

DIPLOMADOLGOZAT

Repka Péter György

2025

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Budai Campus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnöki
mesterképzési szak

A *Metschnikowia* nemzetségbe tartozó antagonista
élesztőtörzsek molekuláris jellemzése

Belső konzulens:	Dr. Pomázi Andrea Katalin Egyetemi docens
Belső konzulens tanszéke:	Élelmiszer-mikrobiológiai, - higiéniai és -biztonsági Tanszék
Készítette:	Repka Péter György

Budapest

2025

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzés	2
2.	Szakirodalmi áttekintés	3
2.1	Biológiai védekezés fogalma és az antagonista élesztők bemutatása	3
2.2	<i>Metschnikowia</i> nemzetség bemutatása	7
2.3	<i>Metschnikowia</i> fajok másodlagos anyagcsere termékei	9
2.4	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	12
2.5	<i>Metschnikowia</i> fajok az élelmiszeriparban	14
2.6	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> törzsek molekuláris jellemzése	17
3.	Anyag és módszer	20
3.1	DNS izolálás	20
3.2	RNáz-kezelés	21
3.3	Koncentráció és tisztaság vizsgálat	21
3.4	ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) analízis	21
3.5	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analízis	23
3.6	Agaróz gélelektroforézis	24
3.7	Mintázatok kiértékelése, dendrogram szerkesztés	25
4.	Eredmények és értékelésük	26
4.1	Koncentráció és tisztaságvizsgálat eredményei	26
4.2	Az ARDRA vizsgálatok eredményei	26
4.3	A RAPD vizsgálatok eredményei	35
5.	Következtetés és javaslatok	38
6.	Összefoglalás	40
7.	Irodalomjegyzék	41
8.	Nyilatkozatok	48

1. Bevezetés és célkitűzés

Az élesztőket széleskörűen alkalmazzák a biotechnológia területén, ennek ellenére az antagonistá élesztők biokontroll-ágensként való potenciális felhasználása még mindig alulértékelt. Néhány élesztőalapú növényvédelmi termék került eddig csak a piacra, és még az alapkutatásokban is elhanyagolták az antifungális élesztőket, ritkán vizsgálták őket a legkorszerűbb technológiákkal, illetve molekuláris szinten. Ennek ellenére ismert, hogy egyes élesztők erős gombaellenes aktivitást mutatnak, amit ötvöznek számos más előnyös tulajdonsággal, amelyek alkalmassá teszik őket gyakorlati alkalmazásra (pl. erős antagonistá hatás, könnyen tenyészthetők, jól formulálhatók, könnyen kijuttathatók, ellenállóak a stresszhatásokkal szemben), így ígéretes jelöltek biológiai növényvédő szerek fejlesztésére (Freimoser et al. 2019).

A *Metschnikowia* fajok széles körben tanulmányozott „nem-hagyományos” élesztőgombák. Az ezen nemzetségbe tartozó törzsek biztonságosak és nem patogének. Ezek az élesztők számos értékes metabolit, többek között szerves savak, aromaanyagok, olajok és pulcherrimin-sav előállítására képesek. A *Metschnikowia* fajok fent említett, egyedi tulajdonságai alapján e mikroorganizmusok ígéretes alanyai lehetnek az evolúciós genetikai, taxonómia és ökológia kutatásoknak, valamint potenciális alkalmazási lehetőséget kínálnak a biotechnológia területén, különösen a természetes biokontroll-ágensként történő alkalmazásban (Pawlikowska és Kregiel, 2017). A biokontroll-ágensek hatékony és környezetbarát alternatívát kínálnak a szintetikus peszticidekkel szemben a növényi kórokozók elleni védekezésben. Ennek ellenére a terület még nem tekinthető teljes mértékben feltárt és egységesen definiált kutatási irányvonalnak. Az egyik jelentős kutatási hiányosság, hogy számos jelenleg alkalmazott vizsgálati módszer esetében kevés ismételt kísérlet áll rendelkezésre, ami megnehezíti a biokontroll-ágensek kereskedelmi alkalmazhatóságának és hosszú távú hatékonyságának megbízható értékelését (Williams et al. 2025).

Dolgozatom célja, hogy a *Metschnikowia* fajokról átfogó áttekintést nyújtsak, különös tekintettel a *Metschnikowia pulcherrima* fajra, főként a mezőgazdasági és élelmiszeripari alkalmazásokra fókuszálva. Az áttekintésen túl az Élelmiszermikrobiológiai, -higiéniai és -biztonsági Tanszék által korábban *M. pulcherrima*-ként azonosított élesztőket szeretném vizsgálni molekuláris biológiai módszerekkel, és a vizsgálatok alapján jellemezni szeretném ezeket a törzseket. A vizsgálatok célja a törzsek közötti esetleges molekuláris szintű egyezések és különbségek feltárása.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 Biológiai védekezés fogalma és az antagonista élesztők bemutatása

Biológiai védekezés definíciója

Egyre nagyobb tudományos figyelem irányul a biológiai védekezés fontosságára, mint a mezőgazdasági növények, kórokozók és kártevők elleni védekezés fő eszközére. 2023-ban a biokontroll-ágensek piacának becsült értéke Európában 1,6 milliárd euró volt, 2016 óta a piac becsült értéke megduplázódott, annak ellenére is, hogy a 2019-2022-es időszakban a bővülés lelassult. A piaci növekedés az előrejelzések szerint évi 10% környékén lesz (IBMA, 2023).

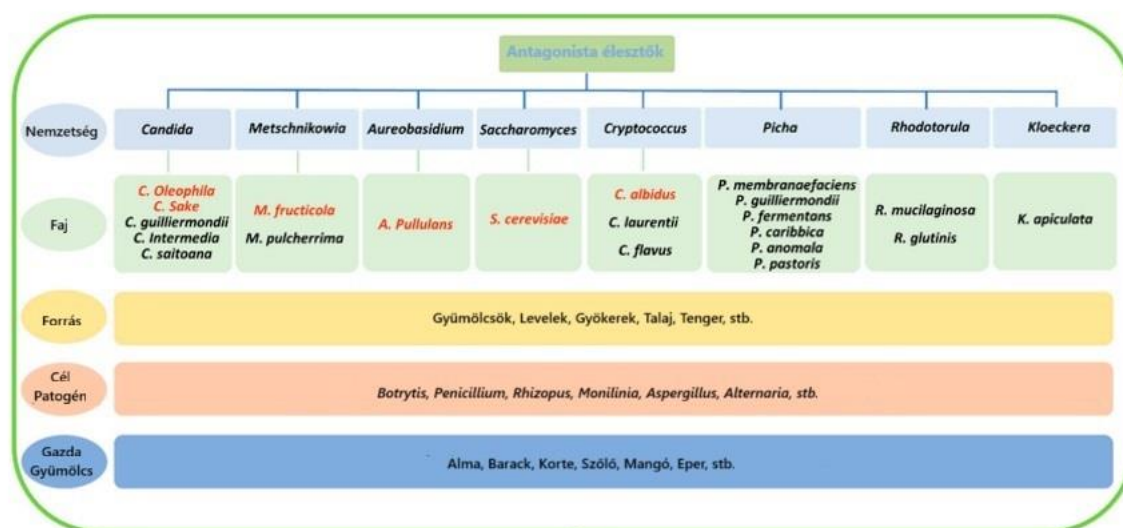
Az irodalomban nincs egyértelmű, univerzális és elfogadott definíció arra vonatkozóan, hogy mi definiálja a biológiai kontrollt, a biokontrollt és a biovédelmet (Collinge et al. 2022). A biológiai védekezés (biokontroll) egy környezetileg fenntartható megközelítés köré épül, amelynek célja a környezettel szinergikus és előnyös hatású működés. A „biokontroll” fogalma – amely magában foglalja a biopeszticidok alkalmazását is – az egyik elterjedt meghatározás szerint az élő szervezetek felhasználását jelenti egy adott kártevő populációsűrűségének vagy károsító hatásának visszaszorítására, ezáltal a populáció kevésbé bőséges vagy kevésbé káros formában való fenntartására, mint amilyen külső beavatkozás nélkül lenne (Eilenberg et al. 2001). A biológiai kontroll magában foglalja a kártevő populációk csökkentését a természetes ellenségeik (pl. paraziták, ragadozók, patogének, antagonisták vagy versenytársak) alkalmazásával (Internet 1). Egy másik definíció nem vázolja fel, hogy a biokontroll élő vagy élettelen szervezeteket foglal-e magában, egyszerűen azzal, hogy „a kártevőt vagy kórokozót elnyomó organizmust biológiai védekezőszernek nevezik” (Pal et al. 2006). A biológiai védekezés újabban csak élő organizmusokat foglal magában, míg a biológiai védelem (bioprotekció) mind az élő, mind az élettelen szervezeteket vagy anyagokat felöleli (Galli et al. 2024; Stenberg et al. 2021).

Antagonista élesztők

A különféle mikrobiális antagonisták között az élesztő és az élesztőszerű gombák fontos helyet foglalnak el, mivel környezetbarátok, jó biokontroll hatékonyságot mutatnak a kórokozókkal szemben, megfelelő stressztűréssel rendelkeznek és potenciálisan genetikailag javíthatók. Továbbá létezik egy jól fejlett rendszer az antagonista élesztők tenyésztésére, fermentálására, tárolására és kezelésére (Barret et al. 2000). Ezenkívül az élesztőket évezredek óta használják

az élelmiszer- és italgyártásban, és jelenleg is fontos szerepet játszanak az élelmiszeriparban, így az élesztők felhasználása általában biztonságosnak és a piac által könnyen elfogadhatónak tekinthető (Liu et al. 2013). Az antagonista élesztőgombák (biokontroll élesztőgombák) megnevezés olyan élesztőgombákra vagy élesztőszerű gombákra utal, amelyek gátolhatják vagy zavarhatják a fitopatogének növekedését, fejlődését, szaporodását vagy aktivitását (Wilson et al. 1989). Egy ideális antagonista élesztő genetikailag stabil, alacsony tápanyagigényű, továbbá hatékony, kedvezőtlen környezeti feltételek mellett alacsony koncentrációban is. Fontos szempont az is, hogy számos gombakórokozóval szemben aktív legyen, és különféle gyümölcsökön alkalmazni lehessen (Nunes, 2012). A legtöbb antagonista élesztőgombát közvetlenül a gyümölcsök felületéről izolálták (Liu et al. 2011). Néhányat közülük széles körben tanulmányoztak, mint például a *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Metschnikowia spp.*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.* fajokat és az élesztőszerű *Aureobasidium pullulans* gombát. Ezen nemzetségek közül számos fajt, mint például a *Candida oleophila*-t, *C. sake*-t, *M. fructicola*-t, *A. pullulans*-t, *Saccharomyces cerevisiae*-t és *Cryptococcus albidus*-t, kereskedelmi forgalomba hozható terméké fejlesztették (Zhang et al. 2020). A fenti törzseknél kimutatták, hogyan antagonizálják a gyakori postharvest kórokozókat, mint például a *Botrytis cinerea*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum spp.*, *Monilinia fructicola*, *Alternaria alternata* és *Aspergillus niger* fajokat. Az 1. ábrán láthatóak azok a reprezentatív antagonista élesztőgombák, amelyeket különböző forrásokból izoláltak, és amelyeket a betakarítás utáni betegségek kezelésére használnak (Zhang et al. 2020).

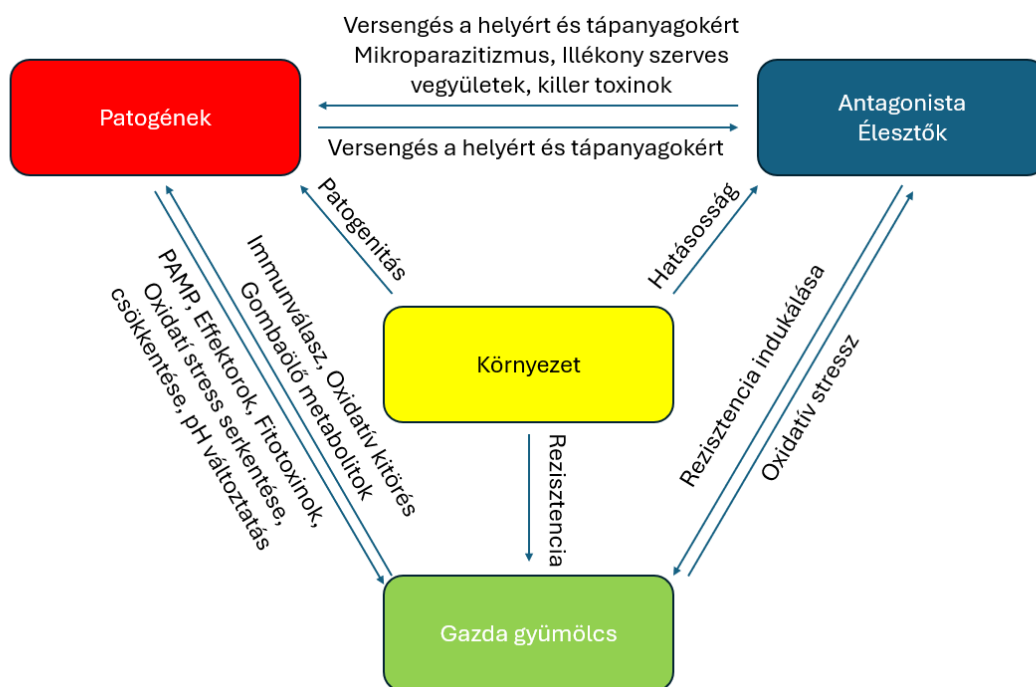
1. ábra: Különböző forrásokból izolált antagonista élesztőgombák és felhasználásuk (Forrás: Zhang et al. 2020 nyomán).



Biológiai védekezés elve

Úgy vélik, hogy a biológiai védekezés folyamatai során többféle hatásmechanizmus is szerepet játszik, bár ezek többségének pontos funkcionális szerepe még nem teljesen feltárt (Sharma et al. 2009). A 2. ábrán a biokontroll rendszer és a komponensei közötti lehetséges kölcsönhatások láthatóak, beleértve a kórokozókat, az antagonista élesztőgombákat, a gazdaszervezeteket, az epifita mikrobiomot és a környezetet (Zhang et al. 2020).

2.ábra: A biokontroll rendszer és komponensei közötti lehetséges kölcsönhatások (Forrás: Zhang et al. 2020 nyomán).



Az ábrán látható, hogy milyen összetett kölcsönhatásrendszer épül fel a patogén, a gazdanövény és a biokontroll szervezet között. Az antagonista élesztőgombák a tápanyagokért és a térért folytatott versengéssel, a mikoparazitizmussal, illékony szerves vegyületekkel és a killer toxinok termelése révén gátolhatják a kórokozókat. A biokontroll-ágensek további képessége, hogy képesek hozzátapadni bizonyos felületekhez – ideértve mind a gazdaszervezet, mind pedig a kórokozó sejtjeit (Wisniewski et al. 2007). A kórokozók szintén versengenek az antagonista élesztőgombákkal a tápanyagokért és a térért, hogy befolyásolják azok kolonizációját és növekedését (Zhang et al. 2020). Ezenkívül az antagonista élesztőgombák indukálhatják a gazdaszervezetek rezisztenciáját a fertőzés gátlása érdekében. A folyamat során a gazdaszervezetek által termelt reaktív oxigénfajták (ROS) azonban oxidatív stresszt

jelenthetnek az élesztőgombák számára. A gazdaszervezet és a kórokozók közötti kölcsönhatás során a gazdaszervezetek védekezési mechanizmusaik és gombaellenes metabolitok termelése révén ellenállhatnak a kórokozók támadásának, míg a kórokozók elnyomhatják a gazdaszervezet rezisztenciáját a patogénhez kapcsolódó molekuláris mintázatok (PAMP) megváltoztatása, effektorok és fitotoxinok termelése, valamint pH-módosítás által. A gazdaszervezet epifita mikrobiomja szintén hatással van a gazdaszervezet rezisztenciájára. Ezenkívül a környezeti feltételek jelentősen befolyásolják a kórokozók patogenitását, az antagonista élesztőgombák hatékonyságát és a gazdaszervezetek rezisztenciáját (Zhang et al. 2020). Az élesztőtörzsek tehát különféle mechanizmusokat mutathatnak, többek között: spóracsírázás gátlása, biofilm-képzés, killer toxinok kiválasztása, tápanyagért való versengés, valamint hidrolitikus enzimek (proteáz, chitináz és glükánáz) termelése (Lutz et al. 2013). A többféle hatásmechanizmuson alapuló biológiai védekezés elérhető egyetlen olyan biokontroll-agens alkalmazásával, amely több mechanizmussal is rendelkezik vagy több különböző ágens kombinált használatával, feltéve, hogy ezek eltérő működési mechanizmusokat képviselnek (Sharma et al. 2009).

Gyakorlati felhasználás

Az antagonista élesztők kereskedelmi forgalomba hozatala hosszú és költséges folyamat, amely kiterjedt toxikológiai és biokontroll-hatékonysági vizsgálatokat igényel hatósági felügyelet mellett. Az elmúlt évtizedekben számos antagonista élesztőből biokontroll-agenst fejlesztettek ki és hoztak forgalomba (1. táblázat) (Janisiewicz és Korsten, 2002; Zhang et al, 2020).

1.táblázat: Kereskedelmi forgalomba kapható biokontroll törzsek (Forrás: Zhang et al. 2020 nyomán).

Termék	Élesztő	Gyümölcs	Célzott kórokozók	Gyártó	Használatban
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	Alma, csonthéjasok, citrusfélék, eper	<i>Botrytis, Penicillium, Monilinia</i>	Ecogen, USA	Nem
Blossom Protect	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Alma	<i>Botrytis, Penicillium, Monilinia</i>	Bio-ferm, Ausztria	Igen
Botector	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Szőlő, eper, paradicsom	<i>Botrytis cinerae</i>	Bio-ferm, Ausztria	Igen
Candifruit	<i>Candida sake</i>	Alma	<i>Botrytis, Penicillium, Rhizopus</i>	IRTA/Sipcam-Inagara, Spanyolo.	Nem
Nexy	<i>Candida oleophila</i>	Alma, banán, citrusfélék	<i>Botrytis, Penicillium</i>	Lesaffre, Belgium	Igen
Noli	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Eper, áfonya, szőlő, csonthéjasok	<i>Botrytis, Monilinia</i>	Koppert, Hollandia	Igen
Remeo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Szőlő	<i>Botrytis, Erysiphe, Plasmopara</i>	BASF/Agrauxine, Franciaó.	Igen
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Alma, eper, szőlő, csonthéjasok	<i>Botrytis, Penicillium, Rhizopus, Aspergillus</i>	Bayer/Koppert, Hollandia	Igen
YieldPlus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Alma, citrusfélék	<i>Botrytis, Penicillium, Mucor</i>	Lallem, Dél-Afrika	Nem

A kémiai gombaölő szerek okozta környezetszennyezés és az egészségügyi kockázatok egyre nagyobb figyelmet kapnak a szabályozó hatóságok és a fogyasztók részéről, és világszerte érdeklődés, igény mutatkozik a kémiai gombaölő szerek használatának csökkentése vagy megszüntetése iránt (Zhang et al. 2020). Ugyanakkor a szintetikus gombaölő anyagok régóta

használt szerek, amelyek általában könnyen alkalmazhatóak és nagy hatékonyságúak (Wisniewski et al. 2007). A kémiai gombaölő szerek potenciális helyettesítőjeként az antagonista élesztőgombákat az elmúlt évtizedekben széles körben tanulmányozták, és jelentős előrelépés történt az antagonista élesztőgombák azonosítása és fejlesztése terén. Az antagonista élesztőgombák önmagukban történő használata azonban még mindig nem elegendő a kémiai gombaölő szerek teljes helyettesítéséhez (Zhang et al. 2020). Az ökológiai gyümölcsstermesztés során a szintetikus gombaölő szerek használata szigorúan tilos, így ez egy jelentős piaci lehetőséget képvisel a biológiai szerek számára. Ezen termékek iránti kereslet az elmúlt évtizedben robbanásszerűen megnőtt, és ez a trend nem mutat lassulást. Fontos ugyanakkor, hogy az új post-harvest biokontroll termékeknek könnyen alkalmazhatónak és hatékonyak kell lenniük önálló termékként is, kiegészítő kezelések nélkül, ha versenyre akarnak kelni a szintetikus szerekkel (Wisniewski et al. 2007). Az ismert antagonista élesztőgombáknak így még számos olyan tulajdonsága van, amelyen lehetne javítani, még a kereskedelmi forgalomban kapható kevés antagonista élesztőgomba esetében is (Zhang et al. 2020).

2.2 *Metschnikowia* nemzetség bemutatása

A *Metschnikowia* nemzetségbe tartozó gombák egysejtű élesztők. A *Saccharomycetales* rendbe tartozó nemzetség jelenleg 103 fajból áll (Mycobank adatbázis, 2025-ös adat). 1899-ben fedezték fel, az ide tartozó fajok mind vízi, mind szárazföldi ökoszisztémákban megtalálhatóak (Haniffadli et al. 2024). Az új *Metschnikowia* törzsek felfedezése az elmúlt évszázadban megugrott. Kurtzman és társai (2018) tanulmányukban azt írják, hogy az akkoriban ismert 85 faj közül 23-at rovarokról (27,7%), 15-öt növényi virágokról (18,1%) és 21-et rovar-virág ökoszisztémákból izoláltak, míg másokat modern technológiai megközelítéseknek köszönhetően különböző növényi részekben, például gyümölcsökben, kéregben, levelekben és vízi környezetben fedeztek fel.

Ivartalan szaporodásuk multipoláris sarjadzással történik. A sejtek gömb vagy ellipszoid alakúak, de lehetnek körte, hengeres vagy hold alakúak is. A pszeudohifák gyengén fejlettek, de ritkán hiányoznak. Egyes fajok hosszú, szeptum nélküli csíratömlőket képeznek, amelyek a valódi hifákra emlékeztetnek (Kurtzman et al. 2011).

Az ivaros szaporodás során létrejött aszkuszok alakja lehet megnyúlt, bunkószerű, gömbös nyeles vagy ellipszoid nyeles. Az aszkospórák tű alakúak, egyik vagy mindkét végükön elkeskenyednek, néha az egyik oldalukon megduzzadnak. Az aszkuszban fajonként egy vagy két spóra képződik (Kurtzman et al. 2011).

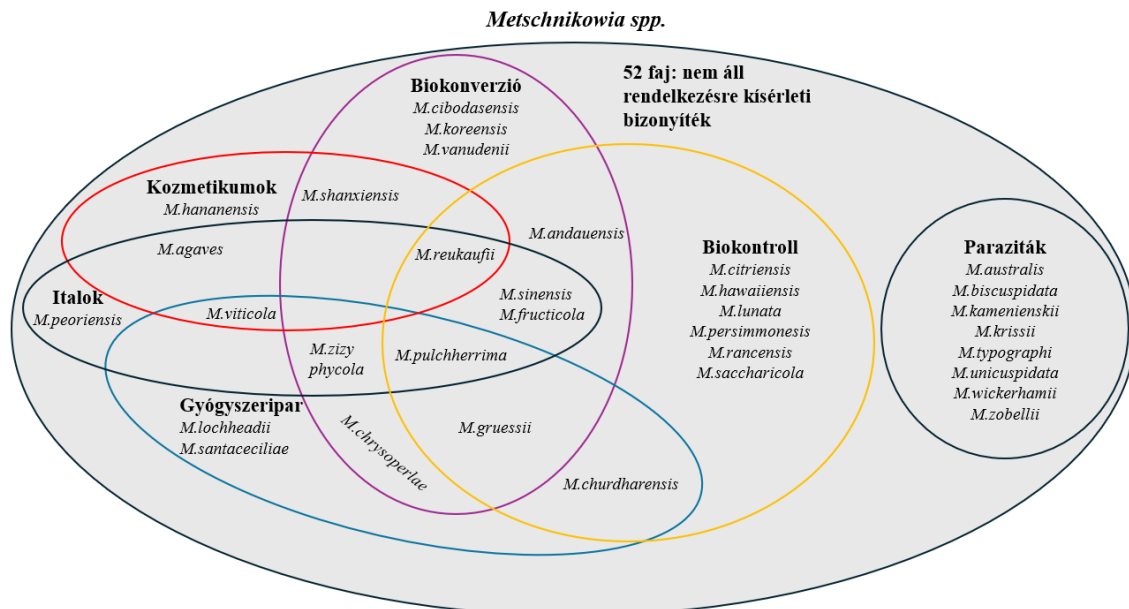
A nemzetségbe tartozó legtöbb faj a glükózt fermentálja. A nitrátot nem képesek asszimilálni. Koenzim Q-9 jellemző rájuk (Kurtzman et al. 2011).

A *Metschnikowia* fajok nem tartoznak a konvencionális élesztők közé, mely oka lehet annak, hogy értékük annak ellenére alá becsült, hogy hatékonyan használják őket a kozmetikai iparban, a borászatban és a növények biológiai védelmében (Vincente et al. 2020).

A *Metschnikowia* fajok funkcionális osztályozása

A *Metschnikowia* fajok felfedezése óta számos faj funkcionális tulajdonságait vizsgálták. Ezek a funkcionális jellemzők kiegészítő ismertetőjegyként szolgálhatnak az egyes fajok megkülönböztetéséhez. A *Metschnikowia* fajok funkcionális tulajdonságok szerinti osztályozása hasznos lehet annak meghatározásában, hogy hogyan alkalmazhatóak a nemzetség fajai a különböző kutatási területeken, és használhatóak az emberi élet különböző területein a jövőben. Emellett ez a csoportosítás hozzájárulhat annak a jobb megértéséhez is, hogy bizonyos alkalmazott kutatási irányok miért haladnak lassabban (Haniffadli et al. 2024).

3.ábra: A *Metschnikowia* fajok osztályozása az emberi felhasználásuk alapján (Forrás: Haniffadli és társai, 2024 nyomán).



A *Metschnikowia* fajok mikrobiális biológiai védekező hatását vizsgálták a legátfogóbban, és ez képezi az alapját a különböző területeken folytatott további kutatásoknak (Rahmat et al. 2024). A kísérletek igazolták, hogy bizonyos *Metschnikowia* fajok képesek gátolni a kedvezőtlen mikroorganizmusok növekedését a kertészeti növények post-harvest feldolgozása

során (3. ábra) (Zhang et al. 2023). A *Metschnikowia* fajok különféle mechanizmusokat alkalmaznak a növényi kórokozók elleni védekezésben, ilyenek például a rezisztencia indukciója, a tápanyag- és növekedési feltételek módosítása, a közvetlen antagonista hatás, valamint a bioaktív vegyületek termelését szabályozó anyagcsere-folyamatok irányítása. Ezeket a mechanizmusokat *Metschnikowia pulcherrima* esetében in vitro vizsgálatok során is kimutatták alma-, szőlő-, őszibarack- és burgonyakórokozók ellen (Bühlmann et al. 2022).

2.3 *Metschnikowia* fajok másodlagos anyagcsere termékei

Az élesztők számos másodlagos anyagcsere-terméket termelnek, amelyek nélkülözhetők a növekedéshez, de fontos szerepet játszanak a védekezésben, a versenyképességben, a kommunikációban, valamint a patogénitásban (Rahmat és Kang, 2020). A termelt másodlagos metabolitok előnyt biztosítanak számukra a helyért és tápanyagért folytatott versenyben, illetve segítenek alkalmazkodni a kedvezőtlen környezeti feltételekhez, például magas vagy alacsony hőmérséklethez, magas sókoncentrációhoz, illetve a cukorszint ingadozásához. Bizonyított, hogy a *Metschnikowia* törzsek növénypatogén mikroorganizmusokkal való érintkeztetése aktiválhatja a védelmi metabolitok termelését (Haniffadli et al. 2024).

Alkaloidok

Folyékony tápközegben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a *Metschnikowia* fajok képesek alkaloidok termelésére. UPLC-MS (ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tömegspektrometria) módszerrel azonosítva a deacetilizált izo-ipecosid, piperidinen, protoemetin és 16-hidroxi-tabersonin jelenlétét igazolták. Az előzőleg említett négyféle alkaloid vegyületet a *M. pulcherrima* két törzse (Mp-22 és Mp-30) termelte. Az eredmény egy lehetséges magyarázata, hogy a *M. pulcherrima* rendelkezik egy alkaloid bioszintézissel kapcsolatos génklaszterrel, amely túlélési mechanizmusként működhet kórokozók ellen (Millan et al. 2022).

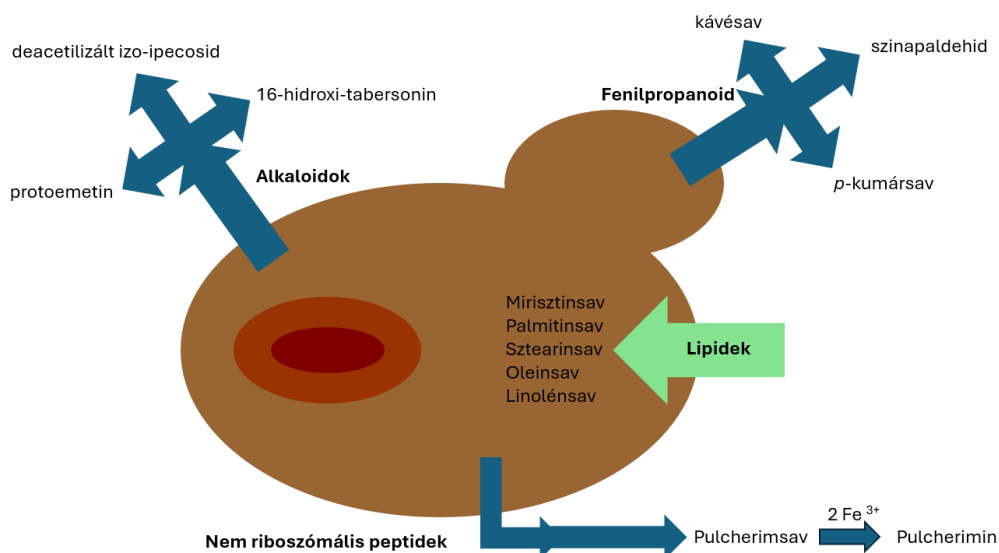
Az alkaloidtűrés és az alkaloidtermelés is értékes kiindulópont lehet a *Metschnikowia* nemzetségben rejlő bioaktív alkaloid vegyületek feltárásához. A *Metschnikowia* fajok viselkedésének, élettani folyamatainak megértése új lehetőséget teremthet a nemzetség felhasználására farmakológiailag aktív alkaloidvegyületek előállítására. Ugyanakkor a jelenlegi kutatások korlátozott információval szolgálnak arról, hogy a *Metschnikowia* fajok milyen alkaloidokat termelnek a természetes környezetükben (Haniffadli et al. 2024).

Lipidek

A *Metschnikowia* fajok képesek lipidek felhalmozására bizonyos környezeti feltételek mellett, például alacsonyabb hőmérsékleten és pH-n, illetve nitrogén szegény környezetben (Abeln és Chuck, 2020). A *Metschnikowia* nemzetség fajai – különösen a *M. pulcherrima* – képes a száraz tömegének 30–40% (w/w) -át lipidekké alakítani, ami ugyan elmarad a tipikus olajtermelő élesztőktől, viszont képes elviselni a magas cukorkoncentrációt, ami előnyös tulajdonság, és nem steril környezetben is fokozott lipidtermelésre képes (Abeln et al. 2020). Ez a két előny alkalmassá teszi a *Metschnikowia* fajokat biodízel gyártására, amely a hagyományos üzemanyagok környezetbarát és fenntartható alternatíváját jelentheti a jövőben (Leiva-Candia et al. 2014). A *Metschnikowia* fajok számos szénforrást képesek hasznosítani, beleértve a különböző melléktermékeket és hulladékokat, mint például a lepárlási szennyvizet, élelmiszer-hulladékot, állati zsírt és illékony zsírsavakat (VFA). Ezekből zsírsav-metil- vagy etil-észtert állít elő, amelyek a biodízel fő alkotóelemei (Abomohra et al. 2021).

Emellett a *Metschnikowia* képes élelmiszeripari minőségű olajok és lipidek előállítására is, ami kulcsfontosságú lehet az élelmiszergyártásban. Az eddig elért eredmények rámutatnak azonban arra is, hogy a szabályozott tenyésztési feltételek előnnyel járnak, mivel a növekedés és a lipidtermelési képesség erősen törzsfüggő (Abeln et al. 2019).

4.ábra: A *Metschnikowia* fajok ígéretes másodlagos anyagcsere termékei (Forrás: Hannifadli és társai, 2024 nyomán).



Fenilpropanoid-származékok

Jelenleg nem állnak rendelkezésre beszámolók természetes flavonoidok vagy más fenilpropanoid származékok *Metschnikowia* fajok általi termeléséről. Az elmúlt években a leginkább vizsgált fenilpropanoid vegyületek elsősorban a borászatban és biológiai védekezési hatásvizsgálatokban kerültek előtérbe. A borkészítés során több élesztőt is együtt tenyésztettek *Metschnikowia* fajokkal ugyanabban a szubsztrátumban annak érdekében, hogy tanulmányozzák hatásukat a bor ízére és illatára. Az érzékszervi vizsgálatok során a *M. pulcherrima* által fermentált italokban gazdagabb gyümölcsös és virágos aromák voltak jelen (Kelanne et al. 2020).

A borkészítéshez használt szőlő és a bogyós gyümölcsök antociánokat, flavonoidokat és más fenolos vegyületeket tartalmaznak, amelyeket a *Metschnikowia* fajok hasznosítanak, ezáltal gazdagítva a borok fenolos vegyületeit. Ezen eredmények alátámasztják azt a hipotézist, hogy a *Metschnikowia* fajok rendelkeznek a fenilpropanoid-bioszintézis útvonalához kapcsolódó génekkel. Annak ellenére, hogy a fenolos vegyületek természetes módon jelen vannak a szubsztrátumban, a *Metschnikowia* fajok sikeresen növelték ezek koncentrációját az erjedés során. A *M. pulcherrima* 70321 törzs például növelte a fenolos savak és flavonoidok szintjét áfonyaléből készült gyümölcsle fermentációjakor (Puyo et al. 2023).

Ezen túlmenően ezek az élesztőfajok jelentős mértékben növelték a kávésav (kb. 25-szörös) és a p-kumársav (kétszeres) mennyiségét. Ugyanakkor a fenilpropanoid-bioszintézis útvonalához kapcsolódó géneket ezidáig még nem azonosították *Metschnikowia* fajokban (Haniffadli et al. 2024).

Pulcherriminsav

A *Metschnikowia* nemzetség pulcherriminsavat termel, amely egy két leucinből felépülő ciklikus dipeptid, és erős affinitást mutat a háromértékű vasionok (Fe^{3+}) iránt, vörösesbarna pulcherrimint képezve (Yuan et al. 2020). A pulcherriminsav nem kizárólag a *Metschnikowia* nemzetségre jellemző, baktériumok (pl. *Bacillus subtilis* és *B. licheniformis*) és más élesztők is képesek előállítani, azonban a pulcherrimin bioszintéziséért felelős enzimek eltérnek a baktériumok és az élesztők között (Sipiczki, 2020).

A pulcherriminsav nemcsak a biológiai növényvédelem, hanem a humán és állati kórokozók elleni antimikrobiális alkalmazás szempontjából is értékes lehet. Jelenleg azonban nem áll

rendelkezésre tudományos beszámoló, amely a pulcherriminsavat közvetlenül emberi vagy növényi kórokozók ellen alkalmazta volna. Ugyanakkor Kregiel és társai (2023) kimutatták, hogy a tiszta pulcherrimin vegyület képes volt gátolni a *Candida* és nem-*Candida* (pl. *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*, szinonim: *Cryptococcus neoformans*) fajok növekedését agarlemezes vizsgálat során. Emellett a pulcherrimin citotoxikus és antiproliferatív aktivitást is mutatott. A pulcherrimin gombaellenes hatását a biológiai mátrix befolyásolhatja, ezért további kutatásokra van szükség a pulcherrimin szomatikus sejtekben kifejtett hatásmechanizmusának tisztázására, különösen a biztonságossági szempontok jobb megértése érdekében (Haniffadli et al. 2024).

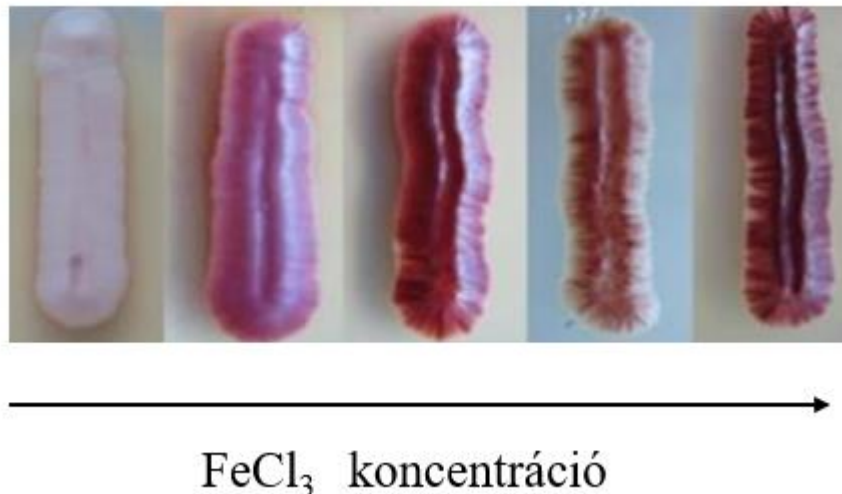
2.4 *Metschnikowia pulcherrima*

A *M. pulcherrima* ovális alakú élesztőgomba, ami rendszerint sarjadzással szaporodik, bár anaerob körülmények között álhifás növekedése is megfigyelhető (Kurtzman et al. 2011). A *M. pulcherrima* egy sokoldalú, nem konvencionális élesztőfaj, amelyet különféle forrásokból izoláltak, például növény–rovar interakciós felületekről, gyümölcsökről (pl. szőlőről) és gyümölcsösökből (Lachance, 2016). A *M. pulcherrima* gyakori élesztő a szőlőfürtökön (Kántor et al. 2015). Az évek során a *M. pulcherrima* számos különböző néven vált ismerté, mivel a klasszikus élesztőtaxonómiai módszereken alapuló besorolása többször is változott (*Asporomyces uvae*, *Candida pulcherrima*, *Castellania castellanii*, *Cryptococcus castellanii*, *Eutorula pulcherrima*, *Monilia castellanii*, *Rhodotorula pulcherrima*, *Saccharomyces pulcherrimus*, *Torula pulcherrima*, *Torulopsis pulcherrima*, *Torulopsis burgeffiana*, *Torulopsis dattila* stb.) (Kurtzman et al. 2011). A *M. pulcherrima* alacsony vagy közepes erjesztőképességgel rendelkezik, ami jellemző a legtöbb, szőlőn jelenlévő nem-*Saccharomyces* fajra (Lachance, 2016).

A *M. pulcherrima* speciális, vasat tartalmazó táptalajokon (például $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, legfeljebb 0,02 g/l) képes növekedni, miközben vöröses (bordó) pulcherrimin pigmentet termel, amely a pulcherriminsav és háromértékű vasionok kelátkomplexe (Kántor et al. 2015). Ez a komplex a telepeket halvány ibolyás vagy bordóvörös színűvé változtatja, a táptalajban lévő vasionok koncentrációjától függően. Mivel a pulcherriminsav képes kiválasztódni a környezetbe, gyakran megfigyelhetők pigmentált udvarok a színes telepek körül (Sipiczki, 2006). Számos tanulmány megerősíti, hogy a pulcherrimin antimikrobiális aktivitással rendelkezik a post-harvest kórokozók, mikroszkopikus gombák és más élesztőfajok ellen (Kántor et al. 2015). A fajról kimutatták, hogy antagonista hatást fejt ki baktériumokkal és gombákkal szemben,

amelynek erőssége összefüggést mutat a pulcherrimin extracelluláris termelésének intenzitásával, és a táptalaj háromértékű vassókkal való kiegészítése csökkenti mind a pigmentált udvar, mind a *Metschnikowia* telep körüli gátlási zóna méretét. Ezen eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a pulcherrimint termelő törzsek a vas megvonása révén gátolják a gombák és baktériumok növekedését. A pulcherrimint termelő telepek a YEA táptalajon vörös színűvé válnak. Minél magasabb az FeCl_3 koncentrációja, annál intenzívebb a pigmentáció. Ha a pulcherrimin extracellulárisan is termelődik, a pigmentált telep körül színes udvar figyelhető meg (Sipiczki, 2006).

5.ábra: *M. pulcherrima* telepek különböző FeCl_3 koncentrációjú YEA táptalajon (Forrás: Sipiczki, 2006 nyomán).



Kántor és munkatársai (2015) vizsgálata alapján az *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Wickerhamomyces anomalus* rezisztens volt a pulcherrimin pigmenttel szemben, viszont a *Candida* fajok nagy érzékenységet mutattak. Bár úgy tűnik, hogy a vasmegkötés az antimikrobiális antagonizmus fő tényezője, más faktorok – például sejtfalat bontó enzimek kiválasztása és illékony vegyületek kibocsátása (Kántor et al., 2015) – szintén hozzájárulhatnak az antagonisztikus hatáshoz. Antimikrobiális aktivitásuk miatt ezek a törzsek biológiai ágensekként alkalmazhatóak a mezőgazdasági termények és élelmiszertermékek kórokozó és káros mikroorganizmusok elleni védelmére (Kurtzmann et al. 2018).

2.5 *Metschnikowia* fajok az élelmiszeriparban

A *Metschnikowia* nemzetség tagjait számos iparág használja: a mezőgazdaság, gyógyszeripar, kozmetikai ipar, és az élelmiszeripar (Haniffadli et al. 2024). A fejezetben az élelmiszeripari alkalmazásokat tekintem át.

Borászati alkalmazások

A *Metschnikowia* – a nem-*Saccharomyces* borélesztő-nemzetségek egyike – jelentős szerepet játszik a borkészítésben, amit széles körben tanulmányoztak. Alkalmazása túlmutat az alkoholképzésen: hozzájárul az íz- és aromaanyagok fokozásához, amelyek kulcsfontosságú tényezők a borkészítés során, valamint segítenek megelőzni a nemkívánatos mikrobiális növekedést az erjedés folyamán (Bosciano et al. 2019). A *M. pulcherrima* kereskedelmi forgalomba került, mint starterkultúra (2. táblázat), mivel az erjedési folyamatban a fenti mindkét tulajdonsága érvényesül, azaz képes korlátozni a mikrobiális romlást, miközben javítja a bor illatát (Canónico et al. 2023). Közismert, hogy a nem-*Saccharomyces* élesztők számos enzim termeléséért felelősek, amelyek hozzájárulnak a borok érzékszervi tulajdonságaihoz. Közülük a *Metschnikowia* nemzetség kiemelkedik a hidrolitikus enzimtermelő – például glükózidáz, proteáz és pektináz termelő – képessége miatt. Ezek az enzimek közvetlen hatást gyakorolhatnak a bor érzékszervi és technológiai jellemzőire (Jolly et al. 2014).

2.táblázat: Kereskedelmi forgalomba kapható különböző *Metschnikowia* fajok (Forrás: Vincente és társai, 2020 nyomán).

Faj	Termék	Gyártócég	Felhasználás
<i>M.pulcherrima</i>	Flavia™ MP346	Lallemand	Fehérborokban növeli a fajtajellegű tiolok mennyiségét és javítja a savasságot.
	Excellence™	Bio-Nature	Segít szabályozni a szőlőben és a mustban jelen lévő őshonos mikroflórát, ezáltal lehetővé teszi az irányított erjedést.
<i>M.fructicola</i>	Gaia™	Lallemand	Csökkenti az előerjedés előtti kénezés szükségességét. Elősegíti a kiválasztott <i>Saccharomyces cerevisiae</i> törzs beépülését (megeredését).
	Noli™	Koppert	Eszközként szolgál a gyümölcsrothadás megelőzésére, amelyet a <i>Botrytis</i> spp. és a <i>Monilinia</i> spp. okoznak, melyek befolyásolják a szüretelt szőlő minőségét.

A *M. pulcherrima* alacsony vagy mérsékelt fermentációs képességet mutat, hasonlóan a legtöbb szőlőn előforduló nem-*Saccharomyces* fajhoz képest. Ez a faj nem képes elviselni a 4–5% (v/v) feletti etanolkoncentrációt, így az alkoholos erjedés során természetes módon kiszelektálódik, amint az etanolszint ezt az értéket meghaladja. Emellett, bár a *M. pulcherrima* mérsékelt kén-dioxid (SO₂) toleranciával rendelkezik, ez az ellenállóképesség elmarad a *Saccharomyces* törzsekre jellemző értékektől (Morata et al. 2019). Ezen okok miatt a *M. pulcherrima*-t kevert erjesztésekben célszerű alkalmazni olyan élesztőtörzsekkel együtt, amelyek nagyobb fermentációs kapacitással rendelkeznek – például *Saccharomyces cerevisiae*-vel –, amely az alkoholos erjedés folyamán dominánssá válik, és végigviszi az erjedést (Zhang et al. 2018).

Továbbá Oro és munkatársai (2014) tanulmánya alapján a *M. pulcherrima* erőteljes biológiai kontroll tevékenységet mutat több olyan élesztőnemzetséggel szemben, amelyeket a borászatban károsnak tartanak (*Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* és *Pichia*), valamint számos szőlőromlást okozó fonalas gombával szemben (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., stb.). Ugyanakkor csak csekély vagy semmilyen negatív hatással nincs a *Saccharomyces cerevisiae* teljesítményére. Az észlelt gátló hatásért a pulcherrimin a felelős, amelyet a *M. pulcherrima* termel.

Ugyanezen nemzetség más fajai, mint például a *M. viticola* (Liu et al. 2017) és a *M. fructicola* (Bosciano et al. 2019) szintén egyre nagyobb figyelmet kap a borászati alkalmazás területén. A *M. fructicola* kedvező tulajdonságú törzsei starterkulturaként már elérhetőek (2. táblázat).

A tudományos cikkek és a szakirodalmi források az élelmiszeripari felhasználások közül legfőképpen a borászat területére koncentrálnak, azonban több publikáció is született, amelyek a *Metschnikowia* nemzetség más élelmiszeripari területen történő hasznosítását kutatták.

Sütőipari kutatások

A *Saccharomyces cerevisiae* a tésztatermékek erjesztésére leggyakrabban használt élesztőtörzs, alkalmazásával a tészta gyorsan megkel, azonban az ízprofilja viszonylag homogén lesz (Bellido et al. 2009). Több törzs együttes alkalmazása gazdagíthatja a tésztatermékek ízét és tápanyagtartalmát, valamint módosíthatja a kelési időt is (Hu et al. 2022). Liu és társai (2025) tanulmányának eredményei azt mutatják, hogy a kevert élesztőtörzsek alkalmazása (*Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomalus* =

0,46:0,27:0,27), valamint α -amiláz, diacetil-borkősav-mono(di)glicerid-észter és polidextróz hozzáadása képes megelőzni a hűtött tészták túlzott erjedését. Emellett a kevert élesztőtörzsek és adalékanyagok hozzájárulnak a gluténfehérjék rendezett másodlagos szerkezetének megőrzéséhez, a keményítő és gluténfehérjék mikroszerkezetének stabilizálásához, valamint csökkentik a víz migrációját és veszteségét a tésztában. A vizsgálat rámutatott, hogy a kevert élesztőtörzsek és az adalékanyagok elősegítik a tészta hosszú távú hűtve tárolhatóságát, és hatékonyabban megőrzik annak minőségét a tárolás során.

Söripari kutatások

A kézműves sörök népszerűsége egyre nagyobb figyelmet kap több országban, és alternatívát kínál a hagyományos, tömegtermelésű sörökkel szemben (Aquilani et al. 2015). A kézműves sörfogyasztók különösen érdeklődnek az új, eltérő ízvilágú sörök kipróbálása iránt a megszokott, jól ismert kereskedelmi márkákkal szemben (Ascher, 2012). Egyes, nem tipikus ízek a kézműves sörökben akár magasabb minőségként is értékelhetők a fogyasztók részéről a kereskedelmi sörökhöz képest (Gómez-Corona et al. 2016). A sörerjesztés során számos lehetőség áll rendelkezésre különböző érzékszervi profilok kialakítására, mint például az erjesztő élesztőtörzsek kiválasztása (Budroni et al. 2017). Einfalt (2021) tanulmányában három, különböző nemzetségbe tartozó élesztőfajt választott ki az erjesztési teljesítményük és érzékszervi profiljuk értékelésére árpa-cirok sör előállítására céljából. Az árpa-cirok sörlé 12,5°P-os koncentrációval készült, és *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* valamint *Metschnikowia pulcherrima* élesztőtörzsekkel erjesztették. Az eredményeik alapján a két *nem-Saccharomyces* élesztőtörzs 11%-kal (*T. delbrueckii*), illetve 23%-kal (*M. pulcherrima*) alacsonyabb etanolkoncentrációt eredményezett a *S. cerevisiae* 37,9 g/L értékéhez képest. Az érzékszervi vizsgálatok során háromszögpróbát alkalmaztak a háromféle élesztővel erjesztett sör összehasonlítására. A vizsgálat során mindhárom terméket egymástól szignifikánsan eltérőnek ítélték meg. Ez is arra utal, hogy a különböző élesztőtörzsek befolyásolták a sörök érzékszervi tulajdonságait. A bírálók azt is megjelölték, melyik sört részesítik előnyben. A *T. delbrueckii*-vel készült sört szignifikánsan előnyben részesítették a *M. pulcherrima*-val készült sörhöz képest. Ugyanakkor az eredmények azt mutatták, hogy valamennyi élesztőtörzs képes volt kellemes és aromás érzékszervi profilt kialakítani, egyedi illatjegyekkel (Einfalt, 2021).

Egy másik megközelítésből is jelentős lehet a *M. pulcherrima* törzsek söripari felhasználása. Az elmúlt években megnövekedett a kereslet az alacsony alkoholtartalmú és alkoholmentes sörök iránt. Ezen sörök előállítására számos módszer létezik, azonban ezek közül sok

megvalósítása költséges, vagy a sör minősége szempontjából hátrányokkal jár. A nem-*Saccharomyces* élesztőfajok vizsgálata ígéretes lehetőséget kínál e kihívások leküzdésére (Klimczak et al 2024). Ezen élesztők sokféle anyagcsere-képességüknek és egyedi ízprofiljuknak köszönhetően alkalmasak lehetnek innovatív és ízletes, alacsony alkoholtartalmú sörök előállítására. Egy tanulmányban vizsgált élesztőfajok a következők voltak: *Kluyveromyces lactis*, *Metschnikowia pulcherrima* és *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, valamint *W. onychis*. Kontrollként két *Saccharomyces cerevisiae* törzset alkalmaztak. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a kiválasztott nem-*Saccharomyces* élesztőfajok alkalmasak lehetnek alacsony alkoholtartalmú sörök előállítására. A nem-*Saccharomyces* élesztők alkalmazásával a kutatók 0,5–1,05% alkoholtartalmú söröket tudtak előállítani, míg a kontrollként használt, *S. cerevisiae* törzsszel főzött sör alkoholtartalma 3,77% volt. Az értékelt törzsek közül a *M. pulcherrima* és a *T. delbrueckii* érzékszervi bírálat alapján kedvezőbb értékelést kaptak, mint a kontroll és a vizsgálatban szereplő más fajba tartozó élesztőkkel készült alacsony alkoholtartalmú sörök (Klimczak et al. 2024).

A fentebb összefoglalt irodalmi összesítés alapján jól látszik, hogy vannak olyan élelmiszeripari területek, ahol a *Metschnikowia* fajokat már a gyakorlatban is használják, ilyen például a borászat. Számos más élelmiszeripari területen azonban, még a kutatási fázisban tartanak a projektek, de bőven tartalmaznak lehetőséget a gyakorlati alkalmazásra.

2.6 *Metschnikowia pulcherrima* törzsek molekuláris jellemzése

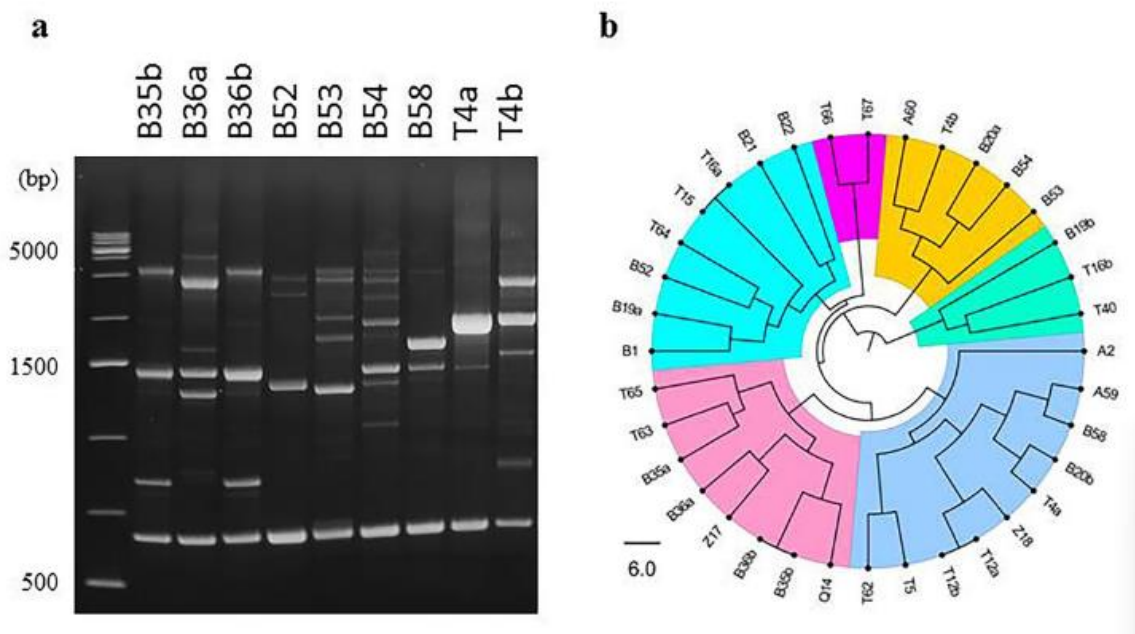
Az újonnan izolált élesztőtörzseket, amelyek jellegzetes gesztenyes-vöröses színű pulcherrimin-zónákat képeznek a telepek körül, gyakran automatikusan *M. pulcherrima*-ként azonosítják anélkül, hogy figyelembe vennék, hogy nem a *M. pulcherrima* az egyetlen pigmenttermelő *Metschnikowia* faj. Az elmúlt két évtizedben további öt fajról derült ki, hogy szintén termelnek pulcherrimint, ezek a *M. andauensis*, *M. rubicola*, *M. shanxiensis*, *M. sinensis* és *M. zizyphicola*. Továbbá a *M. fructicola* — amelyet eredetileg pigmentet nem termelő fajként írtak le — szintén képesek bizonyult pulcherrimin termelésére (Lachance et al, 2016, Sipiczki, 2020). A pigmentek termelése változó és nagyban függ a tenyésztési körülményektől (Sipiczki, 2006). Sipiczki (2020) tanulmányában azt hangsúlyozza, hogy a hagyományos morfológiai azonosítás nem elegendő, és a molekuláris taxonómiai módszerek – például a DNS-szekvenálás és PCR-alapú eljárások – elengedhetetlenek a pontos faj- és törzsszintű jellemzéshez.

Molnár és Prillinger (2005) tanulmányukban a *M. pulcherrima* és rokon fajok genetikai viszonyait elemezték a riboszomális DNS nagy alegység (LSU rDNA) D1/D2 régiójának összehasonlításával. Eredményeik alapján a vizsgált törzsek között jelentős genetikai variabilitás figyelhető meg, ami a fajon belüli diverzitásra és a molekuláris markerek taxonómiai értékére utal. A filogenetikai elemzés megerősítette, hogy a *M. pulcherrima* csoporton belül több, genetikai szempontból elkülönülő klád létezik, ami indokoltá teszi a részletes molekuláris szintű jellemzést. Egy másik tanulmányban a portugál Douro borvidékekről izoláltak *M. pulcherrima* törzseket, és ezeket jellemezték fenotípusos és genotípusos módszerekkel. A PCR-alapú ujjlenyomat-analízis során két különböző primert (M13 és (GTG)₅) alkalmazták, és megállapították, hogy az M13 primerrel kapott profilok nagyobb felbontást biztosítottak, lehetővé téve a törzsek kilenc klaszterbe sorolását, míg a (GTG)₅ primerrel csupán három klaszter különült el. A vizsgálatok alapján megállapították, hogy a M13 primer sokkal hatékonyabb eszköz lehet a fajon belüli genetikai különbségek feltárására (Barbosa et al. 2018).

A molekuláris rendszertanban a gombák, köztük az élesztőfajok elkülönítésére alkalmazott vonalkódszekvenciák közötti különbségek kisebbek egy fajon belül, mint a fajok között. A legszélesebb körben alkalmazott vonalkódok a riboszomális RNS-t kódoló kromoszomális génklaszter ismétlődő szegmensei. A *M. pulcherrima* faj törzseinek elemzése azonban azt mutatta, hogy ennél a fajnál az intragenomiális diverzitás jelentősen meghaladta azokat a küszöbértékeket, amelyeket más, rokon élesztőfajok megkülönböztetésére alkalmaznak. A D1/D2 domének kiterjedt szakaszai viszont nem mutattak diverzitást a genomon belül, így ezek alkalmasak lehetnek az izolátumok taxonómiai besorolásának meghatározására (Sipiczki et al. 2024).

Sipiczki és munkatársai (2024) munkájukban 37 *M. pulcherrima* fajhoz tartozó törzs molekuláris módszerekkel történő vizsgálatát végezték el, és többek között RAPD analízist is végeztek. Az eredményeik azt mutatták, hogy a legtöbb izolátum egyedi mintázattal rendelkezett. A PCR reakciót két primerrel is elvégezték, a fragmentumok száma a RAPD24 primer esetében volt nagyobb (Sipiczki et al. 2024).

6.ábra: Az “a” jelű ábrán az izolátumok RAPD mintázata látható, a “b” jelű ábrán az izolátumok mintázatainak UPGMA dendrogramja látható, az izolátumok csoportosulását a színes kládok mutatják (Sipiczki et al. 2024 nyomán).



Sipiczki (2020) tanulmányában leírta, hogy a nem homogén rDNS-ismétlődések és a fehérjét kódoló „vonalkód” gének gyakori heterozigotizása (nukleotid-polimorfizmusa) miatt a *M. pulcherrima* klád fajainak típusörzsei között nem figyelhetők meg egyértelmű vonalkód-határok. Ezen felül bizonyos izolált törzsek életképes „fajok közötti” hibrideket hoztak létre. A szekvenált genomok magas fokú heterozigotizást és kimérikus genomfelépítést mutatnak, ami arra utal, hogy allopoloid hibridekből jöhetnek létre. A fentebb leírt eredmények tükrében az elmosódott faji határok nagymértékben megnehezítik a pulcherrimint termelő törzsek pontos taxonómiai azonosítását.

3. Anyag és módszer

Diplomadolgozatomban szőlő felületéről izolált *Metschnikowia* törzseket vizsgáltam. Az élesztő törzsek előzetesen telepmorfológiai és mikroszkópos vizsgálatokon, továbbá faj szintű MALDI-TOF-MS, illetve szekvenálással történő azonosításokon estek át. A telepek izolálását és az előzetes vizsgálatokat az Élelmiszermikrobiológiai, -higiéniai és -biztonsági Tanszék munkatársai végezték. A vizsgálatok alapján a *M. pulcherrima* -ként azonosított törzsekkel, továbbá a csoporton kívüli elemként egy *Hanseniaspora uvarum* törzssel dolgoztam tovább.

A kapott törzsek nevének komplexitása miatt, a minták kódolásaként egyszerű sorszámozást alkalmaztam. A minták kódolását, illetve az előzetes vizsgálati eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A vizsgálatba vont törzsek kódolása, illetve az előzetes vizsgálatok eredményei (Forrás: saját munka).

Kód	Mintanév	MALDI-TOF azonosítás	Szekvenálás eredménye	Mikroszkópos kép	Telepek színe
1	Fha1.2.40RN-N	<i>M. pulcherrima</i>		változó morfológia	barnás, kevert telepek
2	BCY 56/7	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	barnás
3	2.HA.1.1.w	<i>M. pulcherrima</i>		kerek sejtek	nem ismert
4	BC.61.1.1	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	barnás
5	BC.65.2.2.	<i>M. pulcherrima</i>	<i>M. pulcherrima</i>	tipikus	barnás
6	2.HA.1.2	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	rózsaszínes
7	HA.1.2.2	<i>M. pulcherrima</i>		kicsi, változó alak	barnás
8	HA.1.1.w	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	barnás
9	FU.1.1	<i>M. pulcherrima</i>		hosszú, nem tipikus	barnás
10	BCY 56/8	<i>H. uvarum</i>	<i>H. uvarum</i>	nem készült	krém
11	BC.65.1.1	<i>M. pulcherrima</i>	<i>M. rubicola</i>	kicsi sejtek	rózsaszínes
12	Fha1.2.40RN-K	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	barnás
13	FU.1.2	<i>M. pulcherrima</i>		hosszú, nem tipikus	krém
14	Fha1.3.40 b	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	rózsaszínes
15	2 FU 1.1.w	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	barnás
16	BC60.1	<i>M. pulcherrima</i>		tipikus	rózsaszínes

3.1 DNS izolálás

YEPD agarról 2 napos tenyészetből 1 kacsnyit oldtam be 300 µl breaking pufferban (2% triton x-100, 1% w/V SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8). Ehhez az elegyhez 0,3 g üvegyöngyöt (d: 400-600 µm) adtam, az így kapott oldatban a sejteket 3×1 percig vortex keverő segítségével roncsoltam. A sejtörmelékét centrifugálással ülepittem (14.000 rpm, 2 perc), majd a keletkezett sejtlyizátumot lepipettáztam és 250 µl fenolt és 250 µl izoamil-alkohol-kloroformot adtam hozzá, és erőteljesen összeráztam. Az oldatot ezután 5 percig teljes fordulaton (14.000 rpm) centrifugáltam, hogy a fázisok különváljanak. A centrifugátum felülúszóját leszívtam pipettával és egy új csöbe helyeztem. A fenolos kezelést a megfelelő tisztaság eléréséig ismételtam. A kezelés végén 500 µl kloroformot adtam a mintához, hogy

eltávolítsam a fenolt. Rázás, majd 2 perc centrifugálás (14.000 rpm) után a felülúszót leszívom pipettával egy új csőbe. A mintához ezt követően 1 ml 96%-os jéghideg etanolt adtam. Következő lépésként a teljes kicsapódás érdekében 10 percig -20°C -on tároltam a csöveket. Az idő letelte után 10 percig centrifugáltam (14.000 rpm) a mintákat. Az etanolt leöntöttem a kicsapódott DNS-ről, fülke alatt szárítottam, miután kiszáradt 50 μl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH=8) pufferrel vittem újra oldatba.

3.2 RNáz-kezelés

Az RNáz-kezelést 10 mg/ml koncentrációjú RNáz enzimmel végeztem. Az enzimet TE pufferrel kevertem a könnyebb kimérhetőség érdekében. A mix elkészítésekor 1 μl enzimhez 2 μl TE puffert adtam mintánként, majd 3 μl -t pipettáztam az Eppendorf csövekben lévő nukleinsav kivonatokhoz és 3 percig centrifugáltam (14.000 rpm). A lecentrifugált mintákat 37°C -on 40 percig termosztáltam Drybath inkubátorban. Az inkubált mintákhoz 200 μl 96%-os etanolt adtam, majd 20 percig -20°C -on tároltam a csöveket. Centrifugálás után fülke alatt kiszáritottam a mintákat és 50 μl TE puffer hozzáadásával visszaoldottam a csövekben maradt DNS-t.

3.3 Koncentráció és tisztaság vizsgálat

Az izolált DNS tisztaságát és koncentrációját fotometriás módszerrel vizsgáltam. A vizsgálatot Thermo Scientific NanoDrop 2000 típusú készülékkel végeztem. A készülék spektrofotometriás módszerrel végzi a nukleinsav koncentráció meghatározását, amely a DNS és az RNS UV abszorbanciáján alapul. A nukleinsav oldat elnyelését 260 nm-en vizsgáltam a koncentráció meghatározásához. A szennyeződés mértékének meghatározásához a 280 nm-en történő vizsgálatot alkalmaztam, illetve az $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -as arányszámot vizsgáltam. A készülékre 2 μl mintaoldatot helyeztem, majd a készülék a fentebb, előre beállított paraméterek alapján elvégezte a vizsgálatot. Az analízis végeztével kiértékeltem a kapott eredményeket. A spektrofotometriás vizsgálaton felül a minták nukleinsav tartalmát agaróz gélen történő futtatással is ellenőriztem. A módszer a nukleinsav által megkötött etídium-bromid UV – fluoresszenciájának erősségéből való becslésen alapul.

3.4 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) analízis

A vizsgált törzsek 26S riboszomális DNS D1-D2 régióit PCR módszerrel sokszoroztam fel, az alkalmazott primerek az NL1 (5' GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG 3') és az NL4 (5'

GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') voltak. A mintákhoz szükséges PCR reagens mixet adott receptúra alapján mértem össze, melyet a 4. számú táblázat tartalmaz.

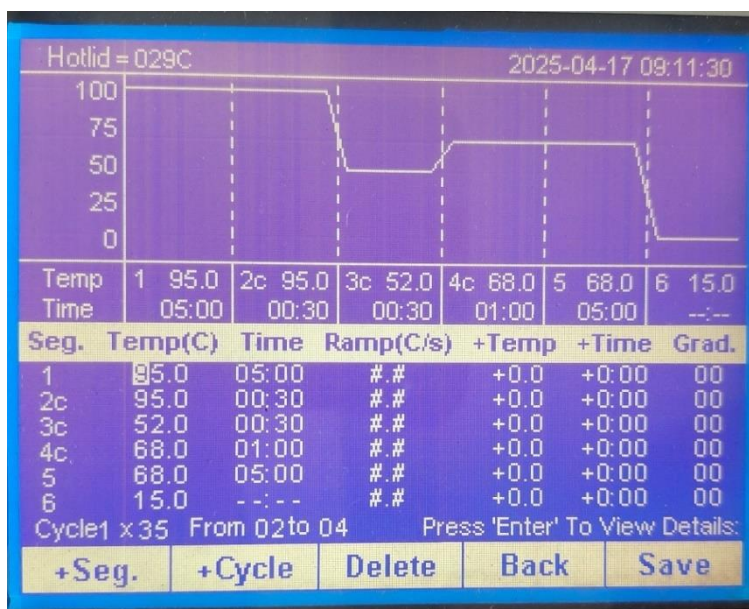
4. táblázat: Az ARDA PCR vizsgálathoz alkalmazott mix összetételének a receptje (Forrás: saját munka).

<i>Összetevő megnevezése</i>	<i>Bemérendő mennyiség egy mintához [μl]</i>
<i>Puffer (5x)</i>	<i>6</i>
<i>dNTP (25-25 mM)</i>	<i>0,2</i>
<i>NL1forward primer (10 μM)</i>	<i>1</i>
<i>NL4 reverse primer (10 μM)</i>	<i>1</i>
<i>OneTaq® DNS polimeráz (5 U/ μl)</i>	<i>0,2</i>
<i>Steril víz</i>	<i>20,6</i>
<i>DNS izolátum</i>	<i>1</i>
<i>Reakcióelegy végtérfogata</i>	<i>30</i>

A 4. táblázatban található recept és a mintaszám alapján felsoroztam az alkotókat majd Eppendorf csöbe összemértem. Az így kapott master mixet homogenizálás után mikro Eppendorf csövekbe mértem szét. A csövekben lévő mixhez 1 μ l DNS izolátumot adtam, ezzel a reakcióelegy végtérfogata 30 μ l. A DNS – PCR elegyet homogenizáltam, majd rövid ideig centrifugáltam. A PCR futtatáshoz egy ESCO Swift Maxi típusú készüléket használtam. A PCR reakció lépései az alábbiak voltak: 1. Initiális denaturáció: 95°C, 5 perc; 2. Denaturáció: 95°C, 30 másodperc; 3. Annelálás: 52°C, 30 másodperc; 4. Elongáció: 68°C, 1 perc; 5. Végső elongáció: 68°C, 5 perc; 6. Hűtés: 15°C. A 2. – 4. Lépések 35 cikluson keresztül ismétlődtek. A készülék beállításait a 7. ábra is tartalmazza. Az amplifikáció hatékonyságának ellenőrzését a kapott minták 1%-os agaróz gélen történő futtatásával végeztem, továbbá az amplifikátumok méretére is következtettem.

Az amplifikált DNS-ek további vizsgálatát restriktions hasítóenzimes kezeléssel végeztem. A hasítóenzimek közül a *HaeIII*, *RsaI* és az *ScrFI* enzimekkel dolgoztam. Mikro Eppendorf csövekbe 3 μ l amplifikált mintához 0,2 μ l hasítóenzimet, 1 μ l puffert és 5,8 μ l steril vizet adtam. A mintákat ezután 37°C-on inkubáltam legalább 4 órán át. Az inkubáció ideje alatt az enzimek elvégezték a specifikus helyeken történő hasításokat. A kezelés eredményének a kiértékelését minden esetben 1,5%-os agaróz gélen történő futtatással végeztem.

7.ábra: PCR készülék beállításai az ARDRA analízis esetén (Forrás: saját kép).



3.5 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analízis

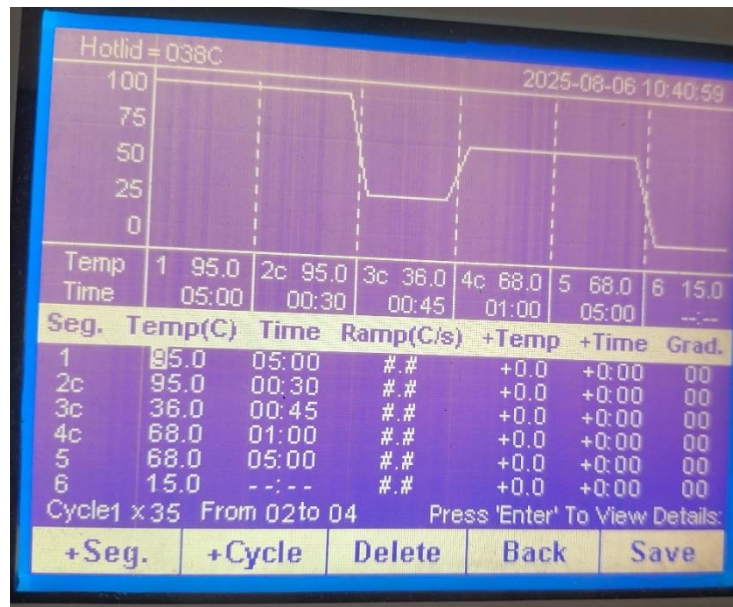
A vizsgált minták DNS szekvenciáit PCR módszerrel sokszoroztam fel. A mintákhoz szükséges PCR reagens mixet adott receptúra alapján mértem össze. A 5. táblázatban található recept és a mintaszám alapján a master mixet Eppendorf csőbe mértem össze. Az így kapott mixet homogenizálás után mikro Eppendorf csövekbe mértem szét. A csövekben lévő mixhez 1 µl DNS izolátumot adtam, ezzel a reakcióelegy végtérfogata 30 µl. Az elegyet homogenizáltam, majd lecentrifugáltam.

5.táblázat: A RAPD PCR vizsgálathoz alkalmazott reagens mix összetételének a receptje (Forrás: saját munka).

Összetevő megnevezése	Bemérendő mennyiség egy mintához [µl]
<i>Puffer (10x)</i>	3
<i>dNTP (25-25 mM)</i>	0,2
<i>MgCl₂ (25 mM)</i>	0,5
<i>GTG3 primer (10 µM)</i>	1
<i>Taq DNS polimeráz</i>	0,15
<i>Steril víz</i>	24,15
<i>DNS izolátum</i>	1
Reakcióelegy végtérfogata	30

A PCR futtatáshoz ismét az ESCO Swift Maxi típusú készüléket használtam. A PCR reakció lépései az alábbiak voltak: 1. Inicialis denaturáció: 95°C, 5 perc; 2. Denaturáció: 95°C, 30 másodperc; 3. Annelálás: 36°C, 45 másodperc; 4. Elongáció: 68°C, 1 perc; 5. Végső elongáció: 68°C, 5 perc; 6. Hűtés: 15°C. A 2. – 4. Lépések 35 cikluson keresztül ismétlődtek. A készülék beállításait a 8. ábra is tartalmazza.

8.ábra: PCR készülék beállításai a RAPD analízis esetén (Forrás: saját kép).



Az reakció lejátszódása után az amplifikált mintákból kivettem 10 µl oldatot és 1,5%-os agaróz gélen elválasztottam az amplikonokat a vizsgálat kiértékelésének a céljából.

3.6 Agaróz gélelektroforézis

A vizsgálatok kiértékelését mind a DNS izolálás, mind a PCR termékek, mind pedig az ADRA és RAPD vizsgálatoknál agaróz gélen történő futtatással végeztem. A DNS izolálás esetében 1%-os agaróz (1g agaróz + 100 ml 0,5x TBE oldat, 5x TBE-ből hígítva, melynek összetétele: 54g Tris, 27,5 bórsav, 20 ml 0,5M EDTA pH=8.0) gélen, a többi vizsgálat esetében 1,5%-os agaróz (1,5g agaróz + 100 ml 0,5x TBE oldat) gélen végeztem a minták vizsgálatát. Az agarózt analitikai mérlegen kimértem egy főzőpohárba, melyre ráöntöttem az előre mérőhengerrel kimért 0,5x TBE oldatot. Az oldatot homogenizáltam, majd mikrohullámú sütő segítségével az agarózt beoldódásáig melegítettem. A homogén forró oldatot folyóvíz alatt hűtöttem, majd mikor az oldat az öntési hőmérsékletre hűlt (kb. 46-60°C), hozzáadtam a GelStar™ Nucleic Acid gélfestéket. Az agaróz oldatot ezután addig kevertem, amíg a festék homogénen eloszlott a folyadékban. A kapott oldatot az előre összerakott formába buborékmentesen kiöntöttem. A

gél 15 perc után szilárdult meg. A megszilárdult gél a futtatókádba helyeztem, a kádat 0,5x TBE oldattal töltöttem fel, hogy ellepje a folyadék a gél. A gél szilárdulása közben a DNS izolátumokat/PCR termékeket összemértem a 6X DNA Gel Loading festékekkel. Az ARDRA és RAPD vizsgálatoknál 10 µl mintához adtam 2 µl festéket, a DNS izolátum koncentráció ellenőrzésénél pedig 3 µl mintához adtam 1 µl festéket. A fragmentumok méreteinek a meghatározásához az első gélzsebbe minden esetben 3 µl Midranger DNS markert (NORGEN Biotek) adtam. A gél többi zsebébe a loading festékekkel összemért DNS tartalmú mintákat vittem fel. A minták géltre történő felvitele után a kádat lezártam és az elektródokat csatlakoztattam az áramforráshoz (Biorad Power PAC 300). A gélek futtatása 120V-os feszültségen történt 90 percen keresztül. Az elkészült géleken a mintázatokat UV fény alatt vizsgáltam a restrikciós vizsgálatok esetében. A későbbi szoftveres kiértékeléshez a mintázatokról fényképet is készítettem.

3.7 Mintázatok kiértékelése, dendrogram szerkesztés

A kapott gélképeket a PyElph 1.4 -es programmal értékeltem ki. A szoftver segítségével először meghatároztam az egyes minták sávjait, ezután a sávokban megtalálható fragmentumokat, illetve amplikonokat jelöltem ki. Következő lépésben a marker sávját és a sávokhoz tartozó bázispár értékeket adtam meg, hogy a szoftver a marker alapján ki tudja számolni az egyes fragmentumok méretét. A rendszer ezután kiszámolta az egyes sávokhoz tartozó fragmentumok méreteit, ami alapján dendrogramot készített. A dendrogram készítéséhez a “UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)” beállítást választottam.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Koncentráció és tisztaságvizsgálat eredményei

A koncentráció esetében a célérték 100 ng/μl vagy a fölötti koncentráció volt, megfelelő tisztaságúnak a 1,8 - 2,0 közötti OD₂₆₀/OD₂₈₀ értékű DNS kivonatot tekintettem. A kapott eredményeket a 6. táblázat tartalmazza.

6.táblázat: A koncentráció és tisztaságvizsgálat eredményei (Forrás: saját munka).

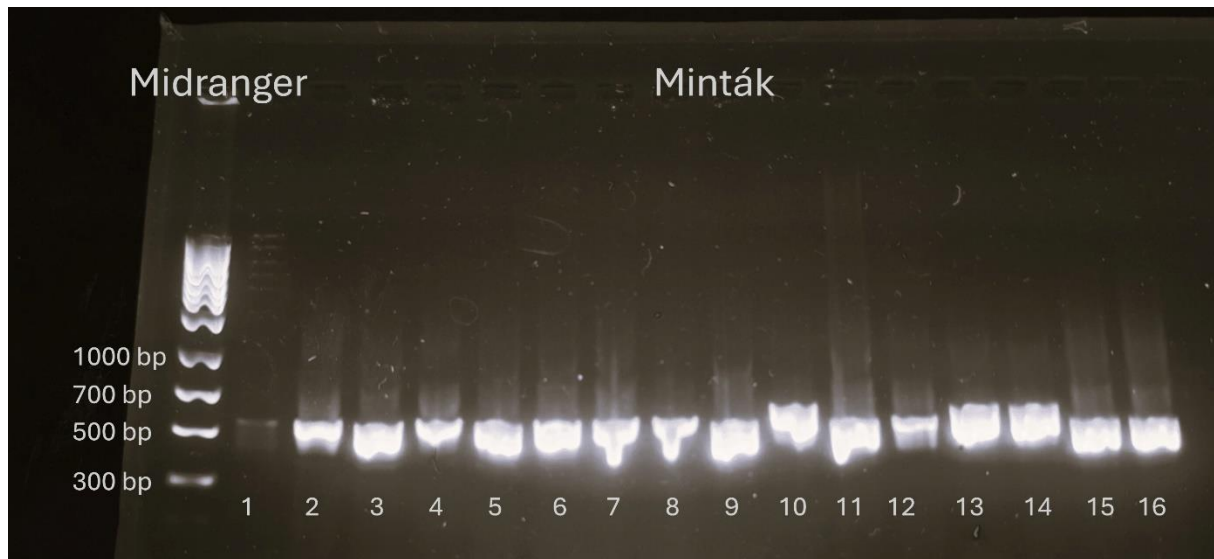
Kód	Mintanév	Koncentráció [ng/μl]	260/280
1	Fha1.2.40RN-N	112,5	1,72
2	BCY 56/7	203,0	1,90
3	2.HA.1.1.w	177,3	1,61
4	BC.61.1.1	245,9	1,89
5	BC.65.2.2.	122,4	1,61
6	2.HA.1.2	332,1	2,00
7	HA.1.2.2	235,5	1,88
8	HA.1.1.w	452,5	2,05
9	FU.1.1	113,1	1,70
10	BCY 56/8	384,8	1,88
11	BC.65.1.1	133,1	2,03
12	Fha1.2.40RN-K	433,5	2,07
13	FU.1.2	192,7	1,84
14	Fha1.3.40 b	117,4	1,63
15	2 FU 1.1.w	199,1	1,62
16	BC60.1	112,5	1,65

A DNS koncentráció az összes minta esetében a kívánt 100 ng/μl értéken felül volt. A fehérje szennyeződés megítélésére alkalmazott OD₂₆₀/OD₂₈₀ arányszám nem minden minta esetében esett az 1,8 – 2,0 közötti tartományában, de 1,6 feletti volt, ami még elfogadható. A gélekép alapján megállapíthattam, hogy az izolált DNS az összes minta esetében egy éles sávként volt megfigyelhető, amelyek intenzitása összhangban volt a spektrofotometriás módszerrel kapott koncentráció eredményekkel. A vizsgálatok eredményei alapján a DNS kivonatok alkalmasnak találtam a PCR-es tesztek elvégzéséhez.

4.2 Az ARDRA vizsgálatok eredményei

Az ARDRA PCR termékeket 1% -os agaróz gélen történő futtatással ellenőriztem, melynek az eredményét a 9. ábra tartalmazza. Mindegyik minta UV-flouresszenciája intenzív volt, ami a megfelelő mértékű amplifikációt jelezte, kivéve az 1-es mintát.

9.ábra: Az ARDRA analízis során készült PCR amplifikátumok 1%-os agaróz gélen történő futtatásának az eredménye (Forrás: saját kép).

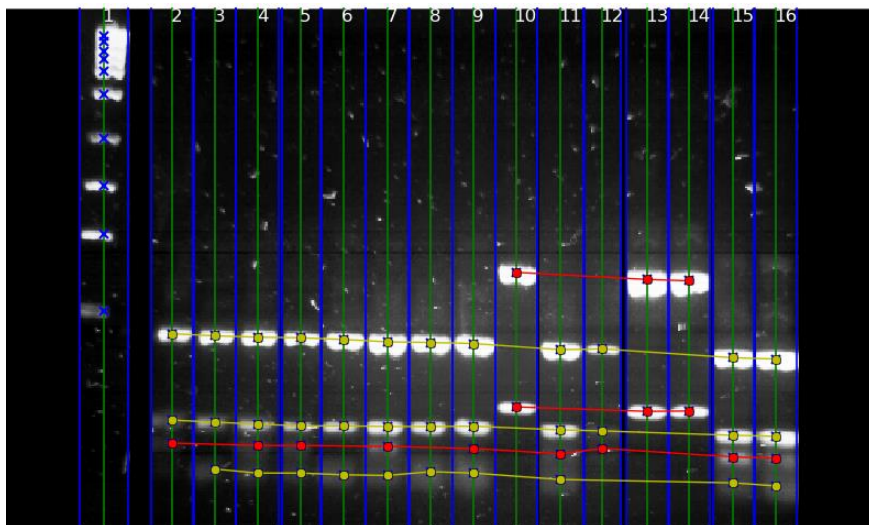
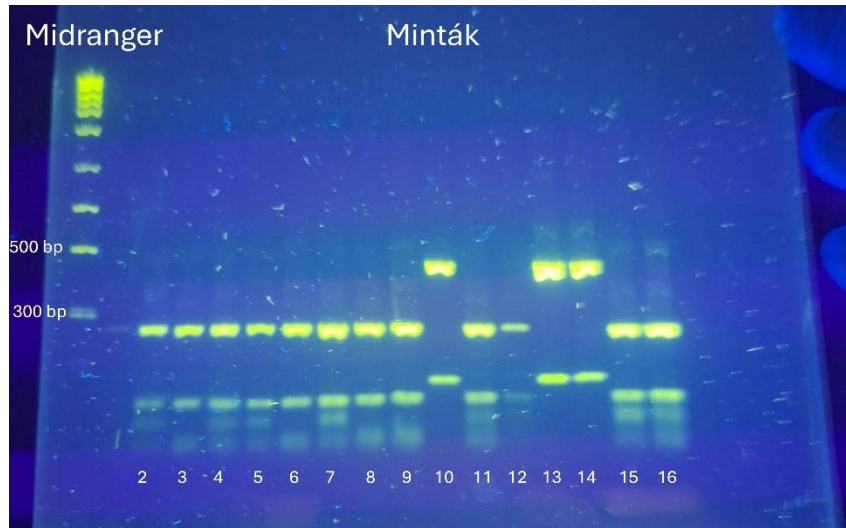


Az amplikonok méretére a marker (Midranger) sávjai segítségével következtethetünk. A 10-es, 13-as és 14-es minták nagyobb amplikonnal rendelkeznek, 600 bp körüli a méretük. A többi minta esetében amplikonok mérete 500 bp körül van.

Az ARDRA vizsgálatok esetében azonban a taxonómiai, fajszerű különbségeket szerettem volna vizsgálni a kapott minták esetében. Habár előzetesen egy kivétellel az összes törzs *M. pulcherrima*-ként lett azonosítva MALDI-TOF-MS módszerrel, a mikroszkópos képek és a telepek morfológiájában több esetben is voltak eltérések (lásd 3. táblázat). Az ARDRA vizsgálatot először a *Hae*III hasítóenzimmel végeztem el, amely a GGCC szekvenciánál végez hasítást, a gélfuttatás eredménye a 10. ábrán látható.

A gélképen (10. ábra) jól látszik, hogy két nagyobb csoport különül el a nagyobb méretű fragmentumok alapján, továbbá a halványabb, kisebb méretű sávok alapján további alcsoportok fedezhetőek fel.

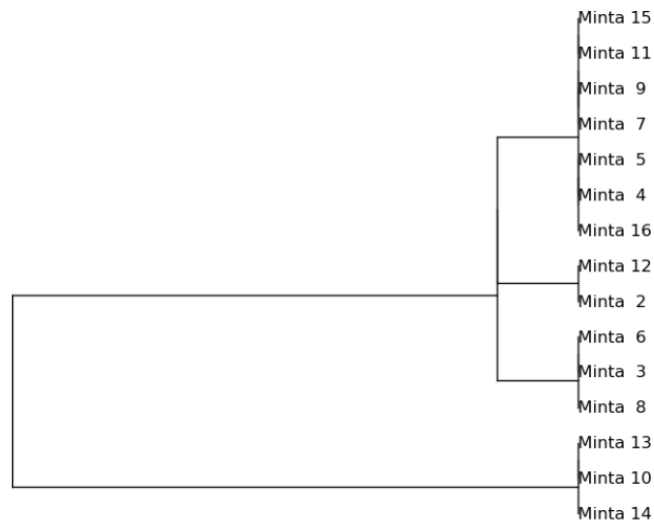
10.ábra: ARDRA analízis *Hae*III hasítóenzimével végzett gélfuttatás képe (felül) és PyElph 1.4-es szoftverrel feldolgozott kép (alul) Az első oszlopban a marker (Midranger: 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 bp) látható, a második oszloptól kezdődően az oszlopok számozása megegyezik a minták számozásával (Forrás: saját munka).



7.táblázat: ARDRA analízis *Hae*III hasítóenzimével végzett gélfuttatás fragmentumainak szoftveresen számolt mérete (Forrás: saját munka).

Mintakód:	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
									472			476	474		
	270	266	264	263	260	256	255	254		254	245			254	250
									128			127	129		
	99	100	102	101	100	102	103	102		102	104			102	101
	72		71	72		75		74		74	75			74	75
	60	61	61	62	60	60	62	62		70	70			70	72

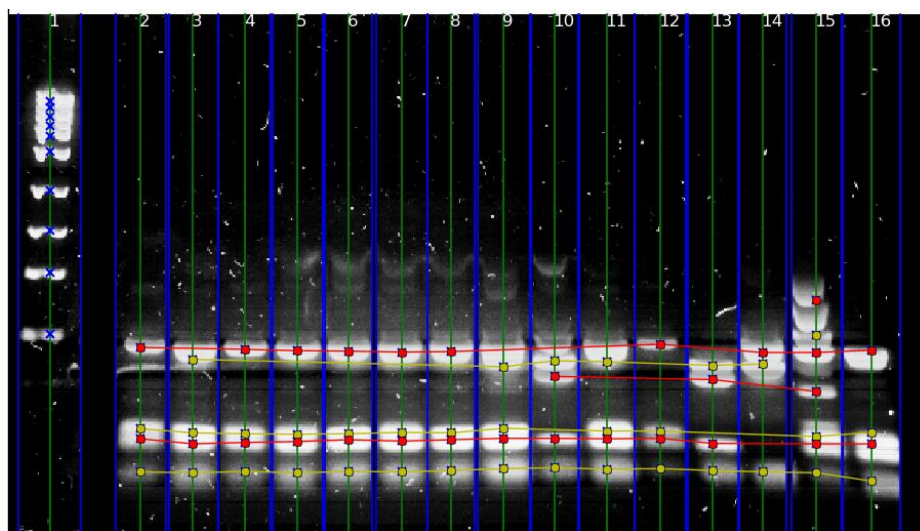
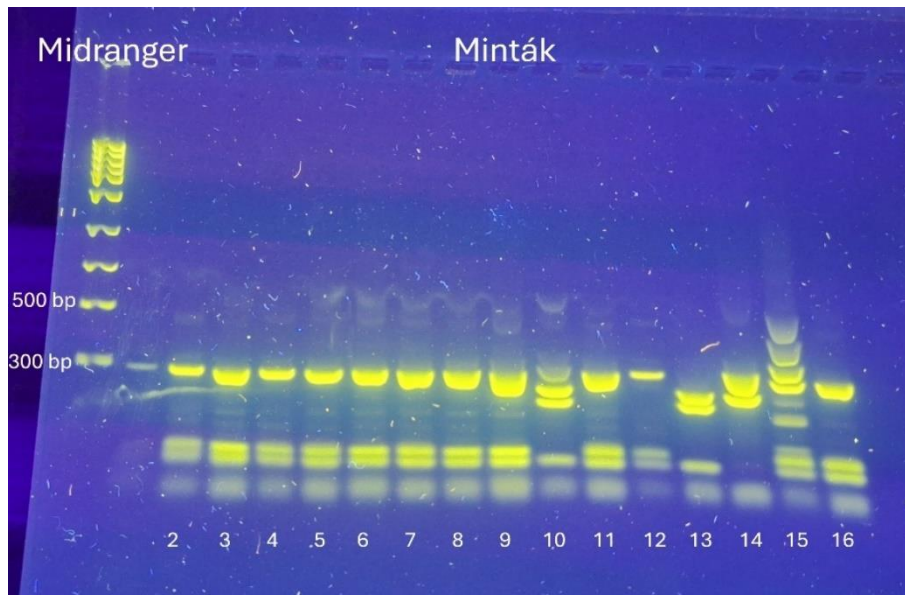
11.ábra: ARDRA analízis *Hae*III hasítóenzimmel kapott mintázatok alapján készített dendrogram (Forrás: saját munka).



A dendrogram (11. ábra) és a géleképek (10. ábra) alapján két nagyobb csoport különíthető el. A 10-es számú minta a *H. uvarum* törzs volt, és a kapott mintázat alapján a 10-es és a 14-es törzs habár *M. pulcherrima*-ként lett azonosítva korábban, a fragmentumok mintázata alapján inkább *Hanseniapora*-ként lehetne őket azonosítani. A különbség a fragmentumok méretén (7. táblázat) is megfigyelhető, itt ~470 bp és ~130 bp méretű sávokat kaptunk. A többi előzetesen *M. pulcherrima*-ként azonosított törzs sávmintázata és a fragmentumok mérete is hasonlóan alakult. A hasonlósági fán a nagyobb csoporton belül a *M. pulcherrima*-ként azonosított törzsek 2 kisebb csoportot alkotnak, a halványabb sávok helyzete alapján.

Az analízist *Rsa*I hasítóenzimmel is elvégeztem, amely a GTAC motívumnál végez hasításokat, mivel ez a szakasz gyakran fordul elő a riboszómális DNS régiókban ezért több fragmentum képződhet, ami alapján jobban elkülöníthető faji mintázatok keletkezhetnek.

12.ábra: ARDRA analízis *RsaI* hasítóenzimével végzett gélfuttatás képe (felül) és PyElph 1.4-es szoftverrel feldolgozott kép (alul) Az első oszlopban a marker (Midranger: 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 bp) látható, a második oszloptól kezdődően az oszlopok számozása megegyezik a minták számozásával (Forrás: saját munka).

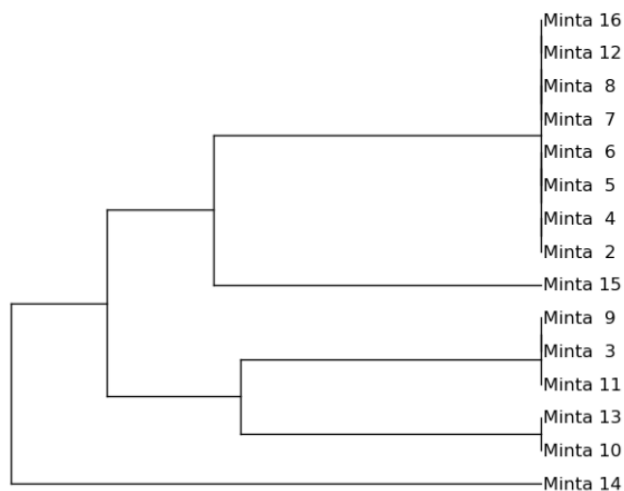


Az *RsaI* enzimmel kapott mintázatok a 12. ábrán láthatók. A 10-es, 13-as és 14-es törzsek mintázata ennél a hasítóenzimes vizsgálatnál is elkülönül, ugyanakkor a 14-es törzs mintázata kissé eltér, nagyobb méretű fragmentek (8. táblázat) jöttek létre. A 15-ös minta esetében az emésztés során valami gátolta az enzimet, így a mintázatában több emésztetlen fragment is keletkezett (a táblázat ezen oszlopát üresen hagytam, mivel az eredmények így nem összehasonlíthatóak).

8.táblázat: ARDRA analízis *RsaI*. hasítóenzimével végzett gélfuttatás fragmentumainak a szoftveresen számolt mérete (Forrás: saját munka).

Mintakód:	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Bázispárok mérete [bp]	298		291	286	285	282	283				298				282
		268						262		264			270		
									254			250	252		
									210			202			
	80	76	75	75	75	77	76	80		78	78				70
	72	68	69	70	71	70	71	72	72	72	72	72	78		74
	51	51	51	51	51	51	51	52	53	53	53	53	52	51	47

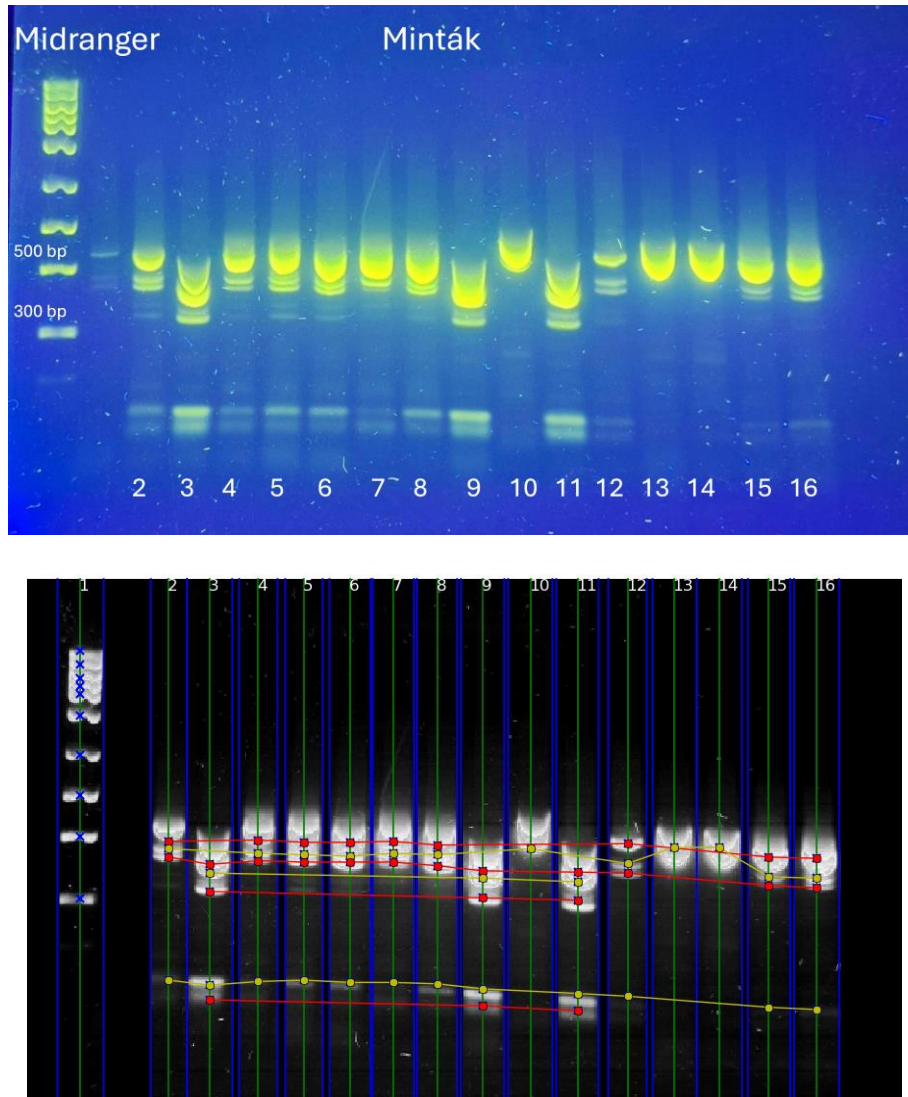
13.ábra: ARDRA analízis *RsaI* hasítóenzimével kapott mintázatok alapján készített dendrogram (Forrás: saját munka).



Az *RsaI* mintázatok alapján szerkesztett hasonlósági fa alapján látszik, hogy a törzsek csoportosítása árnyaltabbá vált. Alapvetően három nagyobb csoportot különböztethetünk meg. Az egyik csoportba a 10 és 13-as minták tartoznak, a *HaeIII* enzimmel történt vizsgálat alapján a 14-es törzs is ebbe a csoportba tartozott, de az *RsaI* enzimmel kapott képe alapján eltér. A 3, 9 és 11-es törzsek fragmentmintázata szintén kissé eltért a többi törzs mintázatától, így ezek külön csoportba kerültek. A többi törzs *RsaI* enzimmel kapott ARDRA mintázata azonos, a 15-ös minta kivételével, sajnos itt az emésztés nem sikerült.

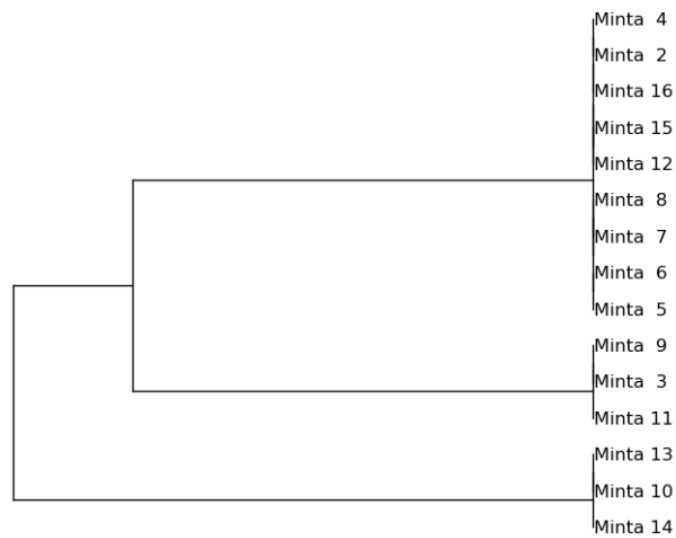
Az ARDRA analízis során *ScrFI* hasítóenzimes vizsgálatot is végeztem, hogy a kialakult törzscsoportosítást tovább tudjam vizsgálni. Az enzim a CCNGG motívumnál végez hasításokat, mivel ez a szakasz is gyakran fordul elő a riboszómális DNS régiókban ezért több fragmentum képződhet, ami alkalmassá teszi fajra jellemző mintázatok létrehozására.

14.ábra: ARDRA analízis *ScrFI* hasítóenzimével végzett gélfuttatás képe (felül) és PyElph 1.4-es szoftverrel feldolgozott kép (alul) Az első oszlopban a marker (Midranger: 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 bp) látható, a második oszloptól kezdődően az oszlopok számozása megegyezik a minták számozásával (Forrás: saját munka).



Az *ScrFI* enzimmel kapott gélkép (14. ábra) alapján látható, hogy nem történt teljes emésztés, nem minden hasítóhelyen hasított az enzim, erre utal az is, hogy láthatóak az amplikonok. Ennek ellenére 3 főbb csoportot fedezhetünk fel. A 10-es, 13-as és 14-es számú minták mintázata élesen különbözik a többi mintázattól, mivel az enzim nem hasította az NL1-NL4 primerrel felszaporított amplikont. A többi, részlegesen hasított minta esetében a sávmintázat ezzel szemben nagyon hasonló, egyedül a 3-as, 9-es és 11-es minták válnak el.

15.ábra: ARDRA analízis *ScrFI* hasítóenzimével kapott mintázat alapján készített dendrogram (Forrás: saját munka).

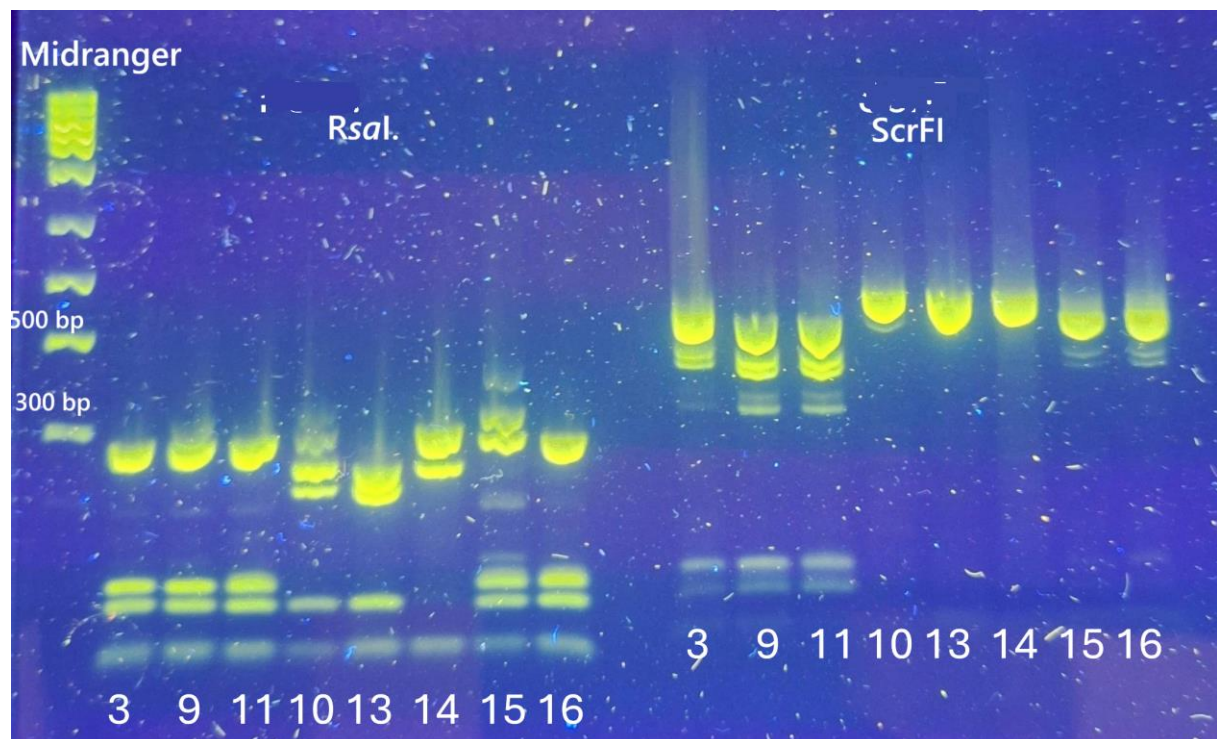


Az ARDRA vizsgálatok alapján összességében három fő csoportot lehetett elkülöníteni az eredmények szerint, ezt a három csoportot a 15. ábra is szemlélteti. Azonban ezek a csoportok nem minden esetben válnak el élesen egymástól. Mind a három enzimes vizsgálat alapján azonos mintázatot adtak a 2-es, 4-es, 5-ös, 7-es, 12-es, és 16-os minták, melyeket előzetesen *M. pulcherrima*-ként azonosítottak. A mintázatokban lévő nagyfokú hasonlóságok következtében az ARDRA vizsgálat alapján is arra lehet következtetni, hogy ezek a törzsek a *M. pulcherrima* fajhoz tartoznak. A szintén *M. pulcherrima*-ként azonosított 6-os és 8-as törzsek csak kismértékű eltérést mutattak a fent felsorolt törzsektől a *HaeIII*-mal kapott mintázatban, így valószínűsíthető, hogy ugyancsak a *M. pulcherrima* fajba tartoznak. A 15-ös minta *HaeIII*. és *ScrFI* enzimmal is a *M. pulcherrima*-ra jellemző mintázatot mutatott, ugyanakkor az *RsaI* esetén jelentősebb eltérés mutatkozott, amelyet az enzim részleges emésztése okozott.

A 3-as, 9-es és 11-es minták fragmentmintázat alapján a *M. pulcherrima*-ként azonosított törzsek sávmintázatához álltak közelebb az *ScrFI* és *RsaI* hasítóenzimes vizsgálatok esetében, illetve a *HaeIII* enzimes vizsgálatnál nem mutattak jelentősebb eltérést. A *M. pulcherrima* fajon belül is találtak különböző genetikai változatokat, illetve a fajhatárok sem különülnek el élesen (Sipiczki, 2020, Sipiczki et al. 2024), így az is lehetséges, hogy ezek a törzsek a *M. pulcherrima* egy közeli rokon fajához, például a *Metschnikowia fructicola* vagy a *Metschnikowia rubicola* fajhoz tartoznak, de ennek a megállapításhoz további vizsgálatok szükségesek.

A 10-es minta előzetesen *H. uvarum*-ként lett azonosítva, és a sávmintázata minden enzimes vizsgálat alapján eltérő volt, azonban a 13-as és 14-es törzsek mintázata is a *H. uvarum* fragmentmintázatával volt azonos, a 13-as minta esetében mindhárom enzimmel, míg a 14 minta esetében két enzimmel (*HaeIII*, *ScrFI*), így ezek a törzsek nagy valószínűséggel nem a *M. pulcherrima* fajhoz, hanem valamely a *H. uvarum*-hoz közel álló fajhoz tartozhatnak. Mivel a fentebb leírt különbségeket szerettem volna alátámasztani, így az *ScrFI* és *RsaI* hasítóenzimmel végzett vizsgálataimat megismételtem a kérdéses hovatarozású minták esetében.

16.ábra: Az ismételt *RsaI* és *ScrFI* hasítóenzimes vizsgálatok gélképe a kérdéses hovatarozású minták esetében (Forrás: saját munka).



Az ismételt hasítóenzimes vizsgálatok gélképe (16. ábra) alapján elmondható, hogy a korábbi vizsgálatok eredményét meg tudtam ismételni. A 10-es, 13-as és 14-es törzsek mintázatai ismét eltértek a *M. pulcherrima* törzsek mintázatától mind az *ScrFI* mind az *RsaI* hasítóenzimes vizsgálatoknál. Mivel a fragmentmintázatok eltérőek a többi minta sávmintázatától, így megerősítést nyert, hogy a 13-as és 14-es izolátumok a *Hanseniaspora* nemzetséghez állnak közelebb. A fragmentumok alapján azonban a 14-es minta esetén eltérések látszanak, így ez a törzs a *H. uvarum* faj szőlőn megtalálható rokona lehet, például *Hanseniaspora guilliermondii* vagy *Hanseniaspora occidentalis*.

A *M. pulcherrima* mintázatokhoz hasonlóan mondott 3-as, 9-es és 11-es törzsek szintén az eredeti vizsgálat eredményéhez hasonló mintázatokat adtak. Az *RsaI* -es vizsgálatnál a 16-os mintával azonos fragmentumokat kaptam, illetve az *ScrFI* vizsgálatnál kis mértékű eltérés látszódott a 9-es és 11-es törzseknél. A 15.-ös minta az eredeti *RsaI* vizsgálatához hasonlóan szintén részlegesen emésztődött, illetve az eredeti vizsgálatához hasonlóan az *ScrFI* enzim esetében nem történt vagy nem teljes emésztés történt a mintáknál.

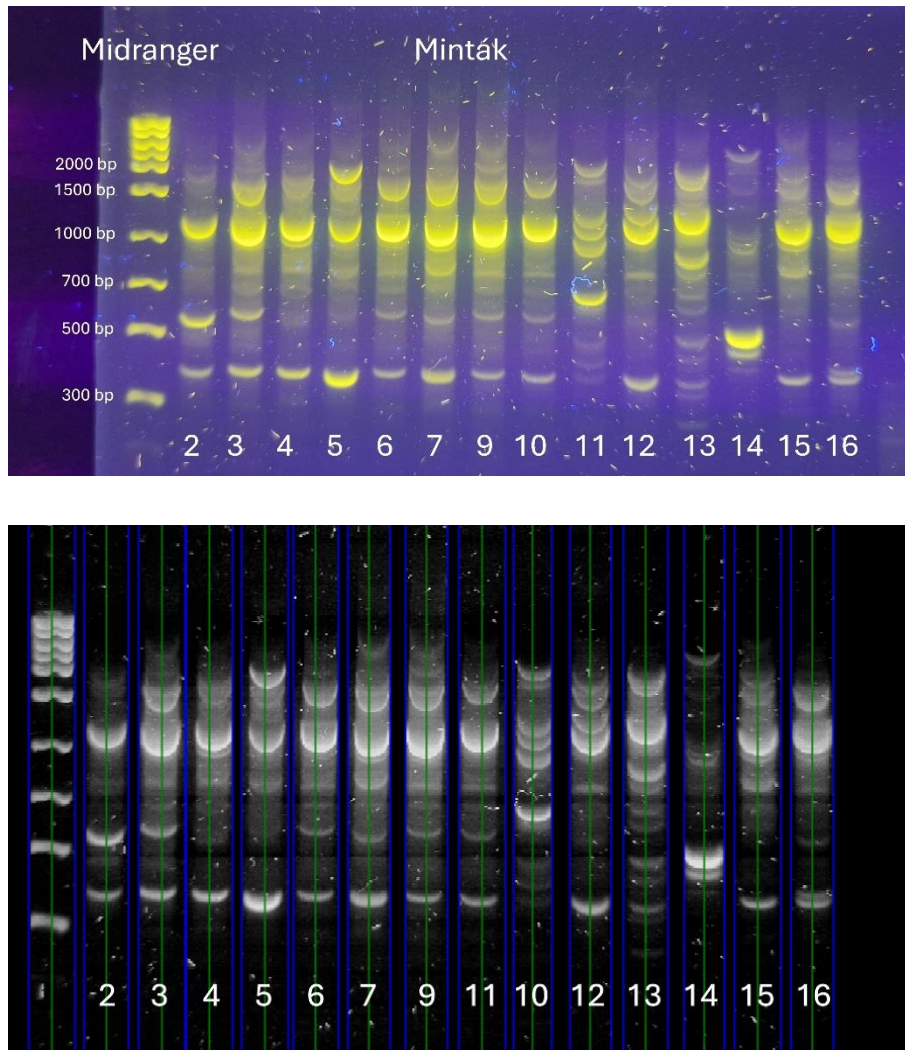
Összeségében elmondható, hogy az *RsaI* és *ScrFI* hasítóenzimes vizsgálatok ismétlése sikeres volt, az eredeti gélképeken lévő sávmintázat különbségek az ismételt vizsgálat során is láthatóak voltak a gélen, így megerősítették a minták faji szintű csoportosítását.

Továbbá, ha a molekuláris biológiai eredményeket, összehasonlítjuk a mikroszkópos és telep morfológiai vizsgálatok feljegyzéseivel, úgy további megerősítést nyernek a kialakított csoportok, mivel a telepek színében és a mikroszkópos képekben is voltak különbségek. A 3-as, 9-es és 11-es minták esetében a mikroszkópos kép nem a *M. pulcherrima*-ra jellemző volt, hanem a minták esetében különböző, kicsi, hosszúkás és kerek sejtek voltak láthatóak, továbbá a 11-es törzs szekvenálással is azonosítva volt, aminek 99,3 %-os homológia alapján *M. rubicola* lett az eredménye, azonban a meghatározott szekvencia 99 %-os homológiát mutatott a *M. pulcherrima*-val is (Awuor, 2024). A 10-es és 13-as minták esetében krém színűek voltak a telepek, szemben a többi minta barnás, rózsaszínes telepeivel, ami egyértelműen a pulcherrimin termelés hiányára utal, hiszen a *Hanseniaspora* nemzetség tagjai nem állítják elő ezt a pigment anyagot. Ugyanakkor ellentmondások is vannak, a 14-es minta amelyet a gélképek alapján *Hanseniaspora* nemzetséghez soroltunk, viszont előzetesen MALDI-TOF módszerrel *M. pulcherrima*-ként lett azonosítva, és a mikroszkopos kép alapján a többi *Metschnikowia*-val azonos volt, továbbá a telepek is rózsaszínesek voltak, a pulcherrimin termelésre utalva. A 14-es izolátumra vonatkozó eredmények további megerősítést igényelnek.

4.3 A RAPD vizsgálatok eredményei

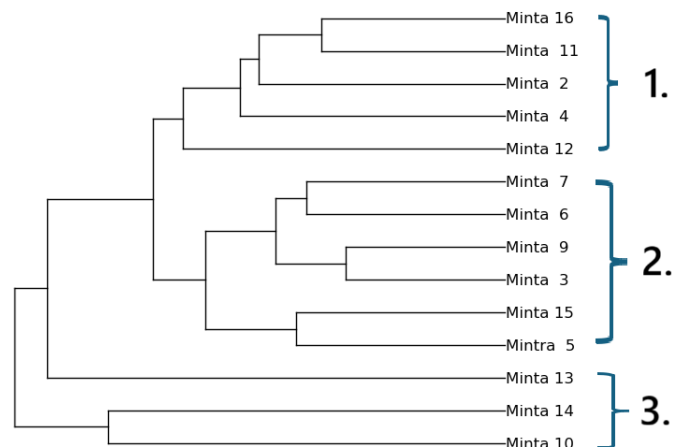
A fajkon belüli polimorfizmust RAPD módszerrel vizsgáltam. Ennél a vizsgálatnál arra voltam kíváncsi, hogy a korábban az ARDRA módszerrel beazonosított faji csoportok mennyire sokszínűek. A kapott mintázatok értékelésénél figyelembe vettem minden sávot, függetlenül annak erősségétől.

17.ábra: RAPD módszerrel végzett tipizálás gélképe (felül) és PyElph 1.4-es szoftverrel feldolgozott kép (alul) Az első oszlopban a marker (Midranger: 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 bp) látható (Forrás: saját munka).



A 17. ábra alapján a RAPD vizsgálat esetén nagyon változatos mintázatokat kaptam a 300-2000 bp-os tartományban, ahol a nagyobb méretű fragmentek domináltak. A korábban MALDI-TOF-MS és ARDRA módszerrel meghatározott *Metschnikowia* fajhoz tartozó törzsek mintázata nagyfokú hasonlóságot mutatott. A mintázatok alapján szerkesztett dendrogramon a törzsek három nagyobb klasztert alkotnak (18. ábra). A klasztereken belül az egyes izolátumok között nincs teljes egyezés, minden izolátum egyedi. A 3. klaszterbe tartozó három törzs, - a 10-es, 13-as és 14-es minták esetében a mintázatok nagyfokú különbséget mutattak. Ezeket az izolátumokat az ARDRA vizsgálatok alapján a *Hanseniaspora* nemzetséghez soroltuk. Ezen törzsek különbözősége a dendrogrammon - (18. ábra) is megfigyelhető.

18.ábra: RAPD módszer eredménye alapján kapott dendrogram (Forrás: saját munka).



A korábbi vizsgálatok alapján külön csoportnak gondolt 3-as, 9-es és 11-es minták többi törzstől való elkülönülése viszont a RAPD vizsgálat alapján nem kimutatható, mintázatuk a többi *Metschnikowia*-hoz hasonlatos. A 11-es izolátum az 1. klaszterbe, míg a 3 és 9-es törzsek a 2. klaszterbe tartoznak. Az elemzés alapján a vizsgált törzsek közül a 3-as és 9-es törzsek állnak a legközelebb egymáshoz.

5. Következtetés és javaslatok

Az első számú minta egyik futás alkalmával sem működött megfelelően, hiába lett a mintának a DNS koncentrációja és tisztasága is megfelelő, sem a RAPD, sem az ARDRDA vizsgálat PCR termékei nem látszottak a gélen. Ennek oka lehetett, hogy a DNS izolátum olyan komponenset tartalmazott, ami a PCR-t gátolta. Itt a teljes vizsgálatot, beleértve a DNS izolálást, érdemes lenne újra elvégezni.

A molekuláris biológiai, ARDRA és RAPD vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az előzetesen MALDI-TOF-MS módszerrel *M. pulcherrima*-ként azonosított törzsekre jelentős genetikai változatosság jellemző, ami összhangban van az irodalomban megtalálható adatokkal (Sipiczki, 2020, Sipiczki et al, 2024). A vizsgált 3-as, 9-es és 11-es izolátumok esetében a mintázatok kissé eltérőek voltak a többi *M. pulcherrima* törzs mintázatától. A különbséget alátámasztja, hogy a 11-es törzs szekvenálással *Metschnikowia rubicola*-ként lett azonosítva, továbbá a minták mikroszkópos képei is eltérőek voltak. A RAPD vizsgálatoknál már nem láttunk ennyire egyértelmű különbséget, így a RAPD vizsgálatokat érdemes lenne megismételni a kérdéses törzsek esetében a nehéz reprodukálhatóság ellenére is, esetleg újabb primereket is bevonva a vizsgálatba. A RAPD vizsgálat ismétlésén felül megfontolandó lehet a mintákat pl. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) módszerrel vizsgálni, amely egy gyakran használt módszer élesztők tipizálására és reprodukálhatóbb, mint a RAPD.

A másik *M. pulcherrima*-tól eltérő csoportot a 10-es, 13-as és 14-es minták alkották. A 10-es mintáról előzetesen ismert volt, hogy *H. uvarum*, de a vizsgálatok során további két törzs is hozzá hasonló eredményeket adott. A 13-as törzs esetében a MALDI-TOF-MS azonosítás eredményével szemben várható volt, hogy a törzs máshogyan fog viselkedni a molekuláris biológiai vizsgálatok során, mivel a mikroszkópos képe, és a fejlődött telepek színe is krémszínű volt, szemben a *Metschnikowia* nemzetség pulcherrimin termelő törzseire jellemző rózsaszínes-vöröses-barnás színre. A 13-as minta esetében érdemes lenne ismételt elvégezni a MALDI-TOF-MS vizsgálatot. Egyfelől a MALDI-TOF-MS vizsgálat azonosítási pontszáma (score érték) nem ismert, és 1,7-es érték alatt az azonosítás nem megbízható, továbbá a bor és környezeti élesztők esetében a MALDI adatbázisok nem tartalmaznak annyi törzset, mint a patogén élesztők esetében, így ha az adott élesztő nem szerepel a készülék adatbázisában az vezethet téves azonosításhoz is. A 14-es minta esetében, a telepek színe és a mikroszkópos kép is a *M. pulcherrima* törzsre jellemző volt. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a tenyészetben keverten szerepelhettek *Metschnikowia* és *Hanseniaspora* törzsek, mivel mindkettő nemzetség

törzsei természetesen előfordulhatnak a szőlő felületén. Munkám megkezdése előtt minden átadott törzset újra kihúztam tápagaron, és egy különálló telepől ferde agaros tenyészetet hoztam létre, így lehetséges, hogy a kevert tenyészetből a *Hanseniaspora* sp. izolátumot vittem tovább, és ezzel dolgoztam. Javasolt tehát a 14-es izolátummal minden vizsgálatot (morfológia, MALDI-TOF-MS és molekuláris vizsgálatok) megismételni annak érdekében, hogy a törzset megbízhatóan azonosítani lehessen.

6. Összefoglalás

Diplomamunkám során:

1. A molekuláris jellemzésre átadott 16 törzsből sikeres DNS izolálást végeztem, a minták DNS koncentrációja és tisztasága alapján megfeleltek a további PCR-es vizsgálatokhoz
2. A 26S rDNS D1-D2 domén esetén ARDRA módszerrel három restriktív enzim alkalmazásával megállapítottam a taxonómiai, fajsztípusú különbségeket a vizsgált törzsek között. Az eredmények összhangban voltak az előzetes vizsgálatokkal (MALDI-TOF-MS, mikroszkópos vizsgálata, telepmorfológia), továbbá megerősítést nyert a *M. pulcherrima* faj genetikai sokfélesége, minthogy a kapott mintázatok alapján a fajon belüli alcsoportokat tudtam elkülöníteni. A *M. pulcherrima* rDNS szekvenciák fajon belüli különbségeit más kutatásokban is tapasztalták.
3. RAPD módszerrel vizsgáltam a fajokon belüli polimorfizmust és meghatároztam a fő klasztereket. A RAPD mintázatok ugyanakkor megmutatták, hogy a *M. pulcherrima*-ként azonosított izolátumok egyedi, egymástól eltérő törzsek. Ez összhangban az irodalomban leírt eredményekkel.

Dolgozatom alapján megállapítható, hogy a szőlők felületéről izolált *M. pulcherrima* élesztők faji szintű identifikálása során, habár a MALDI-TOF-MS azonosítás megbízható eredményeket tud adni, azonban emellett mindenképpen érdemes molekuláris biológiai módszerekkel is jellemezni a törzseket, főleg amennyiben az előzetes vizsgálatok (mikroszkópos vizsgálat, telepmorfológia) eltérést mutatnak a minták között. Az eredmények alapján jól látszik, hogy a törzsek örökítőanyagának molekuláris technikákkal kapott mintázatai a legapróbb, akár törzsszintű különbségeket is képesek feltárni.

7. Irodalomjegyzék

Abeln, F. – Chuck, C.J. (2020): The role of temperature, pH and nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *J Chem Technol Biotechnol* 95(4):1163–1172.

Abeln, F. – Fan, J. – Budarin, V.L. – Briers, H. – Parsons, S. – Allen, M.J. – Henk, D.A. -Clark, J. – Chuck, C.J. (2019): Lipid production through the single step microwave hydrolysis of macroalgae using the oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Algal Res* 38:101411. DOI:10.1016/j.algal.2019.101411

Abeln, F. – Hicks, R.H. – Auta, H. - Moreno-Beltran, M. – Longanesi, L. – Henk, D.A. Chuck, C.J. (2020): Semi-continuous pilot-scale microbial oil production with *Metschnikowia pulcherrima* on starch hydrolysate. *Biotechnol Biofuels* 13:127. DOI10.1186/s13068-020-01756-2

Abomohra, AE.-F. – Wang, Q. – Huang, J. - Saad-Allah, K.M. (2021): A sustainable approach for bioconversion of food and lignocellulosic wastes into liquid biofuel using a new isolate. *Int J Energy Res* 45(2):3430–3441. DOI:10.1002/er.6028

Aquilani, B. – Laureti, T. – Poponi, S. – Secondi, L. (2015): Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: an exploratory study of consumer preferences. *Food Qual Prefer* 41:214–224

Ascher, B. (2012): *Global beer—the road to monopoly*. American Antitrust Institute, Washington.

Awuor, J.A. (2024): Characterization and antagonistic activity of yeast and bacteria isolated from fruits. Diploma thesis, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem.

Barnett, J.A. - Payne, R.W. - Yarrow, D. (2000): *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK.

Bellido, G.G. - Scanlon, M.G. - Page, J.H. (2009): Measurement of Dough Specific Volume in Chemically Leavened Dough Systems. *J. Cereal Sci.*, 49, 212–218.

Boscaino, F. - Ionata, E. - La Cara, F. – Guerriero, S. – Marcolongo, L. – Sorrentino, A. (2019): Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia fructicola* autochthonous

mixed starter on Aglianico wine volatile compounds. *J Food Sci Technol* 56(11):4982– 4991. DOI:10.1007/s13197-019-03970-9

Budroni, M., Zara, G. – Ciani, M. – Comitini, F. (2017): In: Kanauchi M (ed) *Brewing Technology*. Rijeka, InTech DOI:10.5772/intechopen.68792

Bühlmann, A. – Kammerecker, S. – Müller, L. - Hilber-Bodmer, M. - Perren, S. - Freimoser F.M. (2021): Stability of dry and liquid *Metschnikowia pulcherrima* formulations for biocontrol applications against apple postharvest diseases. *Horticulturae* 7(11):459

Canonico, L. - Agarbati, A. – Galli, E. – Comitini, F. – Ciani, M. (2023): *Metschnikowia pulcherrima* as biocontrol agent and wine aroma enhancer in combination with a native *Saccharomyces cerevisiae*. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114758

Collinge, D. B. - Jensen, D. F. - Rabiey, M. - Sarrocco, S. - Shaw, M. W. - Shaw, R. H. (2022): Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? *Plant Pathology*, 71(5), 1024–1047. DOI:10.1111/ppa.13555

Cook, A.H. - Slater, C.A. (1956): The structure of pulcherrimin. *J. Chem. Soc.*, 4133–4135.

Eilenberg, J. - Hajek, A., - Lomer, C. (2001): Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387–400. DOI: 10. 1023/A: 1014193329 979

Einfalt, D. (2021): Barley-sorghum craft beer production with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains, *European Food Research and Technology* (2021) 247:385–393. DOI:10.1007/s00217-020-03632-7

Freimoser, F. M. - Rueda-Mejia, M. P. – Tilocca, B. – Migheli, Q. (2019): Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35:154. DOI:10.1007/s11274-019-2728-4

Galli, M. - Feldmann, F. - Vogler, U. K. - Kogel, K.-H. (2024): Can biocontrol be the game-changer in integrated pest management? A review of definitions, methods and strategies. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(2), 265–291. DOI: 10.1007/s41348-024-00878-

- Gómez-Corona, C. - Escalona-Buendía, H.B. – García, M. – Chollet, S. – Valentin, D. (2016): Craft vs. industrial: habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite* 96:358–367
- Haniffadli, A. – Ban, Y. – Rahmat, E. - Kang, C. H. - Kang, Y. (2024): Unforeseen current and future benefits of uncommon yeast: the Metschnikowia genus. *Applied Microbiology and Biotechnology* 108:534. DOI:0.1007/s00253-024-13369-y
- Hu, Y. - Zhang, J. - Wang, S. - Liu, Y. - Li, L. - Gao, M. (2022): Lactic Acid Bacteria Synergistic Fermentation Affects the Flavor and Texture of Bread. *J. Food Sci.*, 87, 1823–1836.
- IBMA (2023): *2023 IBMA Member Survey: European Biocontrol Market Information*. International Biocontrol Manufacturers Association. - https://www.ibma-da.org/wp-content/uploads/2024/07/2023-IBMA-Member-Survey_Condensed-4.16.24-1.pdf
- Internet 1 - Animal and Plant Health Inspection Service U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE - [Biological Control Program | Animal and Plant Health Inspection Service](#)
- Janisiewicz, W. J. - Korsten, L. (2002): Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 411–441.
- Jolly, N.P. - Varela, C. - Pretorius, I.S. (2014): Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *J. Fems. Yeast Res.*14, 215–237.
- Kántor A. - Hutková J. - Petrová J. - Hleba L. - Kačániová M. (2015): Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2015, 5: 282–285.
- Kelanne, N. – Yang, B. – Liljenback, L. – Laaksonen, O. (2020): Phenolic compound profiles in alcoholic black currant beverages produced by fermentation with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *J Agric Food Chem* 68(37):10128–10141. DOI 10.1021/acs.jafc.0c03354
- Klimczak, K. - Cioch-Skoneczny, M. – Ciosek, A. – Poreda, A. (2024): Application of Non-Saccharomyces Yeast for the Production of Low-Alcohol Beer. Department of Fermentation

Technology and Microbiology, University of Agriculture in Kraków, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, Poland. *Foods* 2024, 13(20), 3214; DOI:10.3390/foods13203214

Kregiel, D. - Czarnecka-Chrebelska, K. H. - Schusterova, H. - Vadkertiova, R. - Nowak, A. (2023): The *Metschnikowia pulcherrima* clade as a model for assessing inhibition of *Candida* spp. and the toxicity of its metabolite, pulcherrimin. *Molecules* 28(13). DOI: 10.3390/molecules28135064

Kurtzman, C. - Fell, J.W. - Boekhout, T. (2011): *The Yeasts: A Taxonomic Study*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands; ISBN 97804444521491.

Kurtzman, C.P. - Robnett, C.J. - Basehoar, E. - Ward, T.J. (2018): Four new species of *Metschnikowia* and the transfer of seven *Candida* species to *Metschnikowia* and *Clavispora* as new combinations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 2017–2035.

Lachance, M.A. (2016): *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast* 33(11):563–574. DOI: 10.1002/yea.3208

Leiva-Candia, D.E. – Pinzi, S. - Redel-Macías, M.D. – Koutinas, A. - Webb, C. - Dorado, M.P. (2014): The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel* 123:33–42. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.01.054

Liu, J. - Sui, Y. - Wisniewski, M. - Droby, S. - Liu, Y. (2013): Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.*, 167, 153–160.

Liu, J. - Wisniewski, M. - Droby, S. - Tian, S. - Hershkovitz, V. – Tworkoski (2011): T. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 76, 145–155.

Liu, J.- Arneborg, N. - Toldam-Andersen, T.B. - Petersen, M.A. - Bredie, W.L. (2017): Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 3594–3602.

Mendonca-Hagler, L.C. - Hagler, A.N. - Kurtzman, C.P. (1993): Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 368–373.

Millan, A. F.-S. – Gamir, J. – Farran, I. – Larraya, L. – Veramendi, J. (2022): Identification of new antifungal metabolites produced by the yeast *Metschnikowia pulcherrima* involved in the

biocontrol of postharvest plant pathogenic fungi. *Postharvest Biol Technol* 192. DOI:10.1016/j.postharvbio.2022.111995

Morata, A. - Loira, I. - Escott, C. - del Fresno, J.M. - Bañuelos, M.A. - Suárez-Lepe, J.A. (2019): Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation*, 5, 63.

Mycobank Database: <https://www.mycobank.org/>

Nunes, C.A. (2012): Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.*, 133, 181–196.

Oro, L. - Ciani, M. - Comitini, F. (2014): Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, 116, 1209–1217.

Pal, K. K. - Scholar, V. F. - Gardener, B. B. M. (2006): Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2(5), 1117–1142.

Pawlikowska, E. – Kregiel, D. (2017): Non-conventional yeast *Metschnikowia pulcherrima* and its application in biotechnology, *POST. MIKROBIOL.*, 2017, 56, 4, 405–415, DOI: 10.21307/PM-2017.56.4.405

Puyo, M. – Mas, P. - Roullier-Gall, C. – Romanet, R. – Lebleux, M. – Klein, G. – Alexandre, H. - Tourdot-Maréchal, R. (2023): Bioprotection efficiency of *Metschnikowia* strains in synthetic must: comparative study and metabolomic investigation of the mechanisms involved. *Foods* 12(21):3927. DOI:10.3390/foods12213927

Rahmat, E. – Yu, J.S. - Lee, B.S. - Lee, J. – Ban, Y. – Yim, N.H. - Park, J.H. – Kang, C.H. – Kim, K.H. – Kang, Y. (2024): Secondary metabolites and transcriptomic analysis of novel pulcherrimin producer *Metschnikowia persimmonesis* KIOM G15050: a potent and safe food biocontrol agent. *Heliyon* 10(7):e28464. DOI:10.1016

Rahmat, E. -Kang, Y. M. (2020): Yeast metabolic engineering for the production of pharmaceutically important secondary metabolites, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 4659–4674.

Robin, D. C. - Marchand, P. A. (2019): Evolution of the biocontrol active substances in the framework of the European pesticide regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Management Science*, 75(4), 950–958. DOI: 10.1002/ ps. 5199

Sharma, R. R. - Singh, D. - Singh R. (2009): Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, Volume 50, Issue 3, September 2009, Pages 205-221. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.05.001

Sipiczki, M. (2006): *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6716–6724.

Sipiczki, M. (2020): *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms* 8(7):1029. DOI:10.3390/microorganisms8071029

Sipiczki, M. - Czentye, K. - Kállai, Z. (2024): High intragenomic, intergenomic, and phenotypic diversity in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeasts indicates a special mode of genome evolution. *Scientific Reports*, 14, 10521. DOI:10.1038/s41598-024-61335-5

Stenberg, J. - Sundh, I. - Becher, P. - Björkman, C. - Dubey, M. - Egan, P. - Viketoft, M. (2021): When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94. DOI: 10.1007/s10340-021-01354-7

Vicente, J. – Ruiz, J. - Belda, I. - Benito-Vazquez, I. - Marquina, D. – Calderon, F. – Santos, A. – Benito, S. (2020): The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms* 8(7). DOI: 10.3390/microorganisms8071038

Williams, M.E.P. – Knox O.G.G – Forsyth L.M. (2025): Biological control agents: the importance for specific and targeted screening techniques to enable their effective and successful implementation, *Eur J Plant Pathol* (2025) 172:713–728, DOI: 10.1007/s10658-025-03035-y

Wilson, C.L. - Wisniewski, M.E. (1989): Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 27, 425–441.

Wisniewski, M. - Wilson, C. - Droby, S. - Chalutz, E. - El-Ghaouth A. – Stevens C. (2007): Postharvest biocontrol: new concepts and applications. *Biological control: a global perspective*, 262-273. DOI: 10.1079/9781845932657.0262

Yuan, S. – Yong, X. – Zhao, T. – Li, Y. – Liu, J. (2020): Research progress of the biosynthesis of natural bio-antibacterial agent pulcherriminic acid in *Bacillus*. *Molecules* 25(23). DOI:10.3390/molecules25235611

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. *Front. Microbiol.*, 9, 2303.

Zhang, H. – Wang, S. - Deng, Q. – Zhang, X. – Liao, B. - Huang, J. – Zeng, K. (2023): The effect of pulcherriminic acid produced by *Metschnikowia citriensis* in controlling postharvest diseases of citrus fruits. *Pestic Biochem Physiol* 197:105657. DOI:10.1016/j.pestbp.2023.105657

Zhang, X. – Li, B. – Zhang, Z. – Chen, Y. – Tian, S. (2020): Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. *Journal of Fungi*

8. Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Repka Péter György
A Hallgató Neptun kódja:	YCPRUF
A dolgozat címe:	A Metschnikowia nemzetségbe tartozó antagonistá élesztőtörzsek molekuláris jellemzése
A megjelenés éve:	2025
A konzulens intézetének neve:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitóri rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitóri rendszerében.

Kelt: 2025. 10. 29.


Hálgató aláírása

NYILATKOZAT

Reyka Péter (név) (hallgató Neptun azonosítója: YCP2AF)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő
védésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem³

Kelt: Budapest, 2025 év október hó _30. nap

Pavlovics Anikó
belső konzulens

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	Repka Péter György
Neptun-kódja:	YCPRUF
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	<input type="checkbox"/> BSc/BA <input checked="" type="checkbox"/> MSc/MA <input type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb:
Tantárgy neve/kódja*:	—
A munka címe:	A Metschnikowia nemzetségbe tartozó antagonistá élesztőtörzsek molekuláris jellemzése

* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

- A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.
(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)
- B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.
(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztens vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrektúra, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
Tudományos cikkek keresése	ChatGPT-5	—

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve, verziója, elérhetősége	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-napiót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma
—	—	—	—

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

.....

.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: Budapest, 2025. október. 29.



Hallgató aláírása



Konzulens/Témavezető aláírása