

Szakdolgozat

Holló Bálint Szakdolgozat

Holló Bálint
2022

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Biomérnök és Erjedésipari
Technológiai Tanszék

Élesztőgomba izolátumok azonosítása

Holló Bálint

Budapest

2022

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológia

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék


Hallgató: Holló Bálint

A szakedolgozat címe: Élesztőgomba izolátumok azonosítása

Konzulensek: Dr. Csernus Olívia és Batáné Dr. Vidács Ildikó

Beadás dátuma: 2022.11.09.

szakedolgozat készítés helyének vezetője
(Dr. Nguyen Duc Quang)


konzulensek
(Dr. Csernus Olívia, Batáné
dr. Vidács Ildikó)

Dr. Nguyen Duc Quang
modul szerinti tanszék vezetője

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	1
2	A munka célja	2
3	Irodalmi áttekintés.....	3
3.1	Élesztők karakterisztikája.....	3
3.2	Élesztők a biotechnológiában.....	4
3.3	Mikrobiológiai módszerek.....	7
4	Anyagok és módszerek.....	9
4.1	A kutatás helyszíne.....	9
4.2	A mintavétel.....	9
4.3	Anyagok.....	9
4.4	Minták tápközegbe oltása.....	10
4.4.1	Tápleves készítés.....	10
4.4.2	Táptalaj készítés.....	10
4.4.3	Beoltás.....	10
4.5	Klasszikus mikrobiológiai módszerek.....	11
4.5.1	Szélesztés.....	11
4.5.2	Bürker-kamrás sejtszámolás.....	11
4.6	Minták előkészítése az molekuláris mikrobiológiai módszerekre.....	12
4.7	Molekuláris mikrobiológiai módszerek.....	13
4.7.1	DNS izolálás.....	13
4.7.2	DNS koncentráció meghatározás.....	15
4.7.3	Repetitív PCR.....	16
4.7.4	Gélelektroforézis.....	18
4.7.5	ITS-PCR.....	19
4.7.6	DNS szekvenálás.....	20
4.7.7	YeastIP.....	20
5	Kísérleti eredmények.....	21
5.1	Szélesztés eredményei.....	21
5.2	Sejtszámlálás eredményei.....	22
5.3	DNS kivonás eredményei.....	23
5.4	REP-PCR eredményei.....	24
5.5	ITS-PCR eredményei.....	27
5.6	Szekvenálás eredményei.....	27
5.7	A beazonosított élesztőgombák rövid jellemzése.....	29

6	Összefoglalás	34
7	Irodalomjegyzék	35
8	Melléklet	39
9	Köszönetnyilvánítás	40
10	Nyilatkozatok	41

Holló Bálint Szakdolgozat

1 BEVEZETÉS

Az élesztőgombák évezredek óta végeznek láthatatlan munkát az emberiség számára. Egyiptom és Izrael területén több ezeréves nyomaira bukkantak a fermentált ételek és italok jelenlétének. Anton van Leeuwenhoek 1680-ban mikroszkóp alatt szeszes italt vizsgálva elsőként jegyezte fel élesztőgomba jelenlétét, majd 1857-ben Louis Pasteur az erjedésért felelős élő szervezetként írja le.

Az élesztőgombák egysejtű, eukarióták az *Ascomycota* és *Basidiomycota* törzsekből, melyek fakultatív anaerob éltmódot folytatnak. A biológiai összetételük és az enzimháztartásuk miatt a szénhidrátokat szén-dioxiddá és etanollá alakítják oxigénhiányos környezetben.

Ahogy az elmúlt évtizedek folyamán egyre több figyelmet szentelt a tudomány és az ipar az élesztőgombáknak, újabb lehetőségre bukkantak a felhasználásukat illetően. Manapság a számtalan klasszikus fermentált étel és ital mellett a bioetanol gyártásában, a biokontrollban, a környezeti biotechnológiában, a heterológ fehérjék gyártásában és a gyógyászatban is számtalan módon használják. Az elmúlt években a genomjuk kutatása hozott fontos eredményeket az alapvető biológiai kutatások területén.

Az egyes élesztőgombák szélsőséges hatások közepette is képesek a növekedésre, így világszerte megtalálhatóak a környezetünkben. Ebből adódóan a gyümölcsök felületétől kezdve, rovarokból, óceánból, de emberek bőrfelületéről és emésztőrendszeréből és izolálták már.

Nem túlzás azt állítani, hogy az emberek és az élesztőgombák kapcsolata hosszú időre nyúlik vissza, viszont az elmúlt évek során elképesztő mértékben nőtt a felhasználásuk mértéke, és a következő évtizedekben is számos kutatásnak és biotechnológiai folyamatnak lesz az alapja.

2 A MUNKA CÉLJA

A munkám célja az, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoportjának törzsgyűjteményéből kapott ismeretlen élesztőgomba mintákat különböző mikrobiológiai módszerekkel vizsgáljam, majd faj szinten azonosítsam.

A műveletet során a következő klasszikus mikrobiológiai, és molekuláris biológiai módszerrel vizsgáltam az élesztőket:

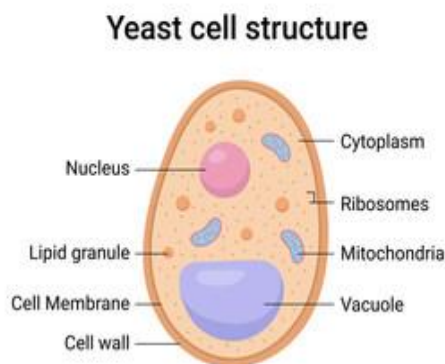
- Agaróz táptalajon szélesztés, hogy a telepekről értékes morfológiai megállapításokat tehessek.
- Bürker-kamrás sejtszámlálás, hogy az élesztőgombák szaporodási kapacitásait
- A DNS izolálása kétféle Kittel, hogy a DNS-el később PCR-t tudjak végezni.
- Rep-PCR és ITS-PCR, hogy a később beazonosításra kerülő DNS fragmentumokat amplifikáljam.
- Agaróz gélelektroforézis, hogy a DNS mintázatok közti azonosságok keresésével csökkentsem a szekvenálásra küldött minták számát.
- A DNS minták szekvenálása (külső cég végezte).
- A kapott szekvenciák bázissorendjének összehasonlítása egy online adatbázissal, majd a minták faj szintű azonosítása.

Az izolált és azonosított élesztőgombák a munkám után az Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoport törzsgyűjteményébe kerülnek, ahol a későbbiekben felhasználhatóak lesznek további kutatási feladatokhoz.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Élesztők karakterisztikája

Az élesztőgombák egysejtű, eukarióta, szaprofita mikroorganizmusok, amelyek széles körben megtalálhatóak a természetben. Tagjait a *Fungi* (Gomba) ország, *Dikarya* alországából, az *Ascomycota* (Tömlősgomba) törzse adja, de pár *Basidiomycota* (bazídiumos gomba) egyed is megtalálható közöttük. A két törzs tagjait egyszerűen meg lehet különböztetni az ureáz teszttel, mivel a *Basidiomycota* törzs tagjai, az *Ascomycotákkal* ellentétben, képesek hidrolizálni a karbamidot (Guého-Kellermann, 2010). Sejtek gömb, ovális vagy hosszúkás alakúak lehetnek, 3 - 20 μm hosszúsággal. Szerkezetük a többi eukariótához hasonló felépítésű, rendelkeznek sejtfallal, sejtmaggal, mitokondriummal, vakuólummal (1. ábra).



1. ábra: Az élesztősejt felépítése
(Internet 1.)

Az élesztőgombák ivartalan szaporodása nagyrészt bimbózással és hasadással történik, oxigén jelenlétében vagy romló életkörülmények között pedig aszkospórákat képez. A penészgombákkal ellentétben nem alkotnak hifákat, a többsejtű szerveződését pszeudohifának hívjuk, melyen a sarjadzást követően együtt maradt sejtek láncszerű képleteit értjük.

Táptalajon telepeket alkotnak, amelyek színe többnyire fehér, narancssárga vagy rózsaszínű, állaga a krémes, nedvestől a száraz, durva felületűig terjed. Az élesztőgombák igen széles pH tartományban, pH 2 és pH 9 között, fordulnak elő, hőtűrésük 10-35 °C, de bizonyos egyedek e hőmérsékletek alatt és fölött is életképesek. (Tournas, 2001). A vegetatív

sejtek 65-70 °C környékén biztosan elpusztulnak, azonban a spórás sejtek ellenálló kitaró képlettel rendelkeznek.

Közel az összes élesztő obligát aerob, és O₂ szükséges a növekedésükhöz (O'Toole, 2019). Mivel az élesztők heterotróf életmódot folytatnak, szénre, nitrogénre, foszforra és nyomelemekre van szükségük, amelyek a növekedéshez, a metabolikus folyamatokhoz és a fermentációhoz is elengedhetetlenek. Az élesztők a környezetükben lévő szénhidrátokat képesek fermentálni etanol, CO₂ képzésével és 2 ATP felszabadításával.

A patogén gombák legnépesebb csoportját az *Ascomycota* törzs adja. A legtöbb megbetegedésért a *Candida* és a *Cryptococcus* nemzetség tagjai a felelősek, de több *Saccharomyces* és *Pichia* faj is szokott humán betegséget okozni. Nagy számban található közöttük fakultatív parazita vagy szimbiotikus életmódot folytató egyed is.

Mivel az emberiség évezredek óta fogyasztja a fermentálás útján előállított ételeket, italokat, a 19. században több neves tudós is igyekezett megismerni a fermentációs folyamatokat, így élesztőgombákról az 1830-as évektől kezdődően jelentek meg kutatások Charles Cagniard de la Tour, Theodor Schwann és Friedrich Traugott Kützing megfigyelései révén (Manchester, 1995). Az áttörést Louis Pasteur érte el, amikor az 1857-ben egy fermentálásban lévő ital vizsgálata közben bebizonyította, hogy élő szervezet végzi az etanolképzést, és megalkotta a ma ismert Pasteur-effektus fogalmát.

Borkészítésnél, sörfőzésnél és sütésnél hosszú idők óta használjuk, de ahogy fejlődik a tudomány, újabb és újabb biotechnológiai folyamatnál ismerik fel hasznosságukat, így az élesztőgombák kutatása megsokszorozódott az elmúlt évek során. A legszélesebb körben használt *Saccharomyces cerevisiae* gyártásának globális piaci növekedése 8,8% volt 2013 és 2018 között, és ez a szám nem valószínű, hogy csökkenni fog, hiszen a szűkös nyersanyagkészlet, a növekvő kereslet és az egyre szigorodó szabályzások mellett, az élesztőgombák számos technológiai folyamatban kínálnak környezetbarát és fenntartható megoldásokat.

3.2 Élesztők a biotechnológiában

Az élesztőket már sok évtizede használják fermentációs folyamatokhoz starter kultúráként söröknél, boroknál, cidereknél, sajtoknál, fermentált húskészítményeknél, péktermékeknel, fermentált olivabogyóknál, uborkáknál, kakaónál és nagy

alkoholszázalékkal rendelkező italoknál is, mint például a rum, a vodka, a whiskey vagy a saké. Emellett azonban érdemes megemlíteni, hogy bizonyos ételek romlásában is nagy szerepet játszanak, mint például a joghurtnál, a salátáknál vagy a gyümölcsleveknél.

Évtizedek óta használják az élesztőgombákat bioetanol gyártásra, ami egy megújuló energiaforrás a benzinnel szemben (Parapouli és Vasileiadis, 2020). Az 1973-as olajválság következtében világszinten megindult a bioüzemanyagokat gyártó üzemek bővítése és fejlesztése. Brazíliában a cukornád termelés 55%-át bioetanol gyártására használják fel, ami az ország energiaigényeinek a 30%-át fedezni. A *Saccharomyces cerevisiae* egy génmódosított törzsét még propanol és butanol szintézisére is használják.

Emellett számtalan enzimhez, mint például a lipáz, amiláz, inulinázok, celluláz β -glükozidáz, glükánáz gyártására, is használják. Manapság az ipari enzimek 90%-át rekombináns technológiával készült heterológ fehérjék adják.

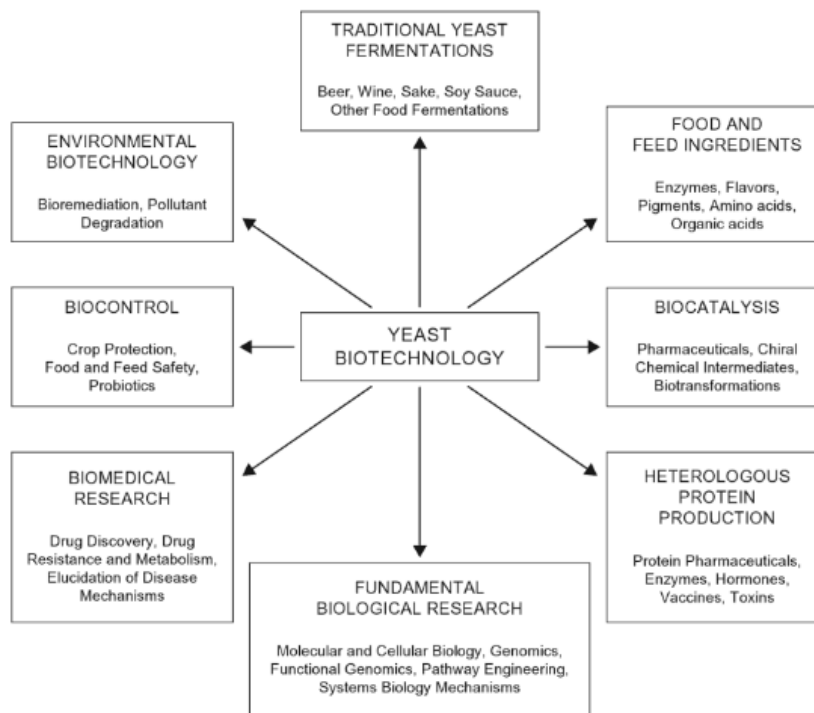
Biokatalizátorként gyógyszerkészítmények és finom vegyszerek előállításában is nagy szerepet játszanak, hiszen számos élesztőgomba faj képes megbirkózni a kémiai reakciók folyamán uralkodó szélsőséges környezeti hatásokkal. Élesztőgombák segítségével aminosavakat, szerves savakat, glicerolt, vitaminokat, glikolipideket, inzulint, flavonoidokat és poliketideket (Mutka és társai, 2006) is készítenek, gyógyászatban pedig a Hepatitis vakcináktól kezdve, Insulinhoz, rákos megbetegedések megelőzésére használt készítményekhez és növekedési hormonok előállításához is használják. Probiotikumként a *Saccharomyces boulardii*-t már 1950-től használják bélrendszeri megbetegedések kezelésére (Buts és Bernasconi, 2005), egyes egyedek pedig prebiotikumokat termelnek, amelyek a bifidobaktériumok, és más hasznos baktériumok növekedését serkentik az emberi és állati bélrendszerben.

A környezeti biotechnológián belül a bioremediációban és a szennyező anyagok lebontásában van szerepük. Az környezetünkbe számtalan nehézfém kerül közvetlenül nap mint nap, ami súlyos szennyezést okoz élő környezetünkben. Bizonyos élesztőgombák, mint például a *Schizosaccharomyces pombe*, vagy a *Candida* nemzetség pár faja, számos nehézfém megkötésében és átalakításában játszanak fontos szerepet (Gönen és Aksu, 2009). A mikotoxinok közül egyes élesztőgombák képesek bontani az ochratoxint, a xenobiotikumokat vagy a patulint.

Mivel az élelmiszerellátást egyre nehezebb kivitelezni, nagy szerepet kap a mezőgazdasági terménykihozatal maximalizálása. Bizonyos élesztőgombák a biológiai kontrollban játszanak szerepet, a terményeknél és az élelmiszereknél fellépő gombafertőzések visszaszorításával. Ahhoz, hogy az élesztőgombákat ilyen módon használhassák, előbb GRAS (generally recognized as safe) minősítést kell kapniuk. Ilyen fajok például a *Cryptococcus oleophila*, a *Candida sake* vagy a *Metschnikowia pulcherrima*.

A *Saccharomyces cerevisiae* azon kívül, hogy az ipari folyamatokhoz leggyakrabban használt élesztőgombák legnagyobb részét kiteszi, nagyon hasznos-modell organizmus az emlősök sejtbioológiájának megismeréséhez és a megbetegedések mechanizmusának a megértésében (Pache és társai, 2008). Nagy előnye a *Saccharomyces cerevisiae*-nak a többi eukariótával ellentétben, hogy jól fejlett genetikai állománnyal rendelkeznek, amelyet az eukarióták közül elsőként sikerült teljesen szekvenálni 1996-ban (Engel és társai, 2013). Ezen kívül gyorsan szaporodik, könnyű megfelelő körülményeket biztosítani a számára, majd az ezredforduló után az is kiderült, hogy az emberi szervezetben zajló sejt-, és molekuláris mechanizmus egy része az élesztőkben is jelen van. Françoise Foury (1997) kutatásában 170 megbetegedéssel kapcsolatos humán gént vizsgált, és ebből 52 mintánál derült ki, hogy ortológ az élesztőgomba génjével. Számos humán gént sikerült már élesztőgombákban kifejeztetni, ilyen például az ortológ CDC2 gén, amely komplementer lehet a cdc2 mutáns génnel a *Schizosaccharomyces pombe*-ban. Az élesztőgombák genetikai vizsgálatával megismerhetjük az irányított mutáció, a gén jelölések, az allélok funkcióját az emberi szervezetben is. A *Saccharomyces cerevisiae*t használják az Alzheimer kór, a Parkinson-kór, a rákos megbetegedések, az öregedés és a prionok okozta megbetegedések esetében is modell-organizmusként.

Ezek alapján megállapítható, hogy az élesztőgombák felhasználása a biotechnológiai folyamatokban igen sokrétű (2. ábra) és elengedhetetlen.



2.ábra: Az élesztőgombák felhasználása a biotechnológiában (Kurtzman, 2011)

3.3 Mikrobiológiai módszerek

Ahhoz, hogy egy élesztőgombát, vagy bármely mikroorganizmus működését megértsük, meg kell vizsgálnunk a felépítését. A vizsgálatokat a lehető legsterilebb körülmények között kell folytatni, hiszen a tiszta tenyészet létrehozása elengedhetetlen, így gumikesztyűben, és elszívófülke használata mellett végzik a munka nagy részét. Kétféle módszer létezik: a tenyésztésen alapuló mikrobiológiai eljárások és a tenyésztéstől független eljárások.

A tenyésztésen alapuló eljárások folyamán a sejtek izolálása, különböző tápközegekben való felszaporítása, majd a sejtek morfológiájának, élettanának és biokémiájának vizsgálata a cél. A tápközegek lehetnek szelektívek különböző fajokra az összetételük alapján. Az élesztőgombák vizsgálatához a szilárd táptalajon szélesztés a legmegfelelőbb módszer, ahol adott mennyiséget egyenletesen eloszlatunk a táptalaj felületén. Inkubálás után telepek nőnek a táptalaj felületén, melyek vizsgálhatók kvantitatív és kvalitatív módszerekkel. A sejtszámláláshoz a klasszikus mikrobiológiai módszerek közül a Bürker-kamra használata a legelterjedtebb, ahol meghatározott térfogatú cellákban számoljuk a sejteket mikroszkóp segítségével, majd abból számítjuk ki a telepképző egységek számát milliliterenként.

A tenyésztéstől független eljárások során DNS szekvenálásával megismerhetjük a mikroorganizmusok génállományának a felépítését. Ahhoz, hogy a nukleinsav-állományt vizsgálni lehessen, előbb meg kell tisztítani a sejt többi alkotójától. Ehhez előre gyártott speciális oldatokkal és tárolóegységekkel ellátott kiteket is lehet használni. Hogy a tisztítás sikerességét mérhessük, spektrofotometriás mérési technikát alkalmazhatunk. Ekkor a mintánkon keresztülvezetett lézernyaláb intenzitásváltozásából – amit a mért anyag abszorbanciájának a függvénye – következtethetünk a koncentrációra. A rep-PCR (Repetitive Polymerase Chain Reaction) során a DNS-ben található természetesen ismétlődő repetitív szakaszokhoz egy speciális komplementer primer köt, majd amplifikálja azokat. Az amplikonok specifikusan az adott fajra jellemzőek. Elektroforézis során pedig a DNS fragmentumok vándorlását idézzük elő elektromos térben, a kapott mintázatot pedig ultraibolya fény alatt láthatóvá válnak, segítségével megkülönböztető vizsgálatokat lehet végezni (Fritsch és Krause, 2003). A DNS szekvenálása után illesztőprogram segítségével összehasonlítható a kapott bázissorrend a publikus vagy privát adatbankokban tárolt mikroorganizmusok szekvenciájával.

Hogy megértsük a saját és a körülöttünk lévő élő és élettelen környezet működését, előbb meg kell ismerni és rendszerezni kell azt. Amikor ismerjük egy rendszer elemeit és azok funkcióit, sokkal összetettebb és precízebb eljárásokat alkothatunk meg, amelyek fenntartható módon segítik az életet.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A kutatás helyszíne

A vizsgálatok teljes egészét a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoportjának a Herman Ottó út 15. szám alatt található laborjában végeztem, 2021-ben.

4.2 A mintavétel

Az élesztőgomba izolátumokat az Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoport törzsgyűjteményéből kaptam. A mintákat -80 °C-on, Eppendorf csövekben tárolták.

4.3 Anyagok

- TBE puffer oldat (1. táblázat)

1. táblázat: 10X TBE puffer komponensei

Reakció komponensek	Mennyiség 10x mixhez
TRIS (Tris-hidroximetil-aminometán) Base	108 g
Bórsav	88 g
Na ₂ EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav)	9,3 g
MQ víz	800 ml

- primerek:

GTG₅: 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

- Dream Taq Polimeráz
- DNS marker: GeneRuler DNA Ladder Mix
- Blue Juice (9 V/V% 2-merkaptotanol, 22,7 w/V% Szacharóz, 4,5 w/V% Nátrium-dodecil-szulfát, 0,01 w/V% Brómfenolkék) (Rakwal, 1999)

- Malt Extract Agar: 1000 ml desztillált víz, 17 g maláta, 20 g agar
- Agarózgél:
 - 1,2%-os agarózgél: 50 ml 1x TBE Puffer, 0,6 g agaróz, 2,5 µl EcoSafe festék
 - 1%-os agarózgél: 25 ml 1x TBE Puffer, 0,25 g agaróz, 1,25 µl EcoSafe festék

4.4 Minták tápközegbe oltása

4.4.1 Tápleves készítés

A tápleveshez 8,5 g-ot mértem ki a Merck által gyártott Malt Extract Broth-ból egy Kern Complexlab típusú analitikai mérleggel, majd hozzáadtam 500 ml desztillált vizet, homogenizáltam, majd folyadékadagoló segítségével 9 ml-t adagoltam ki kémcsövekbe. Sterilizáláshoz egy Biobase típusú autoklávot használtam (121 °C, 20 perc).

4.4.2 Táptalaj készítés

A szélesztéshez használt szilárd tápközeg előállításához, az előzőekben leírt módon előállított tápleveshez a VWR Chemical által forgalmazott agarból (Bacteriological Agar) literenként 20 g-ot mértem hozzá, majd steriliztem. A tápagart 55 °C-ra, majd sterilfülke (FASTER, BH-EN 2004) alatt Petri-csészékbe öntöttem. Megszilárdulás után fejjel lefelé - hogy a párasodást elkerüljük – szobahőmérsékleten tároltam.

4.4.3 Beoltás

A malátalevest tartalmazó kémcsövekbe 100 µl-t pipettáztam a kiolvasztott élesztőgomba biomasszákból (YI4, YI6, YI7, YI8, YI9, YI10, YI11, YI12, YI15, YI16, YI17, YI19, YI20, YI21, YI22, YI23, YI24, YI25, YI26, YI27, YI28, YI29, YI30, YI32, YI33, YI34, YI35, YI36, YI41, YI42) (3.ábra), majd feliratoztam a kémcsöveket. A mintákat két napig szobahőmérsékleten inkubáltam, hogy az élesztőgombák megfelelően felszaporodjanak.



3. ábra: A minták egy része táplevesben (Saját kép)

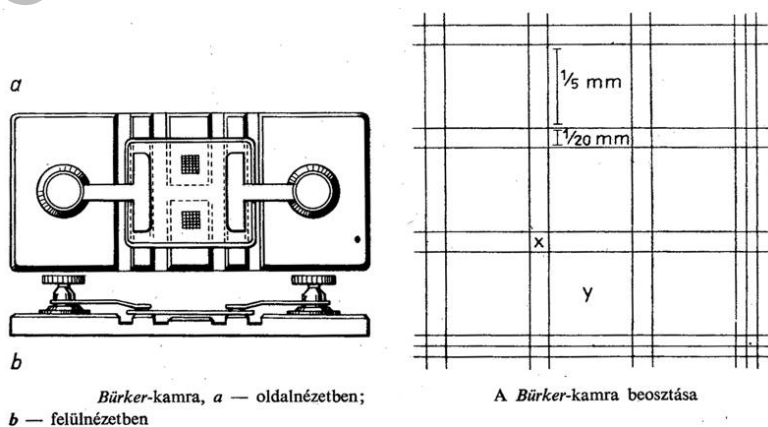
4.5 Klasszikus mikrobiológiai módszerek

4.5.1 Szélesztés

Hogy a telepek morfológiáját vizsgálhassam, és kizárhassam a kevert minták jelenlétét, szélesztést kellett alkalmaznom. A Petri-csészében lévő MEA (Malt Extract Agar) táptalajra pipettáztam 1 ml-t a felszaporodott élesztőgomba szuszpenziókból, ezután Bunsen-égő felett kiizzított szélesztőkaccsal szélesztettem a táptalaj felületére, majd szobahőmérsékleten 3 napig inkubáltam a lemezeket.

4.5.2 Bürker-kamrás sejtszámolás

A Bürker-kamrás sejtszámolás egy közvetlen mikroszkópos sejtszámolási módszer. Elsőként a mintámból egy 10x-es hígítást végeztem fiziológiás sóoldat segítségével, majd a Bürker-kamrát (4. ábra) tartalmazó tárgylemezre helyeztem a fedőlemezt.



4. ábra: A Bürker-kamra (Internet 2.)

Pipetta segítségével a hígított mintát a fedőlemez mellé cseppentettem, ami a felületi feszültség miatt beszívódott a Bürker-kamra belsejébe. Az objektív 40x-es nagyítási méretre állítása (400X-os nagyítás) után, mintánként 10 darab nagyobb méretű négyzetben számoltam meg a sejteket. A nagyobb oldalak hossza 0,2 mm, a tárgylemez és a fedőlemez között 0,1 mm, így minden négyzet felett $0,004 \text{ mm}^3$ oldat lesz. A sejszámokat átlagoltam, majd felszoroztam az oldat mennyiségével. Az eredményt TKE/ml egységben adtam meg. A sejtek számának milliliterben való meghatározása a számláló kamrával, egy általánosságban vett „arany sztenderd”, referencia módszer (Rodrigues, 1993).

4.6 Minták előkészítése a molekuláris mikrobiológiai vizsgálatokra

A kémcsövekben lévő felszaporodott élesztőgomba szuszpenziókból 500 μl -t pipettáztam Eppendorf-csövekbe, majd 500 μl steril glicerint adtam hozzá a sejtek védelme szempontjából. Ezután vortexeltem és $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam a további felhasználásig. Ezek a minták a „g” (glicerin) jelölést kapták és bármikor fel lehet használni további kutatásokra a jövőben is. Hogy molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgálhassam az élesztőgombákat, további 2 Eppendorf-csőbe pipettáztam 1000-1000 μl -t, centrifugáltam (12,000 rpm; 1 perc), a felülúszót lepipettáztam, majd az alján leülepedett biomasszát $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam (5. ábra). Ezek a „B” jelölésű minták, amikből később DNS-t fogok kivonni kittek segítségével.



5. ábra: Fagyasztásra váró minták (Y116, Y117, Y119, Y120, Y121, Y122, Y123, Y124, Y125) (Saját fénykép)

4.7 Molekuláris mikrobiológiai módszerek

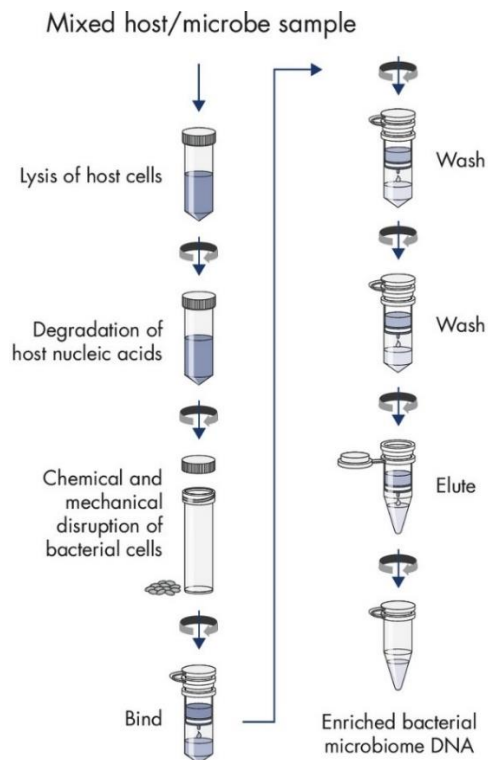
4.7.1 DNS izolálás

A DNS izolálását kétféle kittel végeztem el: az egyik a MasterPure Yeast DNA Purification Kit – Lucigen, amely nagy molekulatömegű DNS tisztításra lett létrehozva élesztő- és más gombákhoz, a másik pedig a Qiagen által forgalmazott DNeasy UltraClean Microbial Kit, amely segítségével élesztőkből, baktériumokból, gombákból és egyéb mikroorganizmusokból is el lehet végezni a DNS izolálását. Mindkét kittel a gyártói protokoll alapján használtam.

A MasterPure Yeast DNA Purification Kittel kezdtem, ennek első lépése volt, hogy a biomasszákat tartalmazó Eppendorf-csövekbe 300 µl Yeast Cell Lysis Solution-t pipettáztam, vortexeltem, majd 1 µl RNázt adtam hozzá és újabb vortexelés következett. Ezután inkubáltam (15 perc, 65 °C) a szuszpendált mintáimat egy Biosan, TS-100 Thermo Shaker alkalmazásával, hogy segítsem a sejtfalbontást, majd a mintákat jégre helyeztem 5 percre, hogy leállítsam az enzimek működését. Hozzáadtam 150 µl MPC Protein Precipitation Reagent-et, majd 10 másodpercig vortexeltem. Ezután egy Hettich, Mikro 120 típusú centrifugába helyeztem a mintákat (10 perc, 10,000 rpm). A felülúszót új, steril Eppendorf-csövekbe pipettáztam le, majd 500 µl izopropanolt adtam hozzá. Vortexelés után ismét a centrifugába helyeztem (10 perc, 10,000 rpm), majd az aljára leülepedett DNS-ről lepipettáztam a felülúszót. A pallethez 500 µl 70%-os etanolt adtam, majd ismét vortexeltem. Újabb centrifugálás után (10 perc, 10,000 rpm) lepipettáztam az etanolt. Végül 35 µl TE Pufferban szuszpendáltam a DNS-t, és a fagyasztóba helyeztem a mintákat további munkálatokra.

A DNeasy UltraClean Microbial Kit első lépéseként a felolvasztott biomasszához 300 µl PowerBead Solutiont adtam, vortexeltem, majd MicroBead csőbe pipettáztam. Ezzel a lépéssel az oldatunk stabilizálását és homogenizálását segítjük a PowerBead Solutionban található ásványi sókkal és pufferrel. Következő lépésként 50 µl Solution SL oldatot adtam

hozzá a mintákhoz. Ez a benne található anionos detergens (SDS) segítségével a lízist segíti a zsírsavak és lipidek lebontásával a membránból. Ezután a mintákat egy horizontális vortexen (MO BIO Vortex-Genie 2) rázattam 10 percig, amely során a kémiai mellett, mechanikai sejtfeltárás is történik. Ezután vortexelés következett (30 másodperc, 10,000 rpm), amely során a sejttörmelék az aljára kerül, a DNS viszont a felülúszóban maradt. 300 µl felülúszót 2 ml-es steril Eppendorf-csőbe pipettáztam, majd hozzáadtam 100 µl Solution IRS oldatot, vortexeltem, majd inkubáltam (5 perc, 4 °C). A Solution IRS kicsapja a sejttörmeléket és fehérjéket, amelyek később megzavarhatnák mérések pontosságát. Egy centrifugálás (1 perc, 10,000 rpm) után a felülúszót egy steril Eppendorf-csőbe pipettáztam. Ezután 900 µl Solution SB-t adtam a pellethez, amely a következő lépésben szereplő membránhoz való kötődését segíti a DNS-nek, majd vortexeltem. Ezután MB Spin Column csövekbe pipettáztam 700 µl-t a szuszpenzióból, majd centrifugáltam (30 másodperc, 10,000 rpm). A membrán tetején csak a DNS maradt, minden egyéb átszűrődött anyagot elöntöttem a cső aljából. A maradék szuszpenziót szintén a membránra juttattam, majd megismételtem a centrifugálást. A folyamat után 300 µl Solution MD4 oldatot adtam hozzá, majd centrifugáltam (30 másodperc, 10,000 rpm). A Solution MD4 egy etanolos oldat, amely tisztítja a DNS-t, valamint segíti a kötődését a szilika-membránhoz. Az átszűrt oldatot kiöntöttem, majd ismét centrifugáltam (1 perc, 10,000 rpm). Így eltávolítottam az etanolos oldatunkat, ami később megzavarná a további vizsgálatokat. Végül 50 µl Solution EB-t pipettáztam a membránszűrő közepére, amely kioldja a DNS-t a membránról, majd centrifugálás (30 másodperc, 10,000 rpm) következett. A DNS-t tartalmazó Eppendorf-csöveket ezután -20 °C-os fagyasztóba raktam. A folyamatot röviden a 6. ábra illusztrálja.



6. ábra: A DNeasy UltraClean Microbial Kit rövid folyamatábrája (Internet 3.)

4.7.2 DNS koncentráció meghatározása

A DNS minták koncentrációjának a meghatározásához Thermo Science - NanoDrop[®] spektrofotométert (7. ábra) használtam. A NanoDrop készülék előnye, hogy mikroliteres mintamennyiség szükséges csupán a méréshez. A purinnak 260 nm hullámhossz alatt, a pirimidinnek valamivel 260 nm felett van az abszorbancia-maximumuk, ezért a DNS bázisösszetételétől is függ a maximális abszorbancia.



7. ábra: NanoDrop[®] (Saját kép)

Első lépésként blankoltam a készüléket: TE Pufferral a MasterPure Yeast Kittel végzett mintáknál, és Solution EB-vel a DNeasy Microbila Kittel izolált mintáknál. A DNS szuszpenzióból 2 μ l-t pipettáztam a készülék mérőcellájára, lecsuktam a tetejét, és 260/280 nm és 230/260 nm hullámhosszon lemértem az abszorbanciát, amiből a műszer ng/ μ l mértékegységben megadta a nukleinsav tartalmat.

4.7.3 Repetitív PCR

A repetitív PCR (Repetitive Polymerase Chain Reaction) egy olyan innovatív eljárás, amely során a nukleinsavban természetesen előforduló konzervatív ismétlődő szekvenciákat egy primer és egy polimeráz segítségével amplifikálom. Ezek az ismétlődő szakaszok a különböző élesztőgombáknál különböző távolságokra vannak egymástól, különböző helyeken, így gélelektroforézissel különböző mintázatot adnak. A mintázat alapján az azonos csoportba tartozó minták közül elég csupán egyet szekvenálásra küldenem a költséghatékonyság végett.

A DNS templát amplifikálандó szakaszához az univerzális (GTG)₅ oligonukleotid primer 5'- GTGGTGGTGGTGGTG-3' köt (Simonetta Visintin, 2016). A replikációt egy termotabilizáló enzim végzi, a Dream Taq Polimeráz. Az új lánc a dNTP-ből fog felépülni, amelyben különböző nukleotid trifoszfátok találhatóak. A szétnyílt DNS-szálat a DMSO fogja stabilizálni. A Dream Taq Pufferunk biztosítja a megfelelő reakciókörülményeket (pH) a polimeráznak.

Az rep-PCR mix összetevőit (2. táblázat) egy sterilfülke alatt mértem össze, UV sterilizálás után, fokozottan ügyelve a befertőződés elkerülésére. Ennek ellenőrzésére egy minta nélküli negatív kontrollt is összemértem. A mérést egy Eppendorf Mastercycler nexus GX2 (8. ábra) típusú készülékkel végeztem, egy előre determinált program alapján. A program hőprofilja a következő volt:

1. kezdeti denaturálás: 95 °C - 6 perc
2. denaturálás: 95 °C - 30 másodperc (30 ciklus)
3. annellálás: 40 °C - 1 perc (30 ciklus)
4. extenzió: 71 °C - 8 perc (30 ciklus)
5. végső extenzió: 72 °C - 16 perc
6. hűtés, tárolás: 4 °C



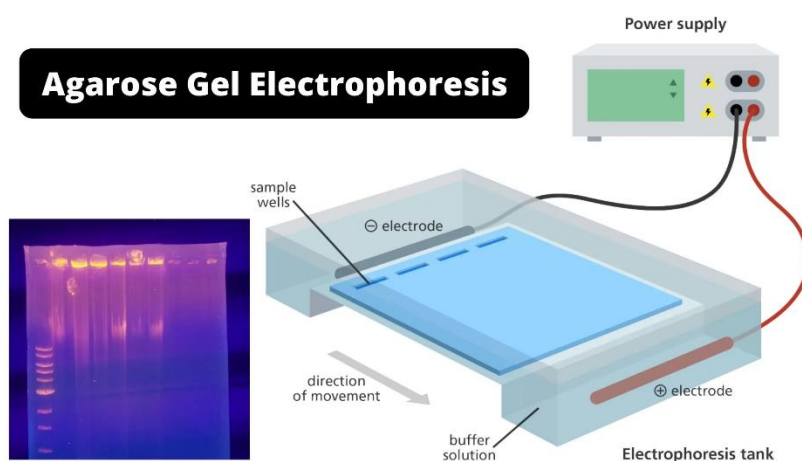
8.ábra: Mastercycler nexus GX2 (Saját kép)

2 táblázat: A rep-PCR összetevői egyszeres mintára

Komponensek	(μl)
MQ víz	27,5
dNTP	10
Dream Taq Puffer	5
DMSO	3
(GTG) ₅ primer	1
Dream Taq Polimeráz	0,5
templát (minta)	3

4.7.4 Gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis széles körben elterjedt módszer a DNS, RNS, vagy fehérjemolekulák szétválasztására. Alapja a DNS fragmentumok különböző mértékű elvándorlása a porózus agaróz mátrixon. Az elvándorlást a rendszerre csatlakoztatott elektromos mező indukálja, egy elektrolit alapú puffer segítségével (9. ábra).



9.ábra: Az agaróz gélelektroforézis (Internet 4.)

Első lépésként elkészítettem a gélt. 50 ml TBE Pufferhoz adtam hozzá 0,6 g agarózt, majd mikrohullámú sütőben felmelegítettem és homogenizáltam az oldatot. Miután kissé lehűlt, hozzáadtam 2,5 μ l EcoSafe DNS festéket. A gél megszilárdulása előtt egy fésűt helyeztem bele, amely későbbi eltávolítása után a zsebeket fogja eredményezni. 15 perc száradás után, a gélt TBE Puffert tartalmazó keretbe helyeztem, és betöltöttem a mintákat. Az első zsebbe a GeneRuler DNA Ladder Mix került, az utolsóba pedig egy negatív minta, hogy a szennyeződést kizárhassuk. A közöttük lévő zsebekbe kerültek a minták. Minden zsebbe 7 μ l minta került be összeszuszpendálva 3 μ l interkaláló Blue Juice festékkel. Az anód és katód felhelyezése után 90 percen keresztül futtattam a mintákat 80 V-on.

A futtatás végeztével egy Slite 200W GelDoc típusú készülékbe helyeztem a gélt, ahol 595 nm hullámhosszon világítottam meg UV fényel. Az sugárzás hatására a fluoreszcens festéket gerjesztettük, a DNS fragmentumok pedig szabad szemmel is detektálhatóvá váltak.

4.7.5 ITS- PCR

Az ITS-PCR során az amplifikálni kívánt szegmensünk egy ITS régió (Internal Transcribed Spacer). Schoch és munkatársai (2012) megállapították, hogy a rRNS-t kódoló szakaszok között elhelyezkedő ITS régió univerzális DNS-vonalkódnak tekinthető a gombák esetében. Ezek a régiók kedvezőek a szelektív folyamatokhoz, hiszen kis méretük ellenére az egymással közel rokonságba tartozó fajok közt is egyértelmű eltérések figyelhetők meg a bázissorrendjükben, így gyors, egyszerű a munkavégzés. A kísérlet összemérése (3. táblázat) során ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3' és ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' primereket használtam. A program hőprofilja a következő volt:

1. kezdeti denaturálás: 95 °C - 5 perc
2. denaturálás: 94 °C - 30 másodperc (50 ciklus)
3. annellálás: 48 °C - 30 másodperc (50 ciklus)
4. extenzió: 72 °C - 40 másodperc (50 ciklus)
5. végső extenzió: 72 °C - 10 perc
6. hűtés, tárolás: 4 °C

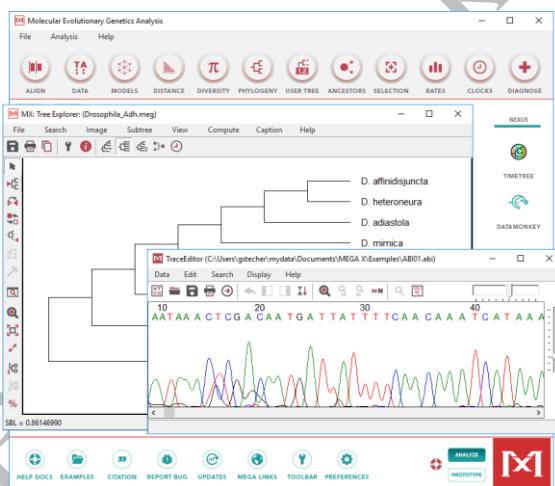
3. táblázat: Egy mintára vonatkoztatott ITS-PCR mix

Komponensek	(μ l)
MQ	28
dNTP	10
Taq puffer	5
DMSO	3
primerek (ITS1, ITS4)	0,5-0,5
MgCl ₂	1,5
BSA	0,5
Taq polimeráz	0,2
templát (minta)	3

A reakció sikerességét elektroforézissel ellenőriztem (1% agaróz gél).

4.7.6 DNS szekvenálás

Az eredmények csoportba rendezése után, a csoportokból 1-1 mintát küldtem szekvenálásra. A szekvenálást a Baseclear nevű holland cég végezte el. A kapott ITS szekvenciát MEGA11 (10. ábra) programmal vizsgáltam. A Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) szoftver, egy asztali alkalmazás, amivel összehasonlító analízist lehet végezni a homológ génszekvenciák között, akár azonos gén családból valóak, akár különböző fajból származnak (Sudhir Kumar, 2008). Így a DNS- és fehérjeevolúciós kapcsolatok könnyen feltérképezhetőek. A szekvenciákat egyesével megnyitottam a MEGA11 programban, ahol egy elektroferogram jelent meg, amelyen a migrációs idő függvényében láthatjuk az abszorbanciát, a bázissorrendet. Az első nagyjából 30 bázispár utáni bázissorrendet, körülbelül a 350. párig befejezőleg FASTA formátumban mentettem, és bemásoltam a YeastIP adatbázisába.



10.ábra: A MEGA program felülete (Internet 5.)

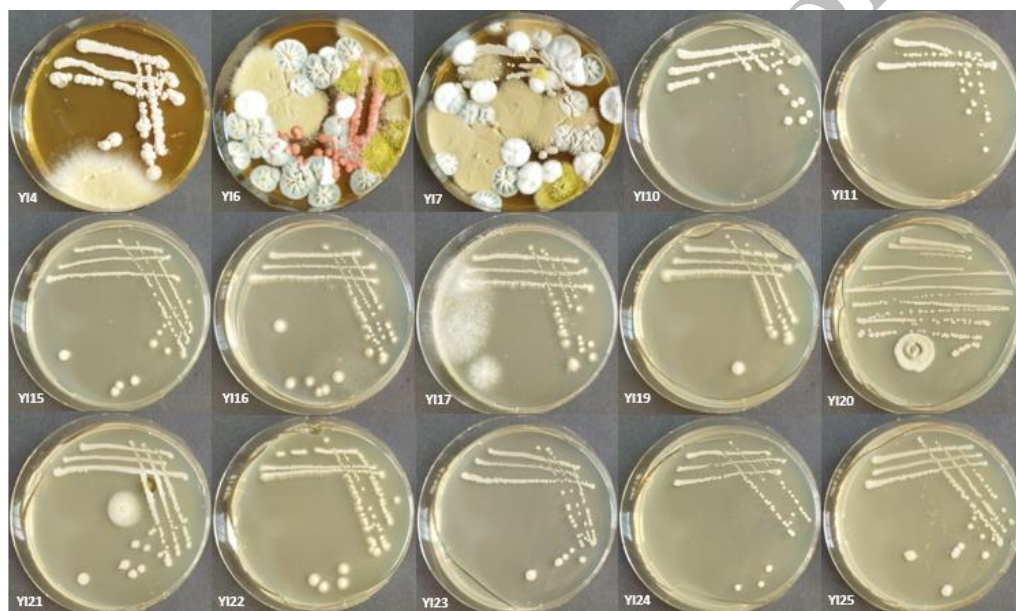
4.7.7 YeastIP

A YeastIP egy olyan ingyenes program, amely a CIRM (International Center of Microbial Resources) adatbankján keresztül több-ezer élesztőgomba törzs filogenetikai kapcsolata vizsgálható. A YeastIP tehát egy egyedi adatbázis, amely taxonómiai információk mellett segíti a felhasználókat a taxonómiai analízisükhöz (Stéphanie Weiss, 2013). A program tehát a minták szekvenciája és az adatbankban tárolt szekvenciák között keresi az azonosságot.

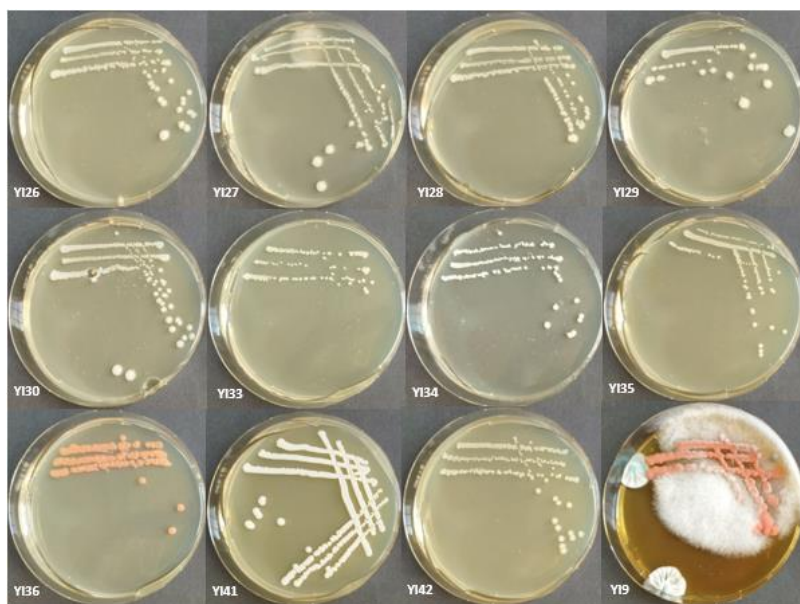
5 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

5.1 Szélesztés eredménye

A Petri-csészékben való szélesztés után a minták szobahőmérsékleten növekedtek 3 napon keresztül a MEA (VWR) táptalajon (a 4 penészgombával nagyon befertőzött lemezt csak az élesztőgomba telepek színének bemutatására csatoltam, ezeket a képeket egy előzetes leoltásból származnak két hét elteltével a leoltás után készültek), ezután vizsgáltam meg a telepek morfológiáját. A telepekről készült fényképek az 11. ábrán és az 12. ábrán láthatóak.



11. ábra: Az élesztőtelepek morfológiája 1. (Saját kép)



12. ábra: Az élesztőtelepek morfológiája 2. (Saját kép)

A telepek vizsgálata után két csoportra tudtam osztani morfológia alapján a mintákat. Az első csoportban krémes állagú, lazac-rózsaszínű telepek nőttek ki. Ebbe a csoportba három tenyészetet soroltam (YI6, YI9, YI36). A második csoportban fehér, viszonylag szabályos kör alakú, külön álló telepeket alkotó élesztőket figyeltem meg.

A minták közül három (YI8, YI12, YI32) nem növesztett telepeket, így ezekkel a mintákkal nem dolgoztam a későbbiekben.

5.2 Sejtszámlálás eredménye

A sejtszámlálást Bürker-kamra segítségével végeztem, 40x nagyításon. A mintákból tízes hígítás készítettem, de az eredményeket tartalmazó táblázatban (4. táblázat) már az eredeti mintára vonatkoztatott TKE (telepképző egység) van feltüntetve.

4. táblázat: A Bürker-kamrás sejtszámolás eredménye

Mintaszám	TKE/mL
YI4	1,40 x10 ⁷
YI6	9,25 x10 ⁶
YI7	7,75 x10 ⁶
YI9	1,08 x10 ⁷
YI10	1,20 x10 ⁷
YI11	2,95 x10 ⁷
YI15	1,25 x10 ⁷
YI16	1,68 x10 ⁷
YI17	1,60 x10 ⁷
YI19	1,33 x10 ⁷
YI20	5,75 x10 ⁶
YI21	1,60 x10 ⁷
YI22	1,53 x10 ⁷
YI23	1,03 x10 ⁷
YI24	4,00 x10 ⁶
YI25	8,74 x10 ⁶
YI26	1,00 x10 ⁷
YI27	1,15 x10 ⁷
YI28	1,19 x10 ⁸
YI29	1,63 x10 ⁷
YI30	2,28 x10 ⁷
YI33	6,75 x10 ⁶
YI34	2,53 x10 ⁷
YI35	9,50 x10 ⁶
YI36	2,50 x10 ⁶
YI41	8,50 x10 ⁶
YI42	1,68 x10 ⁷

Az élesztőgomba törzsek szaporodási kapacitásában adott körülmények között nem tapasztaltam jelentős különbségeket, mindegyik vizsgált törzs $2,5 \times 10^6$ és $2,95 \times 10^7$ tke/ml koncentrációt ért el az inkubáció végére, egyedül az YI28-as törzs ért el egy nagyságrenddel magasabb, $1,19 \times 10^8$ tke/ml értéket.

5.3 DNS kivonás eredménye

A DNS kivonást követően NanoDrop spektrofotométer segítségével mértem meg a nukleinsav koncentrációt, mind a MasterPure Yeast DNA Purification Kittel, mind a DNeasy UltraClean Microbial Kittel végzet extrakció esetében. A vizsgálatot 230 nm és 280 nm közötti hullámhossztartományban végeztem.

5. táblázat: A mért DNS koncentrációk (ng/μl)

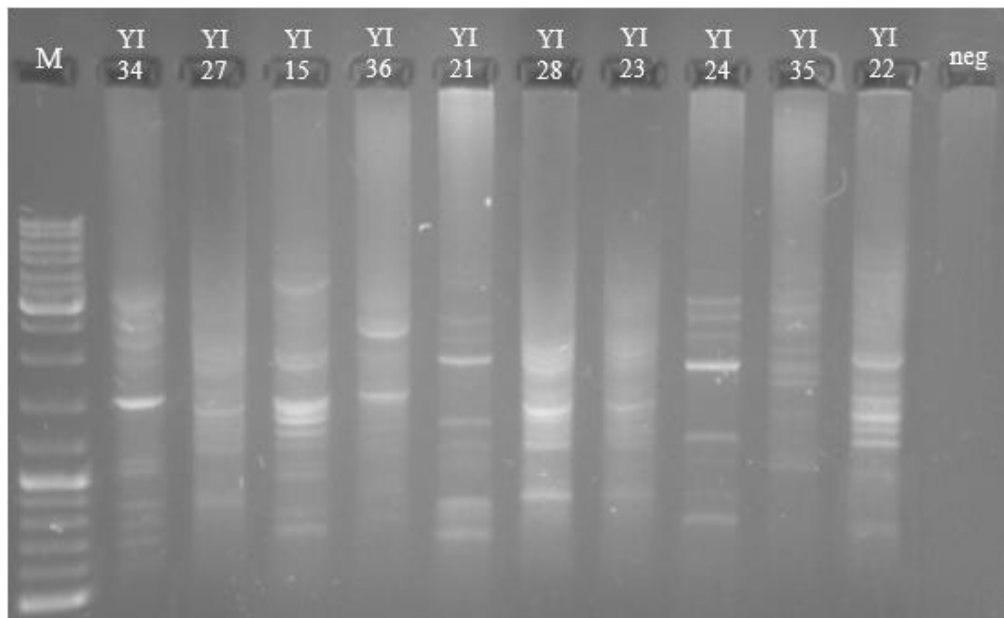
Minták	DNS koncentrációk (ng/μl)	
	MasterPure Yeast DNA Purification Kit	DNeasy UltraClean Microbial Kit
YI4	79,1	34,2
YI6	123	28,5
YI7	316,9	2
YI9	102,1	8,9
YI10	323,3	6,3
YI11	399,5	7,4
YI15	141,3	4,4
YI16	78,3	11,5
YI17	165,4	3,3
YI19	115,4	3,2
YI20	31,2	5,2
YI21	39,8	1,2
YI22	58,8	2,7
YI23	35,9	0,3
YI24	32,8	1,8
YI25	104,5	2
YI26	39,7	0,7
YI27	56,2	1,2
YI28	68,9	0,7
YI29	51,9	1,3
YI30	55,5	2,9
YI33	25,5	20,4
YI34	57,7	6,2
YI35	21,3	12,4
YI36	29,2	14,6
YI41	76,4	1,4
YI42	126,7	4

Az eredményekből leolvasható, hogy az élesztőgomba mintáknál a MasterPure Yeast DNA Purification Kittal végzett extrakció jóval nagyobb nukleinsav koncentrációt adott, mint a DNeasy UltraClean Microbilia Kittal való DNS kivonás. Előbbinél a legkisebb mért koncentráció 21,3 ng/μl, a legnagyobb 399,5 ng/μl volt, utóbbinál 0,7 ng/μl és 34,2 ng/μl közötti értékeket kaptunk. Az eredmény igazolja, hogy ezt a kittel kimondottan az gombák DNS-ének kivonására ajánlják.

5.4 REP-PCR eredménye

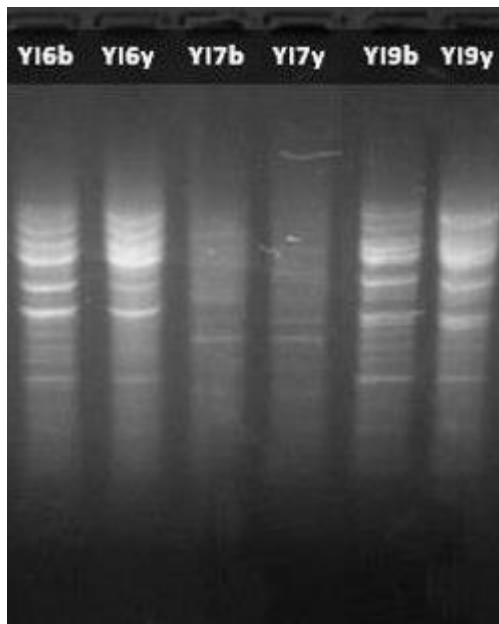
A REP-PCR (Repetitive Polimerase Chain Reaction) minden mintára el lett végezve, ennek sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Ezzel a módszerrel UV megvilágítással, szabad szemmel láthatjuk az amplifikált fragmentumokat, azok számát és

méretét. Az első futtatás eredményén (13. ábra) jól látható, hogy az utolsó zsebben lévő negatív mintánál nem jelentek meg fragmentumok, ezek szerint nem volt szennyeződés a reakcióelegy komponenseiben és az összeállítás során. Az első zsebben lévő „M” jelzésű minta a DNS marker, az utolsóba a negatív minta került.



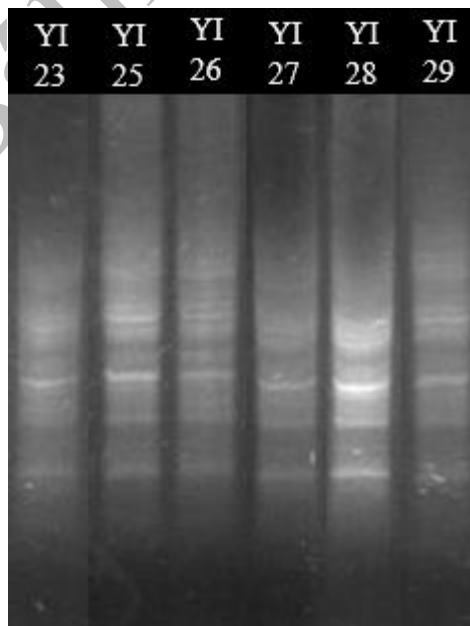
13. ábra: A REP-PCR eredménye (minták: DNS marker, YI34, YI27, YI15, YI36, YI21, YI28, YI23, YI24, YI35, YI22, negatív minta) (Saját kép)

A futtatásokat elvégeztem a MasterPure Yeast DNA Purification Kittel és a DNeasy UltraClean Microbial Kittel izolált mintáknál is, és az eredményekből az látható, hogy a REP-PCR mindkét esetben sikeresnek bizonyult (14. ábra). A mintaszám után található „y” jelölés az élesztő (yeast), a „b” jelölés a baktérium szót jelöli, utalva a két kittle. A mintázatok alapján elmondható, hogy függetlenül attól, hogy a gombák DNS-ének izolálására fejlesztett kittel jobb DNS kihozatal volt elérhető, mint a baktériumokra fejlesztett kittel, a rep-PCR vizsgálatokhoz mindkét DNS minősége és mennyisége elegendőnek bizonyult, mert a mintázatokban nem találtunk különbséget.



14. ábra: A két Kittel elvégzett REP-PCR eredménye (YI6, YI7, YI9) (Saját kép)

A futtatás után csoportokba rendeztem az azonos mintázatot adó mintákat (15. ábra). Így összesen 14 csoportot különítettem el meg az összesen 27 mintából (6. táblázat). Az egy csoportba kerülő mintázatoknál azt feltételezhetjük, hogy az élesztőgombák azonos fajba tartoznak.



15. ábra: A 9. csoportba tartozó minták (Saját kép)

6. táblázat: A REP-PCR 14 csoportja

Csoport	Minta
1.	YI4, YI10
2.	YI7
3.	YI6
4.	YI9
5.	YI11, YI35
6.	YI15, YI16, YI17, YI19, YI22
7.	YI20
8.	YI21
9.	YI23, YI25, YI26, YI27, YI28, YI29
10.	YI24
11.	YI30
12.	YI33, YI41
13.	YI34, YI36
14.	YI42

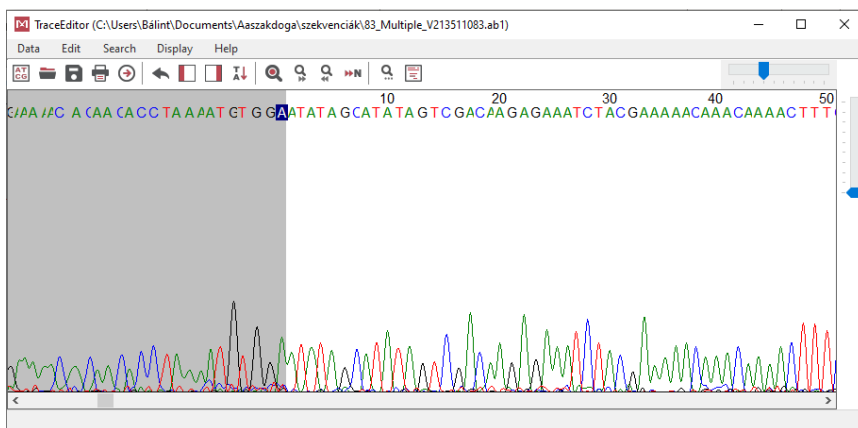
A vastagon szedett 14 mintával dolgoztam tovább. A kiválasztott törzsek reprezentálják a csoportjuk többi tagját az azonosításukra irányuló további vizsgálatokban.

5.5 ITS-PCR eredménye

Az ITS-PCR eredményének ellenőrzését szintén gélelektroforézissel végeztem. Az összes mintánál megjelentek az ITS régiók az 500 bp (bázispár) jelző marker-vonallal nagyjából egy magasságban, beszenyezés sem történt, így az amplikonok alkalmasak voltak a szekvenálásra.

5.6 Szekvenálás eredményei

A kapott szekvenciákat a MEGA11 nevű szoftverrel dolgoztam fel (16. ábra) majd a kivágott bázissortrendet a YeastIP nevű bioinformatikai adatbank segítségével azonosítottam. A program az adatbázisban tárolt és az általunk beillesztett szekvencia közötti hasonlóságot mutatja százalékban (17. ábra). Minél nagyobb a százalék, annál nagyobb a hasonlóság.



16. ábra: Az YI22 minta elektroferogramja (Saját kép)

Identification result

Your job **Query** matches with ***Diutina pseudorugosa*** sequence with identities : **269/281 (95%)** .
The database contains marker **ACT1** and **LSU D1/D2** for this strain.

Select number of species:

Select only first sequences to retrieve it in a fasta file:

17. ábra: Az YI7 minta szekvenciájának összehasonlítása a YeastIP adatbankjával (Saját kép)

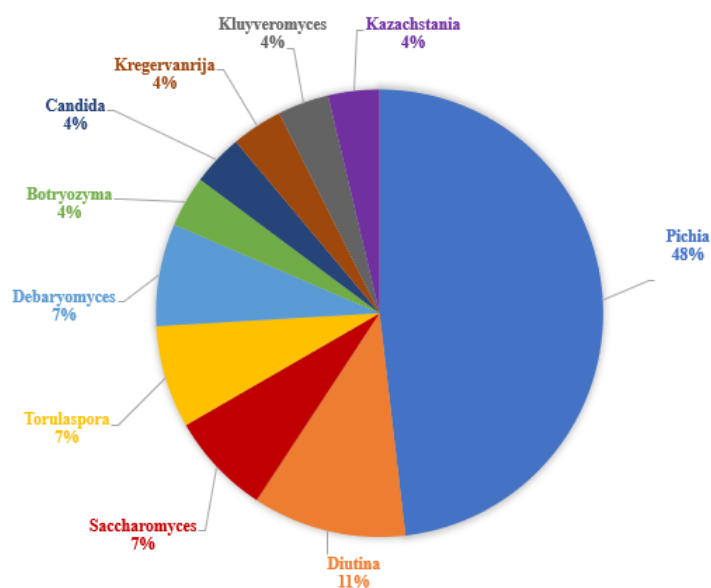
A 27 darab izolátumból 14 különböző fajt azonosítottam (7. táblázat)

7. táblázat: Az azonosított fajok

Mintaszám	Faj
Y123	<i>Pichia fermentans</i>
Y125	<i>Pichia fermentans</i>
Y126	<i>Pichia fermentans</i>
Y127	<i>Pichia fermentans</i>
Y128	<i>Pichia fermentans</i>
Y129	<i>Pichia fermentans</i>
Y115	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Y116	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Y117	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Y119	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Y122	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Y14	<i>Diutina catenulata</i>
Y110	<i>Diutina catenulata</i>
Y111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y135	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y133	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Y141	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Y134	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
Y136	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
Y16	<i>Botryozyma mucatilis</i>
Y17	<i>Diutina pseudorugosa</i>
Y19	<i>Candida oregonensis</i>
Y120	<i>Pichia manshurica</i>
Y121	<i>Pichia kluyveri</i>
Y124	<i>Kregervanrija fluxuum</i>
Y130	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Y142	<i>Kazachstania bulderi</i>

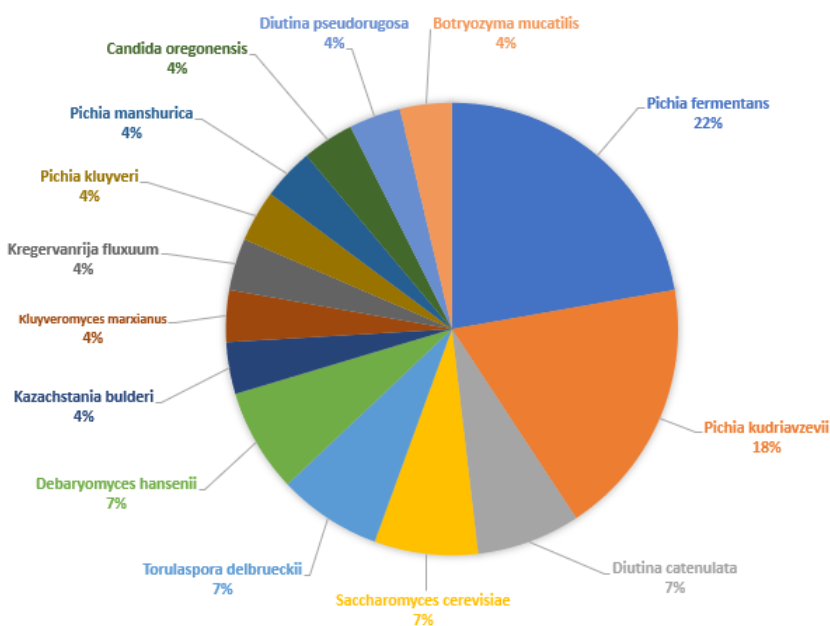
5.7 Az azonosított élesztőgombák rövid jellemzése

A minták az *Ascomycota* (Tömlősgomba) törzshöz tartoztak, azon belül is a *Saccharomycetales* rendhez. Ez az egyetlen rend a *Saccharomycetes* osztályon belül, és 16 családot foglal magába. Poliszacharid burok nélküli, jól fejlett micélium jellemző rájuk. A hosszúkás vagy ellipszoid aszkuszok a gametangiumok fúziójával jönnek létre. Ezek az élesztők fontos ipari és biotechnológiai folyamatokért felelősek, beleértve a sütést, a sörfőzést és a rekombináns fehérjék szintézisét (Sung-Oui Suh, 2006). A mintáink 10 nemzetségből származtak, ezek eloszlását az 18. ábra szemlélteti.



18. ábra: Az élesztőgombák nemzetségi eloszlása

A 27 élesztőminta nagy diverzitást mutatott faji szinten. A *Pichia fermentans* 22%-ban (6 darab) volt jelen, majd a *Pichia kudriavzevii* 18%-ban (5 darab), utána a *Diutina catenulata*, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Torulaspora delbrueckii* és a *Debaryomyces hansenii* 7%-ban (2 darab). A maradék 32%-ot a *Kazachstania bulderi*, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Kregervanrija fluxuum*, a *Pichia kluyveri*, a *Pichia manshurica* és a *Candida oregonensis* egy-egy törzse teszi ki (19. ábra).



19. ábra: Az élesztőfajok százalékos eloszlása

A *Pichiaceae* családjába tartozó *Pichia kudriavzevii* (korábbi nevén: *Candida krusei*) (Douglass, 2018) egy fakultatív, sárgásfehér telepeket alkotó, kataláz pozitív élesztőgomba. Szaporodása a haploid sejtek fúziójával történik. Igen ellenálló a stresszhatásokkal szemben (pH, gombaölőszerek). Nagy mennyiségű etanolt állít elő, így a bioüzemanyag gyártáshoz, valamint számos fermentálással készülő ételhez és italhoz is használják. Embereknél okozhat csecsemőkori hasmenést és akár szisztémás megbetegedéseket is. Izolálták már sörből, tejtermékekből, bőrről és állati székletből is.

A *Pichia fermentans* sarjadzással szaporodó, krém-, vagy sárgásszínű telepeket alkotó élesztő. A glükózt fermentálja, így használják szeszesitalok készítésénél, de Alexander de Silva Vale és társai (2019) munkájából kiderül, hogy a kávészemek fermentálását is segíti. Megtalálhatóak az emberi bőr felületén, de talaj és vízmintákból is mutatták már ki. A szőlőszemek felületén is gyakran előfordul.

A *Pichia manshurica* először 1914-ben lett izolálva Saito által (Mikata Kozaburo, 2000). A hagyományos fermentálással készülő ételekben gyakran megtalálható. Vörösborból is kimutatták (Saez, 2011), mert illó fenolokat képez, amelyek igen kellemetlen szagot és ízt kölcsönöznek a bornak.

Pichia kluyveri enyhén gömb formájú, 2-10 µm nagyságú élesztőgomba. Glükózt fermentál, de a keletkező etanolnak viszonylag alacsony a kihozatala (0,36g etanol/1 g cukor). Sörök erjesztéséhez használják, boroknál illó fenolokat képezhet.

A *Diutina catenulata* (korábbi nevén: *Candida catenulata*) a *Metschnikowiaceae* családba tartozó élesztőgomba, ami ráncos, krém színű telepeket képez Sabouraud dextróz agaron. A galaktózt és a glükózt bontja. Emberekből és állatokból is kimutatták már jelenlétét (Rosema Santin, 2012), és habár élesztő patogén gomba, embereknél nagyon ritkán okoz megbetegedést.

A *Diutina* nemzetséghez tartozó *Diutina pseudorugosa* (korábbi nevén: *Candida pseudorugosa*) kerek vagy ovális, fehér sejtekkel rendelkezik, és sarjadzással szaporodik. A vele közeli rokonságban álló *Diutina rugosa* mellett a *D. pseudorugosa* is opportunistá élesztőgomba, már klinikai mintákból is kimutatták (Ming, C., 2018). A cukrot fermentálja etanollá, így számos helyen fellelhető a környezetben.

A *Metschnikowiaceae* családjába tartozó *Candida oregonensis* igen domináns élesztőfaj. Főleg a glükózt bontja, de a fruktózt és a malátát is tudja fermentálni. Világszerte

megtalálható a gyümölcsök felületén, az emberi és állati bélrendszerben, de újabb kutatások kimutatták, hogy a ganajtúrók emésztőrendszerében helyet foglalva, szimbiotikus kapcsolatot létesíthetnek a bogarakkal (Stefanini, 2018).

A *Botryozyma mucatilis* egy lazacszínű, krémes állagú, 2-4 µm nagyságú, sejtvégen sarjadzással szaporodó élesztőgomba a *Trigonopsidaceae* családból. Az egyetlen mintánk volt, melyet nem a *Saccharomycetaceae* vagy a *Metschnikowiaceae/Debaryomycetaceae* családba tartozik. Korábban a *Panagrellus dubius* fonalféreg felületéről izolálták Oregon államban (Kerrigan, 2004).

A *Saccharomyces cerevisiae* a legelterjedtebb élesztőgomba a világon. Fakultatív anaerob szervezet, amely a cukrot alkohollá alakítja. Boroktól kezdve, sörfőzéshez, sütéshez, desztillált italokhoz, teákhoz is használják, valamint a bioetanol gyártás legfontosabb eleme (Walker és Walker, 2018). Sejtszerkezeti alapelemei, a makromolekula szintézis, a kromoszóma replikáció és a kromoszóma szegregációja nagymértékben homológ a magasabb rendű növényi és állati sejtekkel, ezért Parapouli és társai (2020) kimutatták, hogy jó mintaszervezet és értékes eszköz az alap kutatások minden területén.

A *Kluyveromyces marxianus* (CBS 712) a *Saccharomycetaceae* családjába tartozó élesztőgomba. Sejtjei ovális vagy hosszúkásak, agaron krémes színű, fényes sima telepeket alkot. Számos helyen kimutatták már a környezetből. Hidrolitikus enzimeket választ ki, így a későbbiekben alkalmas lehet a CBP-re (Consolidated Bioprocessing). Aerob környezetben szubsztrátok széles skáláját tudja hasznosítani. Tequila készítéséhez előszeretettel használják speciális fruktanáz termelése miatt, amivel cukrosítani is tud az etanol képzése mellett (Flores és társai, 2013)

A *Kregervanrija fluxuum* (korábbi nevén: *Pichia fluxuum*) telepeinek színe krémes, felülete durva, száraz hatású. A *K. fluxuum* volt az első jegyzett aszkospórási tagja a *Kregervanrija* nemzetségnek, később pedig a család típusfajává választották (Kurtzman, 2006). A glükózt alakítja át. Romlott ételeken, italokon többször azonosították, de Kántor és társai (2016) borból is kimutatták már.

A *Debaryomycetaceae* családjába tartozó *Debaryomyces hansenii* krémes színű, durva, száraz telepeket alkot agaron. Megtalálható természetes szubsztrátokban és sajtok széles körében, de izolálták már óceánból is. A *D. hansenii* ozmo-, halo-, és xerotoleráns élesztő (Breuer, 2006), és ezen kívül számos toxint termel és meg is tűr a környezetében. Igen kis mértékben fermentál, azonban anaerob körülmények között is képes a növekedésre (Visser, 1990). Érdekes még megemlíteni, hogy nagy mennyiségben termel és halmoz fel lipideket.

A *Torulaspota* nemzetség legtöbbet tanulmányozott tagja a *Torulaspota delbrueckii*. Agaron fehér, fényes, sima telepeket alkot. Opportunista patogénként tartják számon, izolálták talajból, növényekről és rovarokról is. Számos ételhez és italhoz használják, de leginkább a borászatban hasznosítják, hiszen jelenléte számos előnnyel jár a bor végső minősége szempontjából (Ramírez és Velázquez, 2018).

A *Kazachstania bulderi* (korábbi nevén: *Saccharomyces bulderi*) a *Saccharomycetaceae* családba tartozó élesztőgombafaj. Alacsony pH-n történő fermentációkhoz jól használható, hiszen pH 2.5 és 5 pH között is tud szaporodni. Mutatták már ki anaerob kukoricaszilázsából (Wang és Sun, 2021). Urien és társai (2019) kínai farmerek kovászából mutatta ki.

Holló Bálint Szakdolgozat

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás során a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoportja 30 darab ismeretlen eredetű élesztőgomba izolátumot bocsájtott a rendelkezésemre a törzsgyűjteményükből. Célom az volt, hogy a kapott élesztőmintákat faj szinten azonosítsam. A -80 °C-on tárolt izolátumokat folyékony és szilárd tápközegen felszaporítottam, mikroszkóp segítségével Petri-csészében vizsgáltam, majd Bürker kamrával sejtszámlálást végeztem rajtuk. Három minta (YI8, YI12, YI32) nem mutatott telepképzést, így őket a későbbiekben nem használtam. A nukleinsavak tisztítását a Lucigen cég MasterPure Yeast DNA Purification Kitjével, amit kifejezetten élesztőkhöz ajánlanak, és a Qiagen cég DNeasy UltraClean Microbial Kitjével végeztem, ami szélesebb körben használható a mikroorganizmusok között. A folyamat sikerességét spektrofotométer segítségével ellenőriztem, amiből egyértelműen kiderült, hogy az élesztőgombákra specializált MasterPure kit, nagyságrenddel nagyobb DNS koncentrációt eredményezett, így a későbbiekben élesztőgombák DNS izolálásához az élesztős kit használatát javaslom. Ezután rep-PCR és ITS-PCR segítségével ampifikáltam a nukleinsavak természetesen ismétlődő régióit, majd gélelektroforézis segítségével választottam szét a fragmentumokat. A kivont DNS rep-PCR gélképe mind a két kit esetében az összes mintánál azonos mintázatot adott. A kapott nukleinsav-mintázatokat csoportokba rendeztem, és a csoportokból 1-1 mintát szekvenálásra küldtem egy külsős cégnek. A kapott szekvenciákat a MEGA11 program segítségével összehasonlítottam az ingyenesen hozzáférhető online adatbázissal.

A minták azonosítottam, és rövid elemzést végeztem rajtuk. A 27 darab izolátumot összesen 14 fajként azonosítottam. Az azonosított élesztőgombák a későbbiekben felhasználhatóak egyéb vizsgálatokra.

7 IRODALOMJEGYZÉK

Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437. doi:10.1002/yea.1374

Buts, J.-P., & Bernasconi, P. (2005). *Saccharomyces boulardii*: Basic Science and Clinical Applications in Gastroenterology. *Gastroenterology Clinics of North America*, 34(3), 515–532. doi:10.1016/j.gtc.2005.05.009

Da Silva Vale, A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Rodrigues, C., Pagnoncelli, M. G. B., & Soccol, C. R. (2019). Effect of co-Inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus acidilactici* on Metabolite Produced During Fermentation and Volatile Composition of Coffee Beans. *Fermentation*, 5(3), 67. doi:10.3390/fermentation5030067

Douglass, A. P., Offei, B., Braun-Galleani, S., Coughlan, A. Y., Martos, A. A. R., Ortiz-Merino, R. A., ... Wolfe, K. H. (2018). Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLOS Pathogens*, 14(7), e1007138. doi:10.1371/journal.ppat.1007138

Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., ... Cherry, J. M. (2013). The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* : Then and now . *G3*; Genes|Genomes|Genetics, 4(3), 389–398. doi:10.1534/g3.113.008995

Flores, J.-A., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E. J., Arellano, M., & Arrizon, J. (2013). Simultaneous saccharification and fermentation of Agave tequilana fructans by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production. *Bioresource Technology*, 146, 267–273. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.07

Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195(1), 1–10. doi:10.1016/s0378-1119(97)00140-6

Fritsch, R. J., & Krause, I. (2003). ELECTROPHORESIS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2055–2062. doi:10.1016/b0-12-227055-x/01409-7

Gönen, F., & Aksu, Z. (2009). Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: Use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2-3), 1512–1519. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.021

Guého-Kellermann, E., Boekhout, T., Begerow, D. (2010). Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. In: Boekhout, T., Mayser, P., Guého-Kellermann, E., Velegaki, A. (eds)

Malassezia and the Skin. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03616-3_2

Kántor, A., Petrová, J., Hleba, L., Kluz, M., & Kačániová, M. (2016). Determination of Spoilage Yeasts in Different Red and White Wines. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies / Lucrari Stiintifice: Zootehnie Si Biotehnologii*, 49(2), 57–65.

Kerrigan, J., Smith, M., Rogers, J., & Poot, G. (2004). sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast associated with nematodes in poplar slime flux. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 849–856. doi:10.1016/j.femsyr.2004.06.002

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K., MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences, *Briefings in Bioinformatics*, Volume 9, Issue 4, July 2008, Pages 299–306, <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>

Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., (2011). The yeasts, a taxonomic study, volume 1-2-3, fifth edition, ISBN: 978-0-123-84708-9 (Volume 1), 978-0-123-84707-2 (Volume 2), 978-0-123-84868-0 (Volume 3)

Manchester, K. L. (1995). Louis Pasteur (1822–1895) — chance and the prepared mind. *Trends in Biotechnology*, 13(12), 511–515. doi:10.1016/s0167-7799(00)89014-9

Mikata K., Ueda-Nishimura K. (2000) Reclassification of *Pichia membranifaciens* sensu strictu. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77:159–171

Ming, C., Huang, J., Wang, Y., Lv, Q., Zhou, B., Liu, T., ... Kang, Y. (2018). Revision of the medically relevant species of the yeast genus *Diutina*. *Medical Mycology*. doi:10.1093/mmy/myy001

Mutka, S. C., Bondi, S. M., Carney, J. R., Da Silva, N. A., & Kealey, J. T. (2006). Metabolic pathway engineering for complex polyketide biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 40–47. doi:10.1111/j.1567-1356.2005.00001.x

O'toole, D. K. (2019). The role of microorganisms in soy sauce production. *Advances in Applied Microbiology*, 45–113. doi:10.1016/bs.aambs.2019.07.002

Pache, R. A., Zanzoni, A., Naval, J., Mas, J. M., & Aloy, P. (2008). Towards a molecular characterisation of pathological pathways. *FEBS Letters*, 582(8), 1259–1265. , <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.014>

Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.* ;6(1):1-31. doi: 10.3934/microbiol.2020001. PMID: 32226912; PMCID: PMC7099199.

Rakwal, R., Agrawal, G. K., & Yonekura, M. (1999). Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. *Electrophoresis*, 20(17), 3472–3478. doi:10.1002/(sici)1522-2683(19991101)20:17<3472::aid-elps3472>3.0.co;2-0

Ramírez, M., & Velázquez, R. (2018). The yeast *Torulaspota delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation*, 4(4), 94. doi:10.3390/fermentation4040094

Rodrigues, A., Vaz, C. P., da Fonseca, A. F., & de-Oliveira, J. M. (1993). Evaluating the Concentration of a *Candida albicans* suspension. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1(3), 134–136. doi:10.1155/s1064744993000304

Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E., & Sangorrín, M. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28(3), 503–509. doi:10.1016/j.fm.2010.10.019

Santin, R., Mattei, A. S., Waller, S. B., Madrid, I. M., Cleff, M. B., Xavier, M. O., ... Meireles, M. C. A. (2013). Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 139–144. doi:10.1590/s1517-83822013005000018

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, and Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6241–6246 , <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*, 35(4), 315–330. doi:10.1002/yea.3309

Suh S.-O., Blackwell M., Kurtzman C.P. & Lachance M.-A., (2006) Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts, *Mycologia*, 98:6, 1006-1017, DOI: 10.1080/15572536.2006.11832629

Tournas V., Stack M.E., Mislivec P.B., Koch H.A., and Bandler R., (2001) *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 18: Yeasts, Molds, Mycotoxins

Urien, C., Legrand, J., Montalent, P., Casaregola, S., & Sicard, D. (2019). Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00201

Visintin S., Ramos C.L., Batista N.N., Dolci P., Schwan R.F., Cocolin L., Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation, *International Journal of Food Microbiology* (2016), doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004

Visser, W, Scheffers W.A., Batenburg-van der Vegte W.H. and van Dijken J.P., (1990), *Applied and Environmental Microbiology* Volume 56, Issue 12, Oxygen requirements of yeasts, <https://doi.org/10.1128/aem.56.12.3785-3792.1990>

Walker & Walker, (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. doi:10.1016/bs.aams.2018.05.003

Wang, Sun, Xu, Na, Yin, Liu,... Xue, (2021). Microbial Communities, Metabolites, Fermentation Quality and Aerobic Stability of Whole-Plant Corn Silage Collected from Family Farms in Desert Steppe of North China. *Processes*, 9(5), 784. doi:10.3390/pr9050784

Weiss S., Samson F., Navarro D., Casaregola S., YeastIP: a database for identification and phylogeny of *Saccharomycotina* yeasts, *FEMS Yeast Research*, Volume 13, Issue 1, February 2013, Pages 117–125, <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12017>

Internet 1.: <https://stock.adobe.com/de/search?k=yeast+cell>

Internet 2.: <https://labtutorials.org/2013/10/09/sejtszamoslas/>

Internet 3.: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/qiaamp-dna-microbiome-kit/>

Internet 4.: <https://microbiologynote.com/agarose-gel-electrophoresis-definition-principle-procedure-applications/>

Internet 5.: https://www.megasoftware.net/dload_win_beta

8 MELLÉKLET

- Összefoglaló

Holló Bálint Szakdolgozat

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat létrejöttéhez először is szeretnék köszönetet mondani édesanyámnak és a barátaimnak, akik támogatása nélkül nem jutottam volna el idáig.

Köszönettel tartozom a témavezetőimnek Dr. Csernus Olíviának és Batáné dr. Vidács Ildikónak, akik nagy türelmükkel és szaktudásukkal segítettek a dolgozat elkészülésében, valamint Dr. Kosztik Juditnak, aki a laborban végzett munka folyamán nagyon segítőkész volt.

Holló Bálint Szakdolgozat

10 NYILATKOZATOK

Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar

Szerzői nyilatkozat

Alulírott Holló Bálint (Biomérnök, nappali), kijelentem, hogy az Élesztőgomba izolátumok azonosítása című szakdolgozat a saját munkám eredménye. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlanul állítottam tudomásul veszem, hogy a Záróvizsgabizottság a záróvizsgából kizár és záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

Budapest, 2022.11.08.



a hallgató aláírása

KÖNYVTÁRI NYILATKOZAT

a szakdolgozat, diplomamunka nyilvános hozzáféréséről

A szerző neve: Holló Bálint

A dolgozat címe: Élesztőgomba izolatumok azonosítása

A megjelenés éve: 2022

A tanszék neve: Sőr- és Szeszipari Tanszék

Kijelentem, hogy diplomadolgozatomban papír és elektronikus változata tartalmilag és formailag azonos.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatomban elektronikus változata felfőltésre kerül a SZIE Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár szakdolgozat archívumába. A teljes szöveg kizárólag a Budai Campus számítógépeiről tekinthető meg.

A vízjellel ellátott pdf dokumentum szerkesztését nem, megtekintését engedélyezem. Tudomásul veszem, hogy a vízjel nélküli leadott dokumentum szerzői jogai sérülhetnek.

Budapest, 2022.11.08.



.....
szerző aláírása

Holló Bálint

Élesztőgomba izolátumok azonosítása

A szakdolgozatom célja a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoportjának törzsgyűjteményéből rendelkezésemre bocsájtott élesztőgomba izolátumok faj szintű azonosítása volt. A vizsgálatokat a kutatócsoport Budapest, II. kerületi laboratóriumában végeztem.

Az azonosításhoz klasszikus, és molekuláris mikrobiológiai módszerekkel végeztem kísérleteket. Feladataim során 30 mintával dolgoztam. Első lépésként Petri-csészén szélesztettem táplevesben szuszpendált mintákat, majd 3 napig inkubáltam szobahőmérsékleten. A telepek döntő többsége hasonló, fehér, sima, kör alakú volt, 3 darab minta pedig lazac-rózsaszín, krémes állagú telepet alkotott. Volt három minta, amely nem alkotott telepeket, így ezekkel nem dolgoztam tovább. Ezután Bürker-kamra segítségével kiszámítottam az élesztőgombák telep képző egységet milliliterenként (TKE/ml). A DNS izolálást két Kittel végeztem el, az egyik a Lucigen cég által forgalmazott MasterPure Yeast DNA Purification Kit, amit élesztő, és más gombákhoz ajánl a gyártó, a másik pedig a Qiagen cég DNeasy Ultraclean Microbial Kit-je, amit a gombák mellett baktériumokhoz és egyéb mikroorganizmusokhoz is lehet használni. A gyártói protokoll alapján elvégeztem a nukleinsav kivonást, sikerességüket pedig NanoDrop spektrofotométer segítségével vizsgáltam 230-280 nm hullámhossz tartományban. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy a MasterPure Yeast DNA Kit nagyobb hatékonysággal működik az élesztőgombáknál, mint a Qiagen terméke, mivel nagyobb DNS koncentrációt mértem.

Ezt követően rep-PCR és ITS-PCR következett, mely során a DNS-ben található természetesen ismétlődő szekvenciákat amplifikáltam, univerzális primereket (a rep-PCR esetében a (GTG)₅, az ITS-PCR esetében az (ITS1 és ITS4) A lánchosszabbítás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem A kapott mintázatokat UV fény alatt detektáltam, majd hasonlóság alapján csoportokba rendeztem. A két DNS kivonó kit rep-PCR mintázata az összes minta esetében azonos mintázatot adott. A költséghatékonyság végett csoportonként 1-1 mintát küldtem a Baseclear nevű cégnek, ahol elvégezték a DNS szekvenálást. Az így kapott szekvenciákat a MEGA11 nevű illesztőprogram segítségével elemeztem, majd a kapott

szekvenciákat az interneten keresztül ingyenesen elérhető YeastIP biológiai adatbankjában tárolt DNS szekvenciákkal összehasonlítottam. Minden minta esetében kielégítő eredményt kaptam, így egyértelműen be tudtam azonosítani a 27 darab élesztőgombát.

Összesen tizennégy élesztőfajt azonosítottam: *Botryozyma mucatilis*, *Candida oregonensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Diutina catenulata*, *Diutina pseudorugosa*, *Kazachstania bulderi*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kregervanrija fluxuum*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Torulaspóra delbrueckii*. Az azonosított élesztőgombák a későbbiekben felhasználhatók egyéb vizsgálatokra.

Holló Bálint Összefoglaló