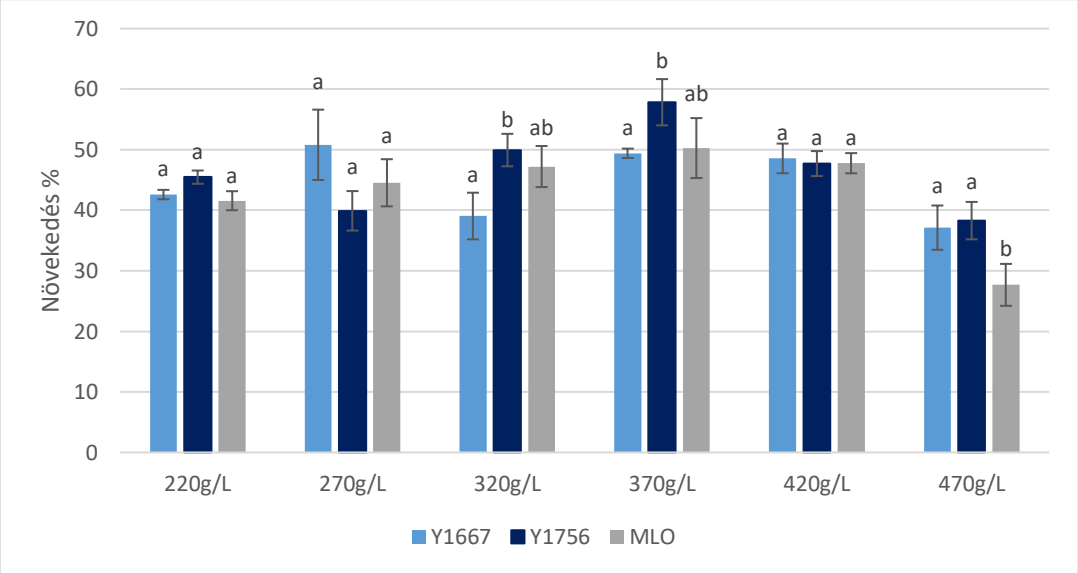
A különböző oltási technikákkal erjesztett borok titrálható savtartalmának reziduumai normális eloszlásúak Shapiro-Wilk teszt alapján ($K_{SW}(6)=0,947$; $p=0,827$). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül ($F(2;9)=0,643$; $p=0,657$). Az ANOVA eredménye ($F(2;9)=1,191$; $p=0,416$).

Az illatintenzitás, gyümölcsös illat, savasság, zöld megjelenés, sárga megjelenés elemzése egyesével ANOVA-val történt. A vizsgálat szempontja: 3 eltérő beoltási mód. Beoltási módonként két párhuzamosnak a 10 bíráló általi pontszámával történt a vizsgálat.

Az érzékszervi bírálati pontszámok reziduumai normális eloszlásúak a Shapiro-Wilk teszt alapján: illat intenzitás ($K_{SW}(19)=0,902$; $p=0,263$), gyümölcsös illat ($K_{SW}(19)=0,943$; $p=0,610$), savasság ($K_{SW}(19)=0,202$; $p=0,200$), zöld megjelenés ($K_{SW}(19)=0,902$; $p=0,263$), sárga megjelenés ($K_{SW}(19)=0,874$; $p=0,135$), illetve a ferdeség és standard hibája valamint a csúcsosság és standard hibája hányadosa alapján: összbenyomás (0,123; 2,4), testesség (1,4; 0,02), íz tartósság (0,286; 2,38). A homogenitás feltétele Levene teszt alapján teljesül: összbenyomás ($F(2;19)=3,296$; $p=0,108$), illat intenzitás ($F(2;19)=2,400$; $p=0,171$), gyümölcsös illat ($F(2;19)=1,937$; $p=0,224$), savasság ($F(2;19)=2,000$; $p=0,216$), testesség ($F(2;19)=2,000$; $p=0,216$), íz tartósság ($F(2;19)=3,231$; $p=0,112$), zöld megjelenés ($F(2;19)=2,400$; $p=0,171$), sárga megjelenés

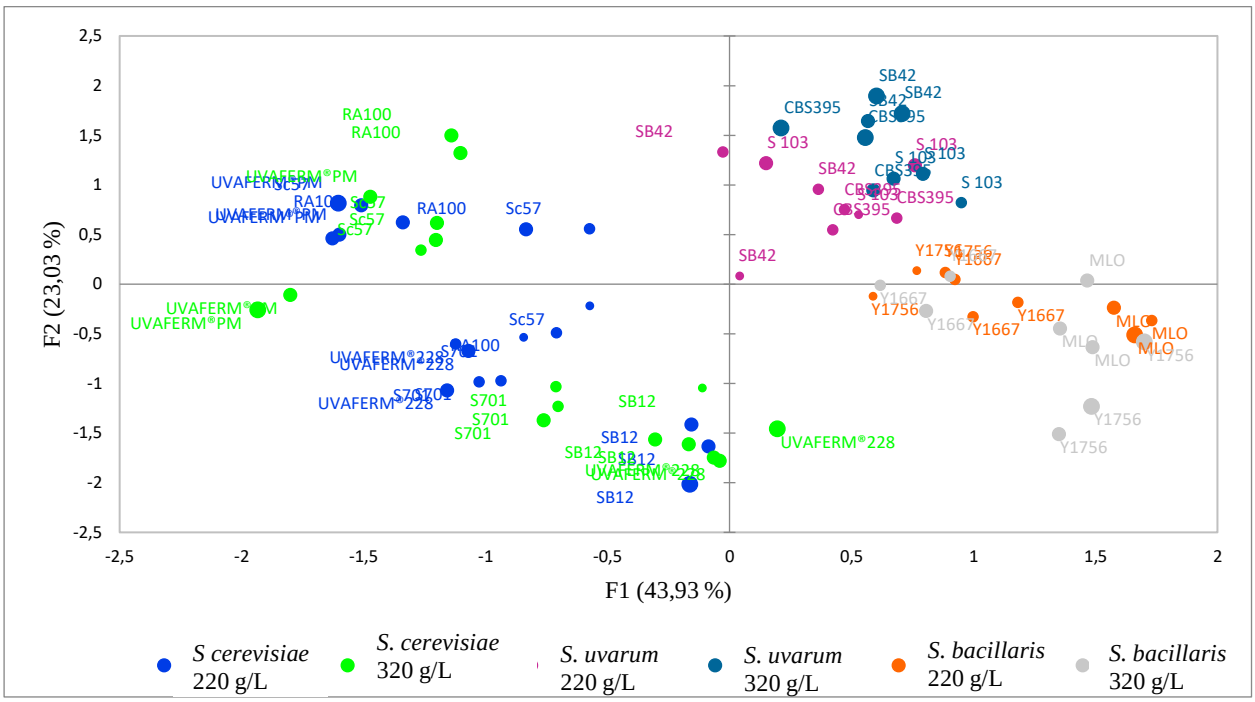
(F(2;19)=2,800; p=0,138). Az ANOVA eredménye összbenyomás (F(2;19)=3,912; p<0,10), illat intenzitás (F(2;19)=5,400; p<0,05), gyümölcsös illat (F(2;19)=5,528; p<0,05), savasság (F(2;19)=4,000; p<0,10), testesség (F(2;19)=13,500; p<0,05), íz tartósság (F(2;19)=16,961; p<0,05), zöld megjelenés(F(2;19)=12,600; p<0,05), sárga megjelenés (F(2;19)=18,900; p<0,05).

**M4. A kombinált stressz vizsgálat kiegészítő eredményei**

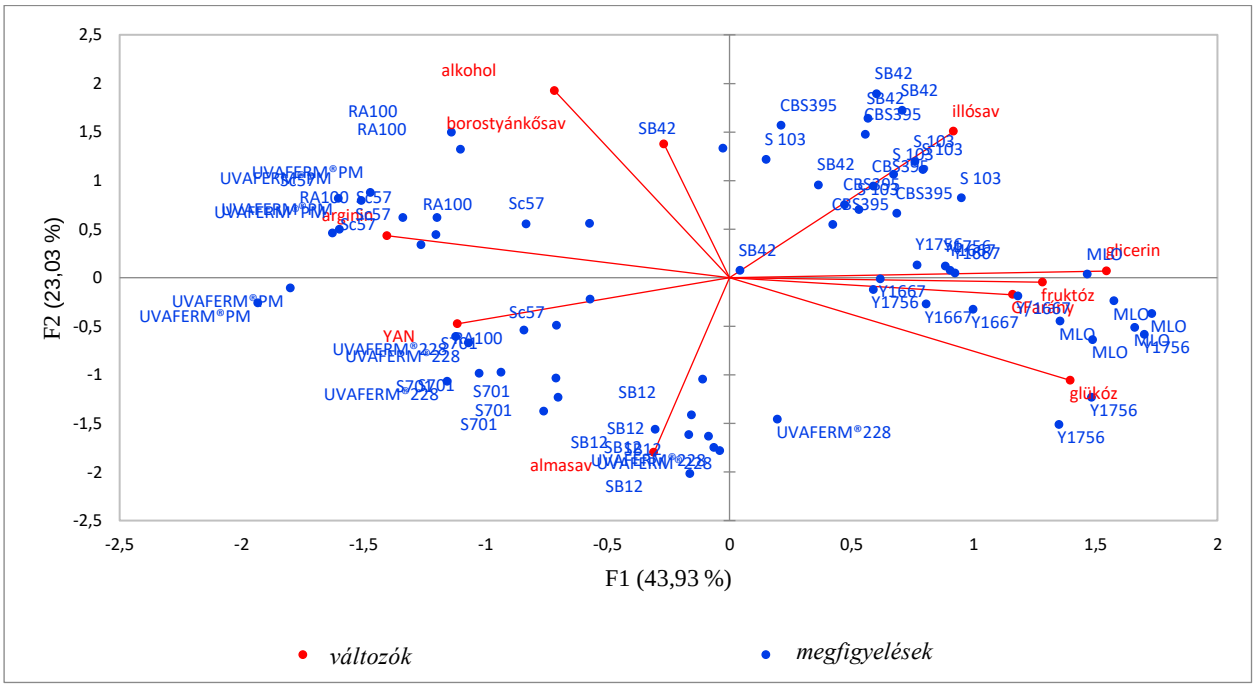



**M1. ábra:** *Starmerella bacillaris (*syn. *Candida zemplinina*) törzsek növekedése %-ban kifejezve ($Y_{A\text{-}B\text{-}C\ átlag}$), emelkedő cukorkoncentráción, 20 °C-on. Az eltérő betűk egytényezős varianciaanalízis Tukey's Post hoc elemzése szerinti szignifikáns különbséget jelölnek (p<0,05; n=3)

## M5. A vizsgált törzsek főkomponens analízisének további ábrái




**M2. ábra:** A vizsgált törzsek normális eloszlású metabolitjainak főkomponens analízise. A két kiindulási cukortartalom együttes score-plotja.




**M3. ábra:** A vizsgált törzsek normális eloszlású metabolitjainak főkomponens analízise. A két kiindulási cukortartalom együttes bi-plotja.

**M6. Publikációs jegyzék**

**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. (ISSN 1217-8950).

**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. In press.

**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. In press.

**Konferencia előadás**

Study of Metabolic Activity of Wine Related Yeasts in Stress Conditions, in High Sugar Juices előadás, Croatian Society for Microbiology Monthly Meeting, 2017.11.30. Zágráb, Horvátország

Protected denomination of origin in winemaking of Hungary, Mladi Winari Konferencia, 2019.05. 20-22. Valtice, Csehország

Tokaj wine specialities, 8. Corso Appassimnto delle Uve e Qualitá dei Vini, 2019.06.21-23. Alba, Olaszország

Alkoholmenedzsment-a technológia válasza a magas alkoholtartalomra, Korreferátum, III. Országos Szőlész-borász Konferencia 2019.11.05., Budapest

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként hálás vagyok témavezetőm, Dr. Habil. Magyar Ildikó, rám szánt jelentős idejéért és energiájáért, akinek szakmai tudása és -irányítása nélkül ez a munka nem született volna meg. Valamint, aki sosem utasította vissza legbanálisabb kérdéseimet sem.

Köszönöm a Borászati Tanszék volt és jelenlegi kollégáinak, főként Nyitrainé dr. Sárdy Diánának, Dr. Kállay Miklósnak, Dr. Pásti Györgynek, Dr. Soós Jánosnak, Kellner Nikolettnek, Géher Lászlónénak, Hegyiné Kiss Zsuzsannának és Korom Katának együttműködését, valamint a lehetőséget, hogy a tanszéki laborokban dolgozhattam.

Köszönöm a szakmai segítségét Dr. Pomázi Andreának a molekuláris biológiai vizsgálatban, ami a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék erőforrásai nélkül nem valósulhatott volna meg.

Köszönöm Dr. Mojmir Baronnak (Brünói Egyetem), hogy rendelkezésemre bocsátotta a közepes szénláncú zsírsavakkal kapcsolatos eredményeit, valamint, hogy munkájukhoz kapcsolódhattam.

A kísérleti munka egy részében segítségemre voltak: Fazekas Eszter, Kormos Vivien, Lajszner Fanni, Liridona Demaj és Pápai Anna hallgatók, valamint a Vintage International MSc képzés 2017-es évfolyama. Akik munkáját nagyra értékelem.

A Szent István Egyetem falain kívül történő vizsgálatokért köszönet illeti a Soós István Borászati és Élelmiszeripari Szakgimnázium és Szakközépiskola Tangazdaságának, a Dyagnosticum Kft. és a Reprocare Genetics Kft. kollégáit.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm a családom támogatását és türelmét, mivel az elmúlt években a fontossági sorrendben nem ritkán a kutatómunka mögé szorultak.

Köszönöm!