

MTA Doktori értekezés

Élesztőgombák jelentősége az élelmiszeriparban, régi és új
fajok

Péter Gábor

Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,
Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Köszönetnyilvánítás	7
Bevezetés.....	9
Irodalmi áttekintés	13
Az élesztőgombák élelmiszeripari jelentősége	13
Erjesztett élelmiszerek és italok előállítása élesztőgombák segítségével.....	13
Élelmiszer-összetevők és adalékok előállítása élesztőgombák felhasználásával.....	19
Biológiai védekezés az élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusok ellen élesztőgombák segítségével	20
Probiotikus és bioterápiás hatású élesztőgombák.....	21
Az élesztőgombák, mint élelmiszerek és italok romlásának előidézői.....	21
Élesztőgombák, mint élelmiszer allergének forrásai.....	23
Opportunista patogén élesztőgombák az élelmiszerekben	23
Az élesztőgombák fogalma, helyük a gombák között és biodiverzitásuk	24
Az élesztőgombák rendszertana	28
Az élesztőgombák rendszertani azonosítása és új fajok leírása.....	29
Az élesztőgombák nevezéktana	32
Az élesztőgombák osztályozása.....	34
Néhány kiemelkedő élelmiszeripari jelentőségű élesztőgomba csoport.....	37
A kutatások célkitűzései	41
Anyagok és módszerek	43
Mintagyűjtés és az élesztőgombák izolálása	43
<i>Saccharomyces</i> törzsek izolálása szőlőről	46
Élesztőgombák izolálása olívaolajból és olívaolaj üledékből.....	46
<i>Yarrowia</i> törzsek izolálása	48
Metanol-asszimiláló élesztőgombák izolálása.....	49
Az élesztőgombák fenotípusos jellemzése és rendszertani azonosítása	50
Az élesztőgombák fenotípusos jellemzése.....	50
Az élesztőgombák rendszertani azonosítása.....	52
Filogenetikai elemzés	55
Eredmények és megvitatásuk.....	59
<i>Saccharomyces</i> törzsek izolálása szőlőről	59
Az olívaolaj, mint új élesztőgomba élőhely feltárása	61

Néhány új <i>Yarrowia</i> faj és potenciális szerepük az élelmiszeriparban.....	83
Új metanol-asszimiláló élesztőgomba fajok.....	95
Fanedvekből (exudátumokból) izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák.....	96
Korhadt faanyagokról izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák.....	97
Levelekről izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák	99
<i>Komagataella pseudopastoris</i>	100
Új fajok a <i>Kuraishia</i> nemzetségben	102
Új fajok az <i>Ogataea</i> -kládban	104
Két új obligát ozmofil élesztőgomba faj élelmiszerekről.....	112
<i>Zygosaccharomyces favi</i> – a második ismert obligát ozmofil élesztőgomba faj mézből és méhkenyérből	112
<i>Schizosaccharomyces osmophilus</i> – egy hasadó obligát ozmofil élesztőgomba.....	116
<i>Metschnikowia viticola</i> – egy új élesztőgomba faj szőlőről	118
<i>Pichia sporocuriosa</i> – egy egyedülálló askospóra morfológiával rendelkező új élesztőgomba faj rambutánról	122
<i>Cutaneotrichosporon suis</i> – egy lipolitikus aktivitással rendelkező új bazídiumos élesztőgomba faj	125
Új tudományos eredmények.....	129
Összefoglalás	135
Summary	139
Irodalomjegyzék	143
Függelék	161

Rövidítések jegyzéke

Az értekezésben használt nemzetség nevek rövidítései

<i>B.</i>	<i>Brettanomyces</i>
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
<i>Cr.</i>	<i>Cryptococcus</i>
<i>Cut.</i>	<i>Cutaneotrichosporon</i>
<i>Cyb.</i>	<i>Cyberlindnera</i>
<i>D.</i>	<i>Debaryomyces</i>
<i>E.</i>	<i>Eremothecium</i>
<i>H.</i>	<i>Hanseniaspora</i>
<i>K.</i>	<i>Komagataella</i>
<i>Ku.</i>	<i>Kuraishia</i>
<i>L.</i>	<i>Lachancea</i>
<i>M.</i>	<i>Metschnikowia</i>
<i>N.</i>	<i>Nakazawaea</i>
<i>O.</i>	<i>Ogataea</i>
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
<i>Ps.</i>	<i>Pseudophaeomoniella</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sch.</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Sta.</i>	<i>Starmerella</i>
<i>Schw.</i>	<i>Schwanniomyces</i>
<i>T.</i>	<i>Torulaspora</i>
<i>Y.</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>Z.</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>

Az értekezésben használt egyéb rövidítések

AFLP	amplified fragment length polymorphism (amplifikált fragmentum hossz polimorfizmus)
BLAST	basic local alignment search tool
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures (jelenleg Westerdijk Fungal Biodiversity Institute)
CUA	Christensen's urea agar
D1/D2 régió	a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiója
Indel	inszerció/delécio
ITS	internal transcribed spacer
MIMNG	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye
NCAIM	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
rRNS	riboszómális RNS
rDNS	a riboszómális RNS-t kódoló gén
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA (véletlenszerűen megsokszorozott DNS sokféleség)
URB	„Urea Rapid Broth”
tke	telepképző egység
YNB	„Yeast Nitrogen Base”

Köszönetnyilvánítás

A szakmai munkámat az elmúlt bő három évtized során segítő számtalan embernek egyformán hálás vagyok, név szerint csak néhányat emelek ki közülük.

Köszönetem fejezem ki Dobolyi Csabának, aki bevezetett az élesztőgombák csodálatos világába, Novák Ervin Károlynak, Cletus P. Kurtzmannak és Marc-André Lachance-nak, akikhez bármilyen mikológiai problémával fordulhattam.

A Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye valamennyi munkatársának hálával tartozom. Dlauchy Dénes a molekuláris biológiai vizsgálatokban és a filogenetikai elemzésekben nyújtott felbecsülhetetlen segítséget, Lehóckiné Tornai Judit, és amíg tehette Deák Tibor is folyamatosan támogatta munkámat. A Törzsgyűjtemény technikusaira, akik közül Bétéri Gyulánának külön köszönettel tartozom, szintén mindig számíthattam munkám során.

Köszönettel tartozom Nagy Edina Szandra PhD hallgatónak, aki nagymértékben járult hozzá a *Yarrowia* nemzetség biodiverzitásának feltárásához egyes élelmiszerekben, valamint a több mint 80 társszerzőnek, akik közül név szerint is kiemelem Neža Čadež-t, akire mindig számíthattam és számíthatok a szakmai problémák megoldásában.

Az értekezés elkészítése során nyújtott támogatásért hálával tartozom Halász Annának.

Köszönetemet fejezem ki Szűcs Erzsébetnek a munkám során felhasznált szőlő minták begyűjtéséért, Tóth Gusztávnak (Igazioliva Olívaolaj-szaküzlet, Pomáz) az olívaolaj, Neža Čadežnek pedig az olívaolaj üledék minták biztosításáért, Csillag Ferencnének és Nagy Barbarának (Szent István Egyetem, Budai Campus, Központi Laboratórium) a transzmissziós elektronmikroszkópos fotók elkészítéséért, Alfred Bothanak (University of Stellenbosch) a protiszták aktivitásának visszaszorítására alkalmas módszer megosztásáért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, hogy támogattak és elviselték a munkámmal járó negatív mellékhatásokat.

Budapest, 2020. február

Péter Gábor

Bevezetés

Az élesztőgombákat az emberiség – eleinte természetesen tudtán kívül - mintegy 5000 éve használja kenyér, sör, bor és egyéb élelmiszerek és italok előállítására. Leeuwenhoek (XVII. század), Pasteur, Hansen (XIX. Század), Guilliermond, Kluyver (XX. század) és mások, részben egymásra épülő munkásságának köszönhetően nyilvánvalóvá vált, hogy az élesztőgombák alapvető szerepet töltenek be az élelmiszerek és italok előállításában (Rose és Harrison, 1969; Fleet, 2006). Ínséges időkben, pl. a II. világháború alatt az élesztőgomba közvetlen humán táplálkozásban való alkalmazására is történtek próbálkozások. Németországban a mosott, szárított sörélesztőt már az 1910-es évektől használták emberi fogyasztásra (Halász és Lásztity, 1991). Bár a sörélesztőt elsősorban takarmányozási célra használják fehérje, B vitamin és ásványi anyag tartalma miatt, az emberi táplálkozásban történő felhasználási lehetőséget is magában hordozza. Ezt a lehetőséget napjainkban egyre nagyobb mértékben használja ki az élelmiszeripar a szeparált sörélesztő funkcionális élelmiszer adalékanyagként történő felhasználása révén (Halász és Lásztity, 1991; Rakowska és mtsai, 2017, Hittinger és mtsai, 2018). Az élesztőgombáknak az élelmiszeriparban betöltött lehetséges szerepét Fleet (2006) nyomán az alábbi csoportokba sorolhatjuk:

- Erjesztett élelmiszerek és italok előállítása
- Élelmiszer-összetevők és adalékanyagok előállítása
- Biológiai védekezés a romlást okozó mikroorganizmusok ellen
- Probiotikus és bioterápiás hatás
- Élelmiszerek és italok romlásának előidézése
- Élelmiszer allergének forrásai
- Az élelmiszerek élesztőgomba biótája opportunistá patogén élesztőgombák forrása

Az élelmiszeripari jelentőségű élesztőgombákkal kapcsolatos hazai kutatások közül érdemes kiemelni Deák Tibor munkásságát, amelynek egyik fő területe az élesztőgombáknak az élelmiszerek romlásában betöltött szerepének vizsgálata volt (pl. Deák és Beuchat, 1996, Deák 2008a).

Az élesztőgombák száma viszonylag csekély az összes ismert gombához viszonyítva. Hawksworth (2001) szerint az ismert gombafajok száma 74 000 és 120 000 közé tehető. A „The dictionary of the fungi” 10. Kiadása (Kirk és mtsai, 2008) 97 330 leírt gombafajt említ. A legutóbb megjelent élesztőgomba monográfia, a *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5. kiadása (Kurtzman és mtsai, 2011a) kevesebb, mint 1 500 élesztőgomba fajt tárgyal, bár a tudomány számára új fajok leírásának felgyorsult üteme és a monográfia hosszú átfutási ideje miatt, már megjelenése pillanatában sem volt teljesen naprakész. Az ismert élesztőgomba fajok száma jelenleg már körülbelül 2 000-re becsülhető.

A mai élelmiszeripari eljárásokhoz alkalmazott, tudatosan javított tulajdonságokra szelektált élesztőgombákat a kor követelményeinek megfelelő módszerekkel kell jellemezni és azonosítani. Az erre alkalmas technikák egy részét az értekezésemben is bemutatom. Az új, elsősorban DNS alapú, technikák az élesztőgomba törzsek minden korábbinál pontosabb és gyorsabb rendszertani azonosítását teszik lehetővé. A korszerű, molekuláris biológiai módszerek alkalmazását gyakran élelmiszer-biztonsági szempontok is indokolják és a földrajzi eredetvizsgálat során is megkövetelik. A genom szekvenciák elemzése kiváló lehetőséget biztosít az egyes élesztőgomba törzsek eredet igazolására, szélesebb körű elterjedéséig azonban elsősorban különböző törzs specifikus vagy részben törzs specifikus DNS ujjlenyomat technikákat alkalmaznak erre a célra. Ilyenek pl. a mitokondriális DNS restrikciós enzim analízise, a RAPD analízis, a mikroszatellit PCR, a transzpozonok δ -elemeit vagy az intronok splicing-helyeit célzó indítószekvenciák alkalmazásával felszaporított PCR termékek összehasonlítása valamint az AFLP analízis (Fernandez-Espinar és mtsai, 2001; Guillamón és Barrio, 2017). A törzsgyűjtemények az ismert eredetű, egyre részletesebben jellemzett mikroorganizmusok tárházai. A törzsgyűjteményekből származó ellenőrzött genetikai erőforrások, köztük élesztőgombák, felhasználhatók közvetlenül az élelmiszerek előállításához vagy törzsnemesítés és törzsszelekció alapanyagát képezhetik. Amennyiben a törzsek jellemzése technológiai szempontból jelentős tulajdonságaikra is kiterjed, akkor sokszor megjósolható egyes élelmiszerek és italok előállítása során kifejtett hatásuk is. Így például a szaharomiceszek erjesztő- és aroma anyag termelő képessége, alkoholtűrése és kompetíció képessége előre vetíti a borok minőségére gyakorolt hatásukat. A mikroorganizmusoknak, köztük az élesztőgombáknak, a biogén amin termelésre való képessége (dekarboxiláz aktivitás) vagy annak hiánya (Halász és mtsai, 1994), illetve a biogén aminok képzését elősegítő körülmények megteremtésének képessége, például proteolitikus aktivitás révén (Groenewald és mtsai, 2013), az élelmiszer-biztonságra gyakorolt

várható hatásuk megjósolását teszi lehetővé. Az élesztőgombák lipolitikus aktivitása a nagy zsír- vagy olaj tartalmú élelmiszerek, mint pl. az olívaolaj romlásának előidézésére való képességüket valószínűsíti.

A Biológiai Sokféleség Egyezmény (Riói Egyezmény) értelmében minden Szerződő fél „megteremti és fenntartja a növények, állatok és mikroorganizmusok *ex-situ* megőrzésének, valamint kutatásának feltételeit, elsősorban a genetikai források származási országaiban” (Biológiai Sokféleség Egyezmény, 1992). Ezzel összhangban a mikrobiális génállomány *ex-situ* megőrzését, melyben kiemelkedő szerepet töltenek be a nemzeti törzsgyűjtemények, a világ számos országa, köztük hazánk, is támogatja. A törzsgyűjtemények a mikrobiális génállomány megőrzése mellett sokszor jelentős szerepet töltenek be a mikroorganizmusok biológiai sokféleségének (biodiverzitásának) feltárásában és a rendszertani kutatásokban is. Nincs ez másként a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (MIMNG) esetén sem. A MIMNG kutatói az utóbbi bő két évtizedben jelentős mértékben hozzájárultak a természetes és mesterséges, ember alkotta élőhelyek, ide értve az élelmiszerek, élesztőgomba biodiverzitásának feltárásához, valamint az élesztőgomba rendszertan fejlődéséhez. Munkánk során eddig három új élesztőgomba nemzetség és 44 új faj leírásában vettünk részt. Eredményeink rávilágítottak arra a tényre, hogy még a viszonylag behatóan vizsgált élelmiszerek, illetve élelmiszer alapanyagok is eddig ismeretlen élesztőgombákat rejthetnek. Megfelelő izolálási eljárásokat és korszerű, DNS alapú rendszertani azonosítási módszereket alkalmazva egyre pontosabb képet nyerhetünk az élelmiszerek élesztőgomba közösségeiről. Számos olyan élesztőgomba is ismert, amelyek ugyan nem élelmiszerekből származnak, de biológiai aktivitásuk vagy az általuk termelt egyes anyagcsere termékek révén szerepük lehet az élelmiszerek előállítása során. Az értekezésben elsősorban azon eredményeink ismertetésére szorítkozom, amelyek a fent felsorolt szempontok szerint potenciális élelmiszeripari jelentőséggel bírnak.

Irodalmi áttekintés

Az élesztőgombák élelmiszeripari jelentősége

Az élesztőgombák az ember által legkorábban házasított szervezetek közé tartoznak (Vaughan-Martini és Martini, 1995). Gyakorlati jelentőségük messze meghaladja a gombákon belüli számarányukat (Deák 1998). Az új kőkorszak (neolit) óta használja őket az ember élelmiszerek és italok előállítására (Dequin, 2001). Élelmiszeripari jelentőségük nem korlátozódik az élelmiszerek előállítására, hanem a teljes élelmiszer-ellátási lánc mentén kifejthetik az élelmiszerek minősége szempontjából hasznos vagy káros hatásukat. A terjedelmi korlátok miatt szerteágazó szerepük csak igen tömör áttekintésére nyílik mód. Kissé részletesebben csupán azokra a területekre térek ki, amelyek az értekezésben ismertetett kutatási eredményeinkkel szorosabb kapcsolatban állnak.

Erjesztett élelmiszerek és italok előállítása élesztőgombák segítségével

Az erjesztett élelmiszerek és italok előállítására felhasznált mikroorganizmusok közül kétségtelenül az élesztőgombák a legjelentősebbek. Az erjesztési folyamat során az élesztőgombák módosítják az alapanyagok érzékszervi és fizikai tulajdonságait, valamint táplálkozási értékét. A fejlődő országokban az élelmiszerek erjesztése alapvetően hozzájárul az élelmiszer-biztonsághoz (Romano és mtsai, 2006). Tamang és Kailasapathy (2010), valamint Tamang és mtsai (2016) igen részletes áttekintést adnak az erjesztett élelmiszerekről és italokról. Különösen Ázsiában készítenek sokféle, a nyugati világban gyakran alig ismert erjesztett élelmiszert és italt. Tamang és Kailasapathy (2010) csak az erjesztett alkoholos italoknak 10 csoportját különbözteti meg, a felhasznált alapanyagok és a termék előállítása során alkalmazott technológiák alapján. Az erjesztett élelmiszerekből, italokból és kevert starterekből a következő élesztőgomba nemzetségek előfordulásáról számolnak be: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia* és *Zygosaccharomyces* (Tamang és mtsai, 2016).

Az élesztőgombáknak a kenyér, a bor és a sör előállításában játszott szerepe a legismertebb, de számos egyéb élelmiszer, mint például egyes sajtok és erjesztett tejtermékek,

fermentált kolbászok, szalámik valamint egyéb alkohol tartalmú italok készítésekor is felhasználásra kerülnek. Az élesztőgombák élelmiszeriparban betöltött gazdasági jelentősége túlszárnyalja egyéb kereskedelmi célú felhasználásuk jelentőségét (Abbas, 2006). Az élesztőgombák, élesztőgomba kivonatok, autolizátumok és az egyéb élesztőgombából készült termékek világpiaci forgalma 2016-ban meghaladta 7 milliárd dollárt és 2022-re 10 milliárd dollárt meghaladó forgalmat prognosztizálnak (Globe Newswire, 2017. Szept. 05).

A borkészítés, az emberiség évezredek óta virágzó tevékenységei közé tartozik. Feljegyzések alapján időszámításunk előtt 5000-ben Egyiptomban és Föníciában már spontán erjesztéssel bort készítettek, de a történészek szerint a borkészítés valószínűleg ennél is sokkal régebbi múltra tekint vissza (Verstrepen és mtsai, 2006). Egyiptomi bortartó edényekből felszaporított rDNS bázissorrendje alapján valószínűsíthető, hogy Egyiptomban már legalább időszámításunk előtt 3150-ben *S. cerevisiae*-vel erjesztették a bort (Cavaliere és mtsai, 2003). Spontán erjesztés esetén a must erjedését általában *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* és *Metschnikowia* törzsek indítják be, majd néhány nap után, amikor az erjedő must alkohol tartalma eléri az 5-7%-ot, a nagyobb erjesztő képességű és nagyobb etanol-toleranciával rendelkező *Saccharomyces*, leggyakrabban *S. cerevisiae*, törzsek válnak dominánssá és veszik át az erjesztés irányítását (pl. Fleet & Heard, 1993; Fleet, 2003; Romano és mtsai, 2006, Bagheri és mtsai, 2017). Arra is fény derült, hogy több *S. cerevisiae* törzs is részt vehet az erjesztésben (pl. Querol és mtsai 1992; 1994; Schütz és Gafner, 1993; Valero és mtsai, 2007) és valamennyi hozzájárul a bor minőségének kialakításához (Lurton és mtsai, 1995). A bornak, a szőlő fajtára jellemző, végső bukéja az erjesztés és az aroma anyagoknak a bor érlelése során végbemenő átalakulása eredményeként jön létre. Az aroma anyagok zöme az erjesztés során alakul ki és a több mint 1000 azonosított illó komponens közül több mint 400-at az élesztőgombák termelnek (Romano és mtsai, 2006). A szőlő és a bor mikroba közösségeit, köztük az élesztőgombákat és a tejsavbaktériumokat, a bor aromáját és a fogyasztók általi fogadtatását befolyásoló döntő tényezőnek tekintik (Belda és mtsai, 2017)

Bár a szőlőszemekről a mustba kerülő *Saccharomyces* törzseknek a must erjedésében játszott szerepéről eltérőek a vélemények (Martini, 1993; Vaughan-Martini és Martini, 1995; Martini és mtsai, 1996; Török és mtsai, 1996, Mortimer és Polsinelli, 1999), különböző szerzők egyetértenek abban, hogy a *Saccharomyces* sejtek száma a szőlőszemek felszínén alacsony, 10-100 sejt/cm² (Martini és mtsai, 1996; Fleet és mtsai, 2002). Ennek ellenére, több okból is szükségessé válhat *Saccharomyces* törzsek izolálása szőlőről. Először, amennyiben a

szőlőbogyóról izolált *Saccharomyces* törzsek tiszta tenyészetére rendezhető, a jelenleg elérhető molekuláris biológiai módszerek [pl. mitokondriális DNS restrikciós enzim analízis, RAPD analízis, mikroszatellit PCR, δ -elemek vagy intronok splicing-helyeit célzó indítószekvenciák alkalmazásával felszaporított PCR termékek összehasonlítása, AFLP analízis (Fernandez-Espinar és mtsai, 2001; Guillaumon és Barrio, 2017)] segítségével a törzsek nyomon követhetők a must erjedése során, lehetővé téve a borkészítés ökológiájának mélyrehatóbb megismerését. Másodszor, folyamatosan növekszik az igény az egyes borvidékekhez, azok szőlő fajtáihoz, szőlőművelési gyakorlatához és az alkalmazott borászati technológiákhoz jobban adaptálódott *Saccharomyces* törzsek (helyi vagy „terroir” élesztőgombák) iránt (Pretorius, 2000). A potenciális starter törzsek egyik forrása maga a szőlő (pl. Orlic és mtsai, 2005; Romano és mtsai, 2008; Fleet, 2008).

Jól ismert tény, hogy kis koncentrációjuk miatt, dúsítás nélkül igen nehéz *Saccharomyces* törzseket izolálni szőlőről (pl. Martini, 1993; Vaughan-Martini és Martini, 1995; Martini és mtsai, 1996). A leggyakrabban alkalmazott módszer sokáig az „öndúsítás”, a szőlő laboratóriumi körülmények közötti préselése és a must erjesztése volt, amit hígítás és felületi szélesztés követett (Martini, 1993). Török és mtsai (1996) nagy etanol tartalmú táptalajt alkalmaztak *Saccharomyces*-ek közvetlen izolálására szőlőről, Sniegowski és mtsai (2002) pedig nagy etanol tartalmú táplevesben történő dúsítást követően izoláltak *Saccharomyces* törzseket fakéreg és fánedv mintákból. Mivel a borászati környezetből származó *Saccharomyces* törzsek zöme képes az etanol hasznosítására, az etanol koncentrációja változhat a nagy etanol tartalmú tápközegek alkalmazása során, ezért más elméleti alapon nyugvó szelektív izolálási módszereknek is létjogosultsága lehet. Ezért egy egyszerű, hatékony, nagy metanol tartalmú tápközegben való dúsításon alapuló alternatív módszert írtunk le a *Saccharomyces* törzsek szőlőről való izolálására (Péter és mtsai, 2011a), amely a későbbiekben részletesebben is bemutatásra kerül.

A must erjesztése és a bor érlelése során a korábban említett fajok mellett más élesztőgombák, pl. *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* és *Zygosaccharomyces* fajok is jelen lehetnek, melyek közül egyesek kedvezőtlenül befolyásolhatják a bor érzékszervi tulajdonságait. A *S. pombe*, a *Z. bailii* és a *L. (Zygosaccharomyces) fermentati* kiemelkedő etanol toleranciával rendelkeznek, ugyanakkor az almasav bontására is képesek, amely borászati szempontból fontos tulajdonság (Romano és mtsai, 2006).

A jelenleg a *Starmerella bacillaris* szinonimjának tartott (Mycobank, <http://www.mycobank.org>, hozzáférés 2019/07/28), *C. zemplinina*-ként leírt (Sipiczki, 2003) fajra jellemző, hogy, a *S. cerevisiae*-vel ellentétben, a fruktóz felhasználását részesíti előnyben a glükózzal szemben, és egységnyi cukorból sokkal kisebb mennyiségű etanolt állít elő, mint a *S. cerevisiae* (Magyar és Tóth, 2011). A *C. zemplinina* ozmo- és pszichrotoleráns paratípus törzsei nemesrothadáson keresztülment szőlőből készült erjedő mustból kerültek izolálásra a Tokaji borvidéken (Sipiczki, 2003). Számos tanulmány jelzi a faj borászati jelentőségét. Nyolc élesztőgomba fajt, köztük a *Sta. bacillaris*-t, képviselő törzsekkel történő beoltást követően a *Sta. bacillaris* mindvégig jelen volt a kísérletei must erjesztése során (Bagheri és mtsai, 2017). Englezos és mtsai (2015) fruktofil tulajdonsága, kis alkohol és ecetsav termelő képessége miatt, a *S. cerevisiae*-vel kombinálva, potenciális starternek tartják a *Sta. bacillaris*-t.

A borok egyenletes minőségének biztosítása érdekében a spontán erjesztést egyre nagyobb mértékben váltja fel a starterkultúrák alkalmazása. A starterek alkalmazása minimalizálja az erjesztési hibák előfordulásának a valószínűségét és előre megjósolható minőségű termék előállítását eredményezi (Verstrepen és mtsai, 2006). A felhasznált starterek leggyakrabban egyetlen, borászati szempontból kedvező tulajdonságokkal rendelkező *Saccharomyces* törzset tartalmaznak, de, mivel a világ legjobb borainak előállítása során a nem-*Saccharomyces* élesztők is kisebb-nagyobb szerepet játszanak az erjesztésben, és így hozzájárulnak a bor minőségéhez, terjed a kombinált, a *Saccharomyces* mellett egyéb, nem-*Saccharomyces*, törzset is tartalmazó starterek felhasználása is. A bor minőségére gyakorolt kedvező hatásuk miatt a szaharomiceszek mellett különböző szerzők számos egyéb faj starterkultúráként való felhasználását is javasolták már, közéjük tartozik pl. a fent említett, magyar vonatkozású *C. zemplinina* (*Sta. bacillaris*), a *H. uvarum*, a *M. pulcherrima* és a *T. delbrueckii* (Padilla és mtsai, 2016)

Az elsősorban az angolszász országokban népszerű, almából erjesztett cider előállításának lépései némiképpen hasonlítanak a szőlőből készült bornál leírtakhoz, míg a szakét, a japánok nemzeti italát rizsből készítik. A rizs gőzölése és a benne lévő keményítő *Aspergillus oryzae* amiláz enzimjével történő hidrolizálása által létrehozott félkész termék, a koji, amelyből nagy alkoholtűrésű *S. cerevisiae* törzsekkel erjesztik a végterméket (Deák, 1998; Romano és mtsai, 2006).

A sörkészítés is több ezer éves múltra tekint vissza. Régészeti leletek bizonyítják, hogy az ősi Egyiptomban ie. 1500-ban már ipari méretekben gyártották a sört (Verstrepen és

mtsai, 2006). A sörgyártásban is a *Saccharomyces*-eké a főszerep. A legtöbb sört kizárólag *Saccharomyces* törzsekkel állítják elő, az alsó erjesztésű „lager” söröket *S. pastorianus* (*S. carlsbergensis*), [a *S. cerevisiae* és a *S. eubayanus* hibridje (Libkind és mtsai, 2011)], míg a felső erjesztésűeket („ale”) *S. cerevisiae* törzsek felhasználásával (Romano és mtsai, 2006). Fontos fiziológiai különbség az alsó és felső erjesztésű sörök előállításához felhasznált élesztőgomba törzsek között, hogy az előbbiek képesek a melibióz erjesztésére és nem szaporodnak 37 °C hőmérsékleten, míg az „ale” törzsek nem erjesztik a melibiózt és szaporodnak 37 °C hőmérsékleten (Stewart és mtsai, 1984; Romano és mtsai, 2006). Míg a legtöbb sör a hőkezelt sörlé egyetlen *Saccharomyces* törzsszel történő beoltását követő irányított erjesztéssel készül, néhány, általában spontán erjesztéssel előállított speciális sör (pl. Lambic és Gueuze sörök) erjesztése során egyéb mikroorganizmusok is szerephez jutnak pl. *Pediococcus* és *Dekkera* fajok (Dufour és mtsai, 2003; Hansen és Piskur, 2003; Romano és mtsai, 2006, Spitaels és mtsai, 2014).

A *S. cerevisiae* felhasználására épül a különböző desztillált szeszes italok, köztük a pálinka, készítése, valamint az ipari szesz előállítása is, csakúgy, mint a sütőélesztő gyártás (Deák, 1998; Romano és mtsai, 2006).

Az erjesztett tejtermékek előállításához leggyakrabban a *Candida*, *Galactomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* és *Torulaspora* nemzetségek törzseit használják a tejsavbaktériumok mellett. A Magyarországon is népszerű kefir előállításakor *Kazachstania unispora* (korábban *S. unisporus*) és *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*) törzseket alkalmaznak starterként, de kefirből több mint 20 élesztőgomba fajt, köztük a *S. cerevisiae*-t, izoláltak már (Oberman és Libudzisz, 1998; Romano és mtsai, 2006, Prado és mtsai, 2015).

A sajtgyártás során az élesztőgombák közül általában a *G. geotrichum*, a *Y. lipolytica* és a *D. hansenii* tölti be a legjelentősebb szerepet, utóbbit egyes sajt típusoknál starterként is használják. A tejsav lebontása révén emeli a sajt pH-ját, lehetővé teszi a sav-érzékeny baktériumok (pl. *Brevibacterium linens*) szaporodását, aromaanyagokat és a baktériumok szaporodását elősegítő anyagokat termel, lipolitikus és proteolitikus aktivitása révén pedig elősegíti a sajtok érését (Jakobsen és Narvhus, 1996; Romano és mtsai, 2006). A *Y. lipolytica* lipolitikus és proteolitikus hatása miatt szintén jelentős szerepet tölthet be egyes sajtok érlelése során (Groenewald és mtsai, 2013), viszont mivel zsír- és fehérjebontó képessége igen erős, fontos romlást okozó képességgel is rendelkezik (Deák, 2008a, Groenewald és mtsai, 2013). Ezen kívül barna pigmentet is képezhet a sajtok felszínén (Carreira és mtsai, 2001), ami esztétikai értéküket rontja.

A fermentált húskészítmények előállítása során a baktériumok, elsősorban a tejsavbaktériumok, a domináns mikroorganizmusok, de az élesztőgombák is szerepet játszanak a folyamatban. Az élesztőgombák a nyers húsokon általában kis számban fordulnak elő, de a fermentált kolbászos, szalámik kis hőmérsékleten történő érlelése során a mikrobióta domináns komponensévé válhatnak (Cook, 1995). Koncentrációjuk az érlelés során elérheti a 10^5 - 10^6 tke/gramm értéket (Encinas és mtsai, 2000; Gardini és mtsai, 2001). Az élesztőgombák szerepe az erjesztett kolbászos és szalámik készítése során elsősorban a szín- és ízanyagok kialakulásához kapcsolódik, az oxigén eltávolítása, a peroxidok lebontása valamint lipolitikus és proteolitikus aktivitásuk következtében (Lücke, 1985). Az erős zsírbontó képességgel rendelkező *Y. lipolytica* lipáz enzime elsősorban telített zsírsavak képződését eredményezi, továbbá ez az élesztő képes a zsírbontáskor képződő szabad telítetlen zsírsavak további átalakítására, ezáltal csökkentve az avasodás mértékét (Ordóñez és mtsai, 1999; Romano és mtsai, 2006).

A fent említetteken kívül számos további, erjesztett és nem erjesztett, élelmiszerben jól dokumentált az élesztőgombák előfordulása. Szerepük a nem erjesztett élelmiszerekben általában kevésbé jelentős, mint az erjesztett élelmiszerekben és italokban, sokszor csak akkor válik nyilvánvalóvá, ha romlást okoznak. Mivel az élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata hosszú múltra tekint vissza, ritkán fordul elő, hogy egy élelmiszerről napjainkban derül ki, hogy élesztőgombák élőhelyéül szolgál. A hidegen sajtolt olívaolaj esetében azonban éppen ez történt. A mediterrán térségre jellemző olívaolajban gazdag étrendnek számos az egészségre gyakorolt kedvező hatása ismert. Különösen a keringési rendszer működésére fejt ki pozitív hatást (Buckland és Gonzalez, 2010). Az olívaolaj óriási táplálkozási és gazdasági jelentősége ellenére csak meglepően későn derült fény arra, hogy a frissen sajtolt olívaolaj gazdag mikrobiótának adhat otthont, aminek gyakran az élesztőgombák a domináns összetevői (Ciafardini és Zullo, 2002a, b). Az élesztőgombák a lebegő szilárd részecskékhez kötődnek vagy az olajban található apró, növényi eredetű vízcseppek zárják magukba őket (Ciafardini és Zullo, 2002a, b; Koidis és mtsai, 2008). Az olívaolaj ülepítése során a benne szuszpendált növényi részecskék és apró vízcseppek az ülepítő tank aljára vándorolnak, ahol üledéket képeznek (Ciafardini és Zullo, 2002a, b). Az üledék ezért az olívaolajban található élesztőgombák ígéretes izolálási forrása. Az élesztőgombák az aromaanyagok javításával kedvező hatást fejthetnek ki az olaj minőségére, ugyanakkor lipolitikus aktivitásuk révén a savtartalom nemkívánatos emelkedését idézhetik elő (Ciafardini és mtsai, 2006a, b; Koidis és mtsai, 2008). Az olívaolajból és az annak előállítása során keletkezett melléktermékekből

izolált élesztőgombák közül több új, a tudomány számára korábban ismeretlen fajnak bizonyult. Ezek leírásában mi is részt vettünk. Az új fajok a későbbiekben kerülnek bemutatásra.

Élelmiszer-összetevők és adalékok előállítása élesztőgombák felhasználásával

Az élesztőgombáknak illetve az élesztőgombákból nyert anyagoknak az élelmiszerek előállításában betöltött szerepéről széleskörű áttekintést közölt Halász és Lásztity (1991). Abbas újabb keletű összefoglalója szerint (Abbas, 2006) „az élesztőgombákból készült termékek magát a teljes élesztőt tartalmazzák sűrű szuszpenzió vagy krém formájában, vagy aktív szárított élesztőt, élesztő autolizátumokat, élesztő kivonatokat, elkülönített összetevőket, mint pl. fehérje izolátumokat, aminosavakat, sejtfal glükánokat és mannoproteineket, vitaminokat, szterineket, karotinoidokat, lipideket, enzimeket, nukleinsavakat, poliszacharidokat, kémiai, fizikai vagy enzimatiszus úton módosított komponenseket”.

Az élesztőgombából származó termékek különböző módon járulhatnak hozzá az élelmiszerek íz és aromaanyagainak kialakításához. Vagy adalékanyagként kerülnek felhasználásra, vagy biokatalizátorként alkalmazzák őket, amelyek az élelmiszer-összetevők átalakítása révén kedvező tulajdonságokkal rendelkező komponenseket állítanak elő. Az élesztőgombákat és az élesztőgombákból készült termékeket kedvező íz (alkoholok, aldehidek, aminosavak, aminosav származékok, szénhidrátok, zsírsavak, észterek, laktonok, poliolok, szerves savak, glicerin, xilit, inozit stb.) és aroma anyagaik (kozmaolajok, zsírsavak, zsírsavészterek, karbonil-, kén-, és fenolvegyületek, laktonok, és egyéb aroma komponensek) miatt, antioxidánsként (pl. oxigénezett karotin származékok, citromsav, ubikinonok, tokoferolok, rezveratrol, β -glükánok), színezőanyagként (astaxanthin, karotinok, likopin, lutein, torulin, stb.), vitaminforrásként, és az egészségre gyakorolt kedvező hatásuk (lásd később) miatt alkalmazzák növényi és állati eredetű termékek széles körének előállítása során. A *Saccharomyces*-en kívül pl. a következő nemzetségekbe tartozó fajok kerülnek felhasználásra: *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Yarrowia* és *Zygosaccharomyces* (Abbas, 2006).

Nagy fémion (pl. króm, szelén, germánium, cink, vas) tartalmú tápközegekben szaporítva az élesztőgombák felveszik, és sejteikben felhalmozzák ezeket a kationokat. Ezáltal a számos enzimreakcióban szerepet játszó fémekben gazdag, dúsított ásványi anyag

tartalmú élesztő előállítására nyílik lehetőség (Halász és Lásztity, 1991; Abbas, 2006; Gaensly és mtsai, 2014 és az általuk hivatkozott közlemények).

Biológiai védekezés az élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusok ellen élesztőgombák segítségével

A fonalas gombákra kifejtett erős antagonista hatásuk miatt, néhány élesztőgombát sikerrel alkalmaznak az élelmiszeriparban, betakarítás előtti és utáni romlást okozó mikroorganizmusok, elsősorban penészgombák, pl. *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus* és *Rhizopus* fajok elleni biológiai védekezésre gyümölcsök és zöldségek esetében (Fleet, 2006). Néhány penészgomba-antagonista élesztőgombát [*Anthracoystis flocculosa* (*Pseudozyma flocculosa*), *Candida oleophila* és *Metschnikowia fructicola*] tartalmazó készítmény már eljutott a kereskedelmi forgalmazásig. További, a biológiai védekezésre potenciálisan felhasználható élesztőgombák közé tartozik pl. a *Candida sake*, a *C. famata* (*D. hansenii*), a *Papiliotrema* (*Cryptococcus*) *laurentii*, a *Metschnikowia pulcherrima*, a *Meyerozyma* (*Pichia*) *guilliermondii*, az *Ogataea* (*Pichia*) *angusta*, a *Pichia fermentans*, a *Sporobolomyces roseus* és a *Wickerhamomyces anomalus* (*P. anomala*) (Janisiewicz és Korsten 2002; Fleet, 2006; Giobbe és mtsai, 2007; Fiori és mtsai, 2008; Droby és mtsai, 2009). Az élesztőgombáknak a gombákra gyakorolt antagonista hatásának magyarázatára a következő hatásmechanizmusokat tételezik fel; versengés a tápanyagokért és az élőhelyért, antibiotikus és toxikus hatású anyagok (pl. zsírsavak, zsírsavszármazékok, etanol, acetaldehid, etil-acetát), killer toxinok és más gátló hatású fehérjék és peptidek termelése, gomba sejtfal lízisét előidéző enzimek (glukanázok és kitinázok) termelése és a növények védekező mechanizmusainak serkentése, biofilm képzés (Punja és Utkhede, 2003; Fleet 2006, Giobbe és mtsai, 2007). A pulcherrimin termelő *Metschnikowia* törzsek esetén a fentiektől eltérő hatásmechanizmust tártak fel. A vastartalmú komplex pigment képződésekor a Fe^{3+} ionoknak a környezetből történő kivonása által okozott vashiány felelős a gombák és baktériumok növekedésének/szaporodásának gátlásáért (Sipiczki, 2006, Oro és mtsai, 2014). Oro és mtsai (2014) azt is megfigyelték, hogy az általuk tanulmányozott *M. pulcherrima* törzsek gátolták a vizsgált *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* és *Pichia* törzsek szaporodását, de nem gyakoroltak hatást a *Saccharomyces* törzsek szaporodására, ezért javasolták a kiválasztott *M. pulcherrima* törzsek *S. cerevisiae*-vel együtt történő alkalmazását must erjesztéséhez kombinált starter készítményekben. Az ugyancsak pulcherrimin termelő *M. fructicola* (Kurtzman és Droby, 2001) esetében

beszámoltak arról, hogy a vizsgált antagonista törzs kitináz enzimet is termelt a növénypatogén *Monilinia fructicola* és a *Monilinia laxa* jelenlétében (Banani és mtsai, 2015). Pimenta és mtsai (2004) eredményei alapján a *Saccharomycopsis* nemzetségbe sorolt ragadozó élesztők is alkalmasak lehetnek a gyümölcsök romlását okozó *Penicillium* fajok elleni biológiai védekezésre. Iacumin és mtsai (2017) előkísérleteik során kiválasztott *D. hansenii* és *Saccharomycopsis fibuligera* törzseket eredményesen alkalmaztak ochratoxin termelő penészgombák (*Aspergillus ochraceus* és *Penicillium nordicum*) növekedésének és toxin termelésének gátlására pácolt füstölt sonka érlelése során.

Számos beszámoló látott napvilágot arról is, hogy egyes élesztőgomba anyagcsere termékek képesek néhány baktérium, köztük pl. az *Escherichia coli* és sztafilokokkuszok szaporodását gátolni, sőt néhány bélbaktériumot el is pusztíthatnak az élesztőgombák, pl. a *Trichosporon* (*Cutaneotrichosporon*) *cutaneum*, a *C. krusei* (*P. kudriavzevii*) és a *P. membranifaciens* (Viljoen, 2006, Younis és mtsai, 2017).

Probiotikus és bioterápiás hatású élesztőgombák

„A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva kedvező hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre” (Fleet és Balia, 2006). Az élesztőgombák közül elsősorban a *S. boulardii*-nak (*S. cerevisiae*) tulajdonítanak probiotikus hatást. A *S. boulardii* általában liofilizált készítmények formájában kerül forgalomba. Elsősorban különböző eredetű hasmenéses betegségek megelőzésére és kezelésére ajánlják, de számos krónikus betegség, így például a Chron betegség és az irritábilis bél szindróma kezelésében is eredményes lehet. Hatékonyágát klinikai vizsgálatok sora igazolja. A *S. boulardii* felhasználása általában biztonságosnak tekinthető, legyengült immunrendszerű embereknél azonban fungémiát okozhat (Kelesidis és Pothoulakis, 2012). Bár a forgalomba kerülő készítményeken gyakran a *S. boulardii* nevet tüntetik fel, a genom szekvencia összehasonlítás felfedte, hogy a *S. boulardii* nem képez a *S. cerevisiae*-től elkülönült fajt (Liti és Schacherer, 2011; Hittinger és mtsai, 2018).

Az élesztőgombák, mint élelmiszerek és italok romlásának előidézői

Az élelmiszerekben előforduló élesztőgombák zöme nem patogén, a mikotoxin termelő penészgombáktól eltérően az élesztőgombák az emberek egészségét veszélyeztető

toxinokat sem termelnek, és általában nem okoznak jelentős táplálkozási érték csökkenést sem. Az élesztőgombák által okozott élelmiszerromlás a következőképpen határozható meg: „az élesztőgombáknak olyan mértékű elszaporodása az élelmiszerben, amely az adott élelmiszernek a fogyasztó által érzékelhető megváltozását okozza és a fogyasztóban elégedetlenséget, panaszt vált ki, vagy a termék fogyasztó általi visszautasítását eredményezi”. A fogyasztók által leggyakrabban észlelt romlási jelenségek a következők: gáztermelés, kellemetlen íz és szag kialakulása, élesztőgomba telepek, hárták és elszíneződés megjelenése szilárd élelmiszereken, zavarosodás, pelyhek, üledék- és hártaképződés folyékony halmazállapotú termékekben (Stratford, 2006). Az élelmiszerekbe az élesztők bejuthatnak az alapanyagok természetes élesztőgomba közösségeiből vagy az élelmiszerek előállításuk során szennyeződhetnek a gyártási környezetben található élesztőgombákkal. Az élesztőgombák által kiváltott élelmiszerromlásban gyakran szerepet játszik a lipáz és proteáz enzimek termelése (Hernández és mtsai, 2018). Bár számos élesztőgomba faj okozhatja az élelmiszerek és italok romlását, néhány specifikus élelmiszer és élelmiszerromlást okozó élesztőgomba közötti kapcsolat gyakori és jól előre jelezhető. Ilyen például a *Z. rouxii* előfordulása a nagy cukortartalmú termékekben, a *D. hansenii* előfordulása a sózott húskészítményekben, a *Z. bailii*-é a gyenge szerves savakkal tartósított, valamint a *Y. lipolytica*-é a nagy zsírtartalmú termékekben (Fleet, 2006). A megfelelő minőségű alapanyagokból megfelelő technológia alkalmazásával előállított élelmiszerek esetében a romlásért leggyakrabban alig több, mint 10 élesztőgomba faj tehető felelőssé, köztük *Brettanomyces* és *Zygosaccharomyces* fajok, a *D. hansenii* és a *S. cerevisiae* (Stratford, 2006; Pitt és Hocking, 2009). Davenport (1996 és 1997) szerint az élelmiszerromlást okozó legveszélyesebb élesztőgombák tartósítószer-rezisztens, ozmotoleráns, erős erjesztő képességgel rendelkező és szaporodásukhoz vitamint igénylő fajok közül kerülnek ki. Mivel a baktériumok gyorsabban szaporodnak az élesztőgombáknál, az élesztőgombák által előidézett élelmiszerromlás elsősorban olyan élelmiszerekben valószínű, amelyekben a baktériumok szaporodását valamilyen környezeti tényező lassítja vagy gátolja; ilyenek a kis pH-jú, kis vízaktivitású vagy a baktériumok szaporodását gátló anyagokat tartalmazó élelmiszerek (Fleet, 2006; Stratford, 2006, Hernández és mtsai, 2018). Az élesztőgombák által előidézett élelmiszerromlás okozta gazdasági veszteség egyes becslések szerint évente Euro milliárdokban mérhető (Stratford, 2006). Az élelmiszerekben előforduló élesztőgombákról, azok rendszertanáról, ökológiájáról, anyagcseréjéről, néhány biológiai sajátosságáról, valamint a gátlásukra, inaktiválásukra, kimutatásukra és rendszertani azonosításukra alkalmazott

módszerekről széleskörű áttekintést közölt Deák (2008a). Az élelmiszeromlást okozó élesztőgombák tipizálására és rendszertani azonosítására újabban használatos molekuláris módszereket ismertetik, valamint az élelmiszeromlást okozó élesztőgombák lehetséges forrásait taglaják Hernández és mtsai (2018).

Az élelmiszeromlást okozó élesztőgombák ökológiája sokszor alig ismert és eredetüket is gyakran homály fedi. Szaporodásuk és biológiai aktivitásuk visszaszorításához fiziológiájuk, biokémiájuk és a stressz hatásokra adott válaszreakcióik beható ismeretére van szükség (Fleet, 2006).

Élesztőgombák, mint élelmiszer allergének forrásai

Bár az élesztőgombák, például a *S. cerevisiae*, is tartalmazznak potenciális allergéneket, pékélesztővel végzett kísérletek szerint azok zömében a tápcsatorna elején (gyomor, nyombél) lebomlanak, ezért elsősorban a száj és a nyelőcső nyálkahártyája van kitéve hatásuknak (Kortekangas-Savolainen és mtsai, 1993). Az emésztőcsatornába kerülő élesztőgombákat általában nem is tekintik potenciális allergén hatásúnak. Airola és mtsai (2006) azonban egy olyan esetet dokumentáltak, amelyben egy penészgombákra érzékeny személy esetében különböző feldolgozott élelmiszerekben ízesítőként használt élesztőkivonat allergiás keresztreakciót váltott ki. Mivel pékáruk fogyasztásának nem volt ilyen hatása, feltételezik, hogy vagy az élesztőkivonat készítéséhez használt élesztőgomba (*S. pastorianus*) váltotta ki az allergiás reakciót vagy az élesztőkivonat előállítása során keletkeztek allergén anyagok. Az eredmények alapján az élesztőgombákat, mint lehetséges allergéneket kell számításba venni gombákra érzékeny személyek esetében.

Opportunista patogén élesztőgombák az élelmiszerekben

Egyes élelmiszerekkel és italokkal nagymennyiségű élő élesztőgomba sejt jut a fogyasztók szervezetébe legtöbbször anélkül, hogy ez bármiféle kedvezőtlen hatással járna. Ezek közé az élelmiszerek közé tartoznak a friss gyümölcsök, gyümölcslevek, gyümölcssaláták, sajtok és egyéb fermentált tejtermékek, fermentált húskészítmények, egyes szeszesitalok és tradicionális, fermentált élelmiszerek. A bennük található leggyakoribb élesztőgombák a következő nemzetségekhez tartoznak: *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces* (*Geotrichum*), *Hanseniaspora*,

Kluyveromyces, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*. Bizonyos körülmények között, pl. antibakteriális antibiotikum terápiát követően vagy legyengült immunrendszerű személyek esetében néhány élelmiszer eredetű *Candida* faj képes a bélcsatornában megtelepedni és hasmenést vagy bélhurutot okozni (Bernhardt és Knoke, 1997; Fleet és Balia, 2006).

Bár az élesztőgombák között nincsenek agresszív kórokozók, megfelelő körülmények között opportunistá patogén mikroorganizmusokként, leggyakrabban a *C. albicans* és a *Cr. neoformans*, betegséget idézhetnek elő (Fleet és Balia, 2006; Cooper, 2011). Az utóbbi évtizedekben még az élelmiszeriparban hatalmas mennyiségben felhasznált *S. cerevisiae* is opportunistá patogénné lépett elő, elsősorban az idősek, a koraszülöttek és az immunszuppresszált emberek körében (Pérez-Torrado és Querol, 2016).

Az élesztőgombák fogalma, helyük a gombák között és biodiverzitásuk

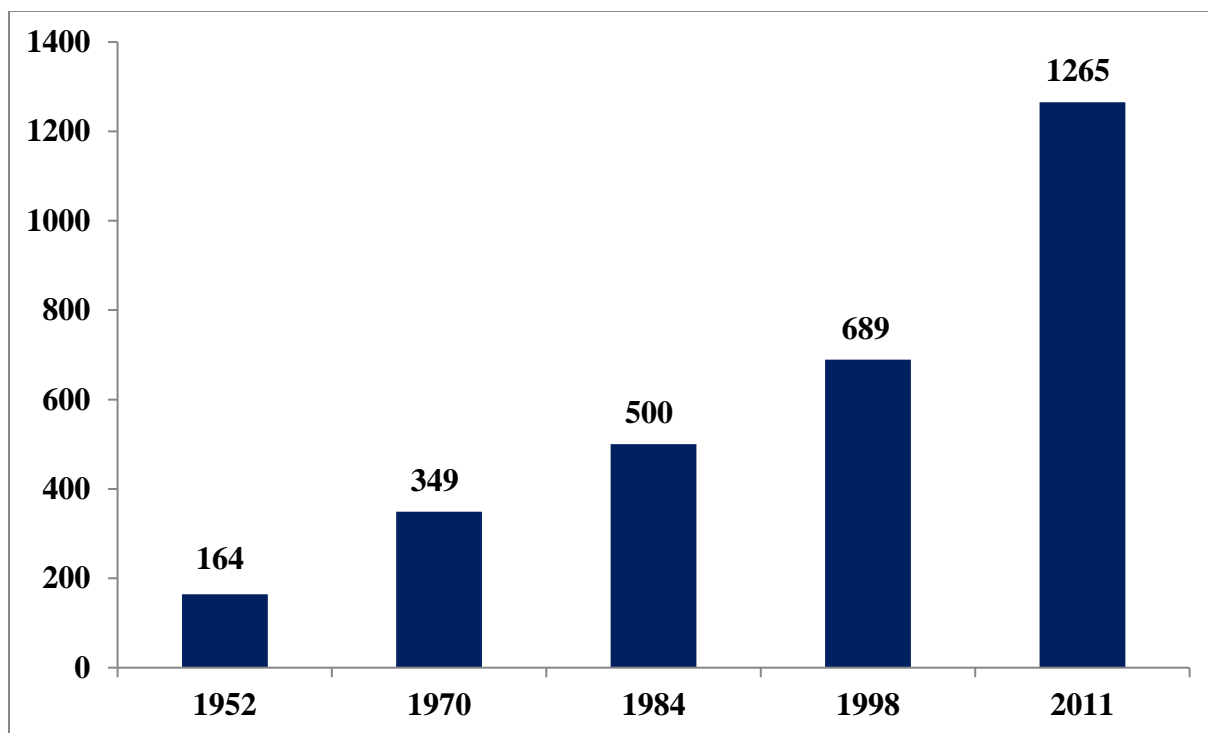
Eleinte a *Saccharomyces* nemzetség tagjai körül kialakult definíció szerint, alkoholos erjesztésre képes, egysejtű, sarjadzással szaporodó és spórákat is képző gombákat sorolták az élesztőgombák közé (Deák, 1998). Több nyelvben, így a magyarban is, erjesztő képességükre utal az elnevezésük (Kurtzman és mtsai, 2011b). Később kiderült, hogy nem minden élesztőgomba képes erjesztésre, nem mind egysejtű és nemcsak az aszkuszos, de a bazídiumos gombák között is találhatók élesztők. A legújabb élesztőgomba monográfiából kölcsönzött meghatározás szerint az élesztőgombák általában egysejtű, ivartalan úton elsősorban sarjadzással vagy hasadással szaporodó gombák, amelyek ivaros alakja, amennyiben ismert, nem termőtestben képződik (Kurtzman és mtsai, 2011b). Az élesztőgombák nem alkotnak egységes rendszertani csoportot, mind az Ascomycota, mind a Basidiomycota törzsekben megtalálhatók képviselőik (Kurtzman és mtsai, 2015). A túlnyomórészt egysejtű élesztő alak kialakításához szükséges genetikai eszközkészlet már a gombák törzsfejlődésének korai stádiumában létrejött, maga az élesztőszerű életforma azonban csak jóval később alakult ki és vált uralkodóvá az aszkuszos és bazídiumos gombák öt csoportjában a genetikai szabályozó mechanizmusok konvergens evolúciója révén (Nagy és mtsai, 2014). A magyar nyelvű irodalomban a tömlős gombák közé sorolt élesztőgombákat sokszor „valódi élesztőgomba” névvel illetik, míg a bazídiumos élesztőgombákat „álélesztőgombáknak” nevezik (Deák, 1998).

A biodiverzitás (biológiai sokféleség) „a bármilyen eredetű élőlények közötti változatosságot jelenti, beleértve többek között a szárazföldi, tengeri és más vízi-ökológiai rendszereket, valamint az e rendszereket magukban foglaló ökológiai komplexumokat; ez magában foglalja a fajokon belüli, a fajok közötti sokféleséget és maguknak az ökológiai rendszereknek a sokféleségét” (Biológiai Sokféleség Egyezmény, 1992). A biológiai sokféleséget, így az élesztőgombák biodiverzitását is leggyakrabban genetikai, faji vagy ökológiai szinten értelmezik. „A genetikai diverzitás az egyedek közötti genetikai különbségek következtében létrejövő változékonyság egy fajon belül. A faji diverzitás a különböző fajok száma és gyakorisága egy adott területen belül, az ökológiai diverzitás pedig az ökoszisztémák sokfélesége egy adott régióban” (Lawrence, 2000). Végso soron a biodiverzitás valamennyi szintjét az egyes fajokon belüli genetikai különbségek határozzák meg és leggyakrabban faj szinten vizsgálják, ezért érdemes röviden kitérni az élesztőgombák körében használatos fajfogalmakra.

Mayden (1997) nem kevesebb, mint 22 különböző fajfogalmat sorol fel. Az egyes fajfogalmak elméleti és gyakorlati tulajdonságainak értékelése alapján az evolúciós fajfogalmat jelöli meg az egyetlen megfelelő elméleti fajfogalomként, míg a többi másodlagos, a fajok tanulmányozásához elengedhetetlenül szükséges gyakorlati eszköznek tekinti. Az evolúciós fajfogalom értelmében a faj „a kiindulási és utód populációk egyetlen leszármazási vonala, amely megörzi identitását más leszármazási vonalaktól, és saját evolúciós irányokkal és történelmi sorssal rendelkezik” (Wiley, 1978). A gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott fajfogalmak, a fenetikus (gyakran mint morfológiai), a biológiai és a filogenetikai fajfogalom. A gombák esetében a tapasztalatok szerint a filogenetikai fajfogalom gyakorlati alkalmazása, a filogenetikai fajfelismerés (phylogenetic species recognition), azaz a variábilis nukleinsav szekvenciák filogenetikai elemzése jelenleg alkalmasabb az evolúciós fajfogalommal összhangban álló fajok felismerésére, mint a fenetikus és biológiai alapú fajfelismerés. Ennek oka, hogy egy evolúció során képződött új faj esetében a gének bázissorrendjeiben (gén szekvenciákban) bekövetkező változások megelőzik a párosodási és morfológiai tulajdonságokban fellépő változásokat (Taylor és mtsai, 2000). A filogenetikai fajfelismerés egyik, Harrington és Rizzo által javasolt definíciója szerint a faj „...a populációk legkisebb közös származású csoportja, mely közös, egyedi, meghatározható fenotípusos sajátosságokkal rendelkezik” (Harrington és Rizzo, 1999). Taylor és mtsai (2000) gombák esetén a fajok közötti határok meghúzásához a leszármazási összhang filogenetikai fajfelismerés (genealogical concordance phylogenetic species

recognition) elvét javasolják, amelynek lényege a következő. A különböző gének szekvenciáinak elemzése alapján készített törzsfák topológiája közötti ellentmondás valószínűleg az azonos fajhoz tartozó egyedek (törzsek) közötti rekombináció eredményeként jön létre, és a törzsfák közötti összhang és az ellentmondás közötti átmenet határozza meg a fajok határait. A módszer hátránya, hogy nem alkalmazható valódi klonális (kizárólag ivartalan úton szaporodó) fajok esetében, bár ezek száma jóval kisebb a korábban feltételezettnél.

Az élesztőgomba monográfia egymást követő kiadásáiban tárgyalt fajok számát az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. Az élesztőgomba monográfiákban tárgyalt élesztőgomba fajok száma

1952 - Lodder J, Kreger-van Rij NJW: The Yeasts: A Taxonomic Study

1970 - Lodder J (szerk.): The Yeasts: A Taxonomic Study. 2. kiadás

1984 - Kreger-van Rij NJW (szerk.): The Yeasts: A Taxonomic Study. 3. kiadás

1998 - Kurtzman CP, Fell JW (szerk.): The Yeasts: A Taxonomic Study 4. kiadás

2011 - Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (szerk.): The Yeasts: A Taxonomic Study. 5. kiadás

A legutóbb megjelent élesztőgomba monográfia (The Yeasts: A Taxonomic Study, 5. Kiadása, Kurtzman és mtsai, 2011a) mindössze 1 265 élesztőgomba fajt tárgyal, de számos további fajról is említést tesz, amelyek túl későn kerültek leírásra vagy jutottak a szerzők tudomására ahhoz, hogy a monográfiában részletesen ismertetésre kerüljenek. Az ismert élesztőgomba fajok száma jelenleg már 2 000 körülire becsülhető, ez az összes ismert

gombafaj számának csupán mintegy 2%-át teszi ki. Különböző becslések szerint az összes gombafaj száma 500 000 és 9,9 millió között lehet. Mértékadónak tartott becslések szerint 1,5 – 5 millió gombafaj élhet Földünkön (Hawksworth, 2001; Blackwell, 2011; Hawksworth és Lücking, 2017), bár Tedersoo és munkatársai (2014) nagyszámú talajminta piroszekvenálásra alapozott metabarkód elemzése alapján a fenti értékeket túlzónak találták. Feltételezve, hogy az 1,5 – 5 millió gombafaj létezését feltételező becslések helytállóak és az élesztőgomba fajok száma körülbelül 2%-os részarányt képvisel az összes gomba között, 30 000 és 100 000 közötti élesztőgomba faj létezését tételezhetjük fel.

A tudomány számára új élesztőgombák leírásának jelenleg megfigyelhető üteme alátámasztja azt a feltételezést, hogy nagyon sok új faj vár még leírásra. Az ismert élesztőgomba fajok számának az utóbbi két évtizedben bekövetkező gyors növekedése nagymértékben köszönhető két amerikai kutató, Cletus P. Kurtzman és Jack W. Fell, az élesztőgombák DNS szekvencia alapú rendszertani azonosításához elengedhetetlenül szükséges referencia adatbázis megteremtése érdekében kifejtett úttörő munkásságának. Felismerték, hogy a riboszómális RNS nagy alegységét kódoló gén egy rövid, körülbelül 600 nukleotidból álló szakaszának (D1/D2 régió) bázissorrendje (szekvenciája) az esetek zömében alkalmas az élesztőgombák gyors és megbízható faj szintű rendszertani azonosítására. A módszert korábbi, jól megalapozott eljárásokkal, elsősorban a nukleáris DNS hasonlóságvizsgálattal (DNS homológia meghatározás) és keresztezési kísérletekkel körülhatárolt fajok vizsgálatával kalibrálták, és az általuk meghatározott DNS szekvenciákat nyilvános adatbázisokban helyezték el. Kurtzman és Robnett 1998-ra gyakorlatilag az összes akkor ismert Ascomycota törzsbe tartozó élesztőgomba faj D1/D2 régiójának DNS bázissorrendjét meghatározta és a szekvenciákat elhelyezték a GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) szabadon hozzáférhető adatbázisában (Kurtzman és Robnett, 1998). Ugyanezt a munkát a Basidiomycota törzsbe sorolt élesztőgombák esetén Fell és mtsai (2000) végezték el. Az előbb említett szerzők adataik elemzése alapján előrejelzést is adtak a DNS bázissorrendben megfigyelt különbségek fajon belüli és fajok közötti várható értékeiről. Az aszkuszos élesztőgombák esetében, amennyiben a törzsek D1/D2 szekvenciái közötti szubsztitúciók aránya meghaladja az 1%-ot, akkor a két törzs valószínűleg különböző fajokhoz tartozik. Amennyiben 0-3 nukleotid különbség észlelhető a törzsek D1/D2 szekvenciái között, akkor valószínűleg azonos fajhoz vagy testvér fajokhoz tartoznak (Kurtzman és Robnett, 1998). A Basidiomycota törzsbe sorolt élesztőgombák esetében Fell és mtsai (2000) arra a következtetésre jutottak, hogy ha két élesztőgomba törzs D1/D2 régiói

között kettő vagy több nukleotid különbség figyelhető meg, akkor a két törzs különböző fajokhoz tartozik. Az időközben felhalmozódott információ zömében alátámasztja a fenti megfigyeléseket, bár kivételek is ismertté váltak. Amennyiben a D1/D2 régió szekvenciája alapján nem lehet megnyugtatóan azonosítani egy élesztőgomba törzset, akkor egyéb DNS szakaszok bázissorrendjének meghatározására és összehasonlítására is szükség lehet. Az egyik, az élesztőgombák rendszertani azonosítására gyakran alkalmazott további DNS szakasz a rRNS-t kódoló gének között elhelyezkedő ITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacer) régió, amelyet egyébként univerzális DNS-vonalkódnak (DNA barcode) is javasoltak a gombák esetén (Schoch és mtsai, 2012).

Az új élesztőgomba fajleírásokat közlő folyóiratok szerkesztői felismerték a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régió szekvencia adatbázisának jelentőségét, és hosszú ideje csak úgy közölnek élesztőgomba fajleírást, ha a szerzők legalább a típus törzs esetében meghatározzák és a GenBank adatbázisában elhelyezik a D1/D2 szekvenciát. Ennek következtében a Kurtzman és Fell által vezetett kutatócsoportok munkájának eredményeként a GenBank keretein belül létrejött élesztőgomba rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 szekvencia adatbázis, gyakorlatilag folyamatosan naprakész állapotban van. A folyamatosan frissített adatbázis lehetővé teszi az élesztőgomba törzsek megbízható és gyors rendszertani azonosítását, illetve azonos vagy megfelelő mértékben hasonló szekvenciák hiánya esetén valószínűsíthető, hogy a tudomány számára eddig ismeretlen fajjal van dolgunk. Szemben a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 szekvencia adatbázissal, az ITS szekvencia adatbázis élesztőgombák esetében még ma sem teljes, bár az utóbbi időben ezen a téren is jelentős előrelépés történt (pl. Vu és mtsai, 2016)

Az élesztőgombák rendszertana

A taxonómia vagy szisztematika egyaránt átültethető rendszertanként a magyar nyelvre (Márialigeti, 2008), de ezeknek a kifejezéseknek különböző szerzők sokszor nem azonos jelentést tulajdonítanak. Míg sokan szinonimnak tartják a két kifejezést, a Henderson's Dictionary of Biological Terms (Lawrence, 2000) megfogalmazása szerint a taxonómia „az organizmusok tulajdonságainak osztályozás (klasszifikáció) céljából történő elemzése”. Ezzel szemben a szisztematika szélesebb értelmű, „az organizmusok azonosításának (identifikáció), taxonómiájának és nómenklatúrájának (nevezéktanának) a vizsgálata, ideértve az élőlények természetes rokonságán alapuló osztályozását és az egyes taxonok (rendszertani egységek)

változékonyságának és evolúciójának tanulmányozását”. A rendszertan kifejezést ebben a szélesebb, szisztematika értelemben használom, amelynek a fenti meghatározásban külön nem említett, de elválaszthatatlan része a tudomány számára új fajok leírása. Amennyiben a rendszertani azonosítás során egy élesztőgomba törzset nem sikerül egyetlen korábban leírt fajjal sem azonosítani, akkor ismeretlen faj képviselőjéről van szó, amely kellő alapossággal elvégzett jellemzés után, az erre vonatkozó számos szabály betartása mellett, új fajként írható le. A fajok leírását több szerző a rendszertan (szisztematika) elemei között nevesíti is. Singh (2010) szerint a szisztematika az azonosítást, a leírást, a nevezéktant, a filogenetikai rokonsági viszonyok feltárását és az osztályozást foglalja magába.

Az élesztőgombák rendszertani azonosítása és új fajok leírása

Az élesztőgombák rendszertani azonosítása hosszú ideig kizárólag fenotípusos, makro- és mikromorfológiai, fiziológiai és biokémiai tulajdonságaik alapján történt. Osztályozásukhoz és az új fajok leírásához is ezeket a tulajdonságokat használták fel. A fenotípusos tulajdonságok teljes körű felsorolását és a meghatározásukhoz szükséges módszerek kimerítő leírását tartalmazza az élesztőgomba monográfia legutóbbi kiadásának vonatkozó fejezete (Kurtzman és mtsai 2011c), de magyar nyelven is részletes információ áll rendelkezésre ebben a témakörben (pl. Deák, 1998). Az élesztőgombák jellemzésére leggyakrabban használt tulajdonságok felsorolását az *1. táblázat* tartalmazza. A fenotípusos tulajdonságok meghatározása igen munka- és időigényes. Egyes tesztek inkubációs ideje legalább három hét, az eredmények pedig sokszor nem nyújtanak kellő támpontot az adott törzs rendszertani azonosításához. Egyes fajok esetében sok a variábilis tulajdonság. A *Lipomyces mesembrius* esetén pl. a szénforrás-asszimilációs tesztek több mint 50%-ának az eredménye variábilis (Smith és Kurtzman 2011).

Az utóbbi évtizedekben az élesztőgombák jellemzésében és rendszertani azonosításában egyre nagyobb szerep jut a molekuláris biológiai módszereknek. A későbbiekben tárgyalt DNS bázissorrend meghatározáson alapuló rendszertani azonosítás mellett, számos alternatív módszer is használható az élesztőgomba törzsek azonosítására, gyakran a bázissorrend adatokkal való kalibrálás után (Kurtzman és Boekhout, 2017).

1. táblázat. Az élesztőgombák jellemzésére leggyakrabban használt tulajdonságok (Deák, 1998 alapján)

<p>Alaktani tulajdonságok</p> <ul style="list-style-type: none"> Ivaros szaporodás Konjugáció Spóráképzés Bazídium típusa <p>Ivartalan szaporodás</p> <ul style="list-style-type: none"> Sarjadzás Hasadás Konídiumképzés <p>Mikromorfológia</p> <ul style="list-style-type: none"> Sejt alak Valódi és álhifa <p>Makromorfológia</p> <ul style="list-style-type: none"> Agartenyészet Folyadéktenyészet <p>Biokémiai tulajdonságok</p> <ul style="list-style-type: none"> Urea bontás Diazonium Blue B reakció Koenzim Q típus Keményítőképzés Ecetsavképzés 	<p>Élettani tulajdonságok</p> <ul style="list-style-type: none"> Erjesztés Szénforrás-asszimiláció Nitrogénforrás-asszimiláció Vitaminigény Szaporodás különböző hőmérsékleteken Szaporodás kis vízaktivitású tápközegben Gátlószertűrés Killertoxin termelés/tűrés <p>Molekuláris tulajdonságok</p> <ul style="list-style-type: none"> Sejtfalösszetétel Fehérjemintázat Izoenzimek Zsírsvösszetétel DNS bázisösszetétel DNS homológia DNS ujjenyomatok Kariotípus DNS vonalkód szekvenciák
---	---

Ezek közé tartoznak a fajspecifikus indítószekvencia (primer) párok, a fluoreszcens *in situ* hibridizációt alkalmazó peptid-nukleinsav próbák, a polimorf DNS random amplifikációja (RAPD) és az amplifikált DNS fragmentek hosszpolimorfizmus vizsgálata (AFLP), a valós idejű PCR, a denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) és a hőmérsékleti gradiens gélelektroforézis (TGGE), a folyadék citometria és a metagenomikai vizsgálatok. Ugyan nem nukleinsav alapú módszer, de hatékony és gyors rendszertani azonosítást tesz lehetővé az egyre inkább terjedő MALDI-TOF tömegspektrometria.

Napjainkban a DNS nukleotidsorrend alapján történő rendszertani azonosítás, megbízhatósága, gyorsasága és viszonylag kis költsége miatt kiemelkedő jelentőségre tett szert. Az élesztőgombák esetében a nukleáris riboszómális RNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiója az elsődleges vonalkód szekvencia, ahogy az röviden már korábban említésre került. Egyes esetekben a D1/D2 régió bázissorrendjének meghatározása nem elegendő az

adott törzs megnyugtató rendszertani azonosítására, ilyenkor leggyakrabban egyéb DNS szakaszok, például az ITS régió bázissorrendjeit is összevetik az adatbázisokban található szekvenciákkal a megbízható rendszertani azonosítás elérése érdekében. A nukleotid szekvenciák pusztán összehasonlítása, a szubsztitúciók és inszerciók/deléciók számának a meghatározása mellett további információt nyújt a DNS bázissorrendek elemzésén alapuló törzsfák készítése (lásd később). Egymással közeli rokonságban álló élesztőgombák esetében az azonos fajhoz való tartozás (konszpecifitás) megerősítésére vagy elvetésére Lachance és munkatársai (2010, 2011a) a D1/D2 és az ITS régiók nukleotid bázissorrendjének parszimónia (takarékoság) kapcsolatháló-elemzéssel (parsimony network analysis) történő együttes vizsgálatát javasolták az egyes élesztőgomba fajok elkülönítésére. A módszert *Candida*, *Metschnikowia* és *Starmerella* törzsek fajokba sorolására alkalmazták. Az ivaros szaporodó fajok esetében a kapcsolatháló-elemzés eredményét a keresztezési kísérletek is megerősítették. Összegzésük szerint a D1/D2 és az ITS régiók nukleotid bázissorrendjének parszimónia kapcsolatháló-elemzése egy, az élesztőgomba fajok elkülönítésére alkalmas, elméleti alapon nyugvó statisztikai módszer.

Bár a molekuláris biológiai módszerek ma már elsődleges szerepet játszanak az élesztőgombák rendszertani azonosításában, illetve az azonosítás sikertelensége esetében, annak megállapításában, hogy eddig ismeretlen, még le nem írt fajról van szó, továbbra is szükséges az új fajok leírásakor azokat fenotípusosan is jellemezni. A standard fenotípusos tulajdonságok meghatározása az élesztőgombák osztályozásához nyújtott támogatás mellett legalább két okból szükséges. Egyrészt, élettani tulajdonságaik ismerete segíthet az élőhelyükön betöltött ökológiai szerepük megértésében, másrészt esetleges biotechnológiai alkalmazási lehetőségeikre is fény derülhet. A DNS szekvencia alapú rendszertani azonosítás és osztályozás kiváló működésének sajnálatos kedvezőtlen mellékhatásaként sok szerző nem fordít kellő energiát az élesztőgombák ivaros szaporodási ciklusának feltárására.

Optimális esetben az új fajok leírását több törzsre alapozzák. Heves viták folytak (például a Yeast Newsletter hasábjain, <http://www.uwo.ca/biology/YeastNewsletter/PDFs/Zy00492.pdf>) és folynak arról, hogy elegendő-e egy törzs alapján leírni egy új élesztőgomba fajt. Kurtzman (2010) a több törzs alapján történő fajleírás mellett felsorakoztatott leggyakoribb érveknek (a fajon belüli esetleges genetikai és fenotípusos variabilitás dokumentálása és az új faj ökológiájának megismerése) és az egyetlen törzsre alapozott fajleírás előnyeinek (új tudományos és biotechnológiai jelentőségű genetikai erőforrások feltárása, valamint az új fajt magába foglaló

taxonómiai csoport törzsfajlásának és biológiai sokféleségének jobb megértése) a mérlegelése után arra az álláspontra helyezkedett, hogy a nagyobb veszteséget az okozná a mikrobiológia és a biodiverzitás megértése terén, ha az egy törzsre alapozott fajleírások nem születnének meg. Arra is felhívja a figyelmet, hogy a *The Yeasts: A Taxonomic Study*, legutóbbi, 5. Kiadásában (Kurtzman és mtsai, 2011a) tárgyalt fajok mintegy harmada egy törzs alapján került leírásra.

A GenBank vonalkód DNS bázissorrend adatbázisa kiváló lehetőséget biztosít az új, de még le nem írt élesztőgomba fajok további törzseinek felleléséhez, ezáltal az egy törzsre alapuló fajleírások hátrányainak kiküszöböléséhez, emellett új szakmai együttműködések kialakítását is lehetővé teszi. Saját munkánk során is többször előfordult, hogy a GenBank-ban fellelhető DNS szekvenciák alapján sikerült több törzsre alapozott fajleírást készítenünk. Ma számos folyóirat, szerkesztő és bíráló előnyben részesíti a több törzsre alapuló fajleírást az egy törzset figyelembevevővel szemben.

Az élesztőgombák nevezéktana

A gombák, ideértve az élesztőgombák elnevezésével kapcsolatos bonyolult szabályrendszert 2012-ig a Nemzetközi Botanikai Kód (International Botanical Code) egymást követő kiadásai tartalmazták. 2012-ben jelent meg, a Nemzetközi Botanikai Kódot felváltó International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, amelyet a hagyományokat követve, az azt elfogadó Nemzetközi Botanikai Kongresszus helyszíne után, röviden Melbourne Kódnak (Melbourne Code) neveznek. A Melbourne Kód (McNeill és mtsai, 2012), a nevében bekövetkezett, a mikológia önállóságát is tükröző változás mellett több, a gombák rendszerezése szempontjából rendkívül fontos változást is tartalmaz a korábban érvényben lévő Vienna Kódhoz (McNeill és mtsai, 2006) képest (Hawksworth, 2011). Ezek közé tartozik a latin nyelvű fajleírás és diagnózis kötelező érvényűségének eltörlése. Az új szabályozás szerint az új fajok leírása és a diagnózis latin helyett angol nyelven is elkészíthető. Az új élesztőgomba fajokat leíró szerzők és a fajleírásokat közlő folyóiratok reakciói világosan alátámasztják, hogy ez a döntés már nagyon időszerű volt. További fontos változás, hogy 2013. január 1-től csak akkor érvényes egy új gombafaj (vagy egyéb gomba taxon) leírása, ha a tudományos nevet egy elismert adatbázisban (pl. MycoBank, <http://www.mycobank.org>) regisztrálják, és a leírásban feltüntetik a taxon egyedi azonosítóját.

Dramai hatást gyakorol a gombák, köztük az élesztőgombák, rendszertanára, hogy a Melbourne Kód elfogadta az Amszterdami Deklaráció a Gombák Nevezéktanáról [The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature, (Hawksworth és mtsai, 2011)] alaptételét: „Egy Gomba = Egy Név” („One Fungus = One Name”). Ennek értelmében a pleomorf (az életciklusuk különböző állomásai során különböző morfológiával rendelkező) gombák esetében korábban alkalmazott duális nomenklatura (kettős nevezéktan), azaz, hogy egy azonos fajhoz tartozó ivaros (teleomorf) és ivartalan (anamorf) alakok különböző tudományos névvel rendelkezzenek (pl. *Hanseniaspora uvarum* és *Kloeckera apiculata*), nem tartható fenn. 2013. január 1-től egy gombának csak egy neve lehet, az anamorf alakok külön elnevezését lehetővé tevő duális rendszer ezzel megszűnt. Továbbá, a csupán egy fejlődési alak (anamorf vagy teleomorf) alapján, legitim módon közölt nevek egyaránt szolgálhatnak az adott faj érvényes neveként, függetlenül attól, hogy ivaros vagy ivartalan állapotú a típusanyaguk (Hawksworth, 2011, McNeill és mtsai, 2012). A duális nomenklatura eltörlését a molekuláris taxonómia eredményei tették lehetővé. Ma már nagy biztonsággal megállapítható két gombáról (köztük két élesztőgombáról), hogy egy fajhoz tartoznak-e, akkor is, ha esetleg morfológiájuk és egyéb fenotípusos bélyegeik ezt nem teszik lehetővé.

A Melbourne Kód életbe lépése megnyitotta az utat a polifiletikus nemzetségek, mint pl. a *Candida* vagy a *Cryptococcus*, fajainak filogenetikai rokonságuknak megfelelő monofiletikus nemzetségekbe sorolása előtt. A The Yeasts: A Taxonomic Study 5. kiadásában a *Candida* nemzetségnek például 314 faja került tárgyalásra, de a szerzők további 51 *Candida* fajt sorolnak fel, amelyek túl későn kerültek leírásra ahhoz, hogy a monográfia tárgyalhassa azokat (Lachance és mtsai, 2011b). A nemzetség „fénykorában” még ennél is több fajt tartalmazott. Daniel és mtsai (2014) különböző taxonomiai és szakirodalmi adatbázisok áttekintése után 2014 februárjában 434 *Candida* fajt számoltak össze. A filogenetikai rokonsági viszonyok és a Melbourne Kódban közzétett nomenklaturai szabályok figyelembevételével várható, hogy a *Candida* a nemzetség a típusfaját, a *C. vulgaris*-t (*C. tropicalis*), a *C. albicans*-t és az aszkospóra képző *Lodderomyces elongisporus*-t magába foglaló monofiletikus csoportra fog redukálódni, az ezzel a csoporttal közvetlen rokonsági kapcsolatban nem álló *Candida* fajok számára pedig vagy új nemzetségek kerülnek bevezetésre, vagy a már meglévő teleomorf nemzetségekbe nyernek besorolást. Ebből eredően azonban olyan nemzetségek jönnek/jöttek létre, amelyek a teleomorf fajok mellett olyan fajokat is tartalmaznak, amelyek ivaros szaporodása nem ismert. Ennek a problémának az áthidalására Lachance (2012) egy informális javaslatot tett, amely szerint a teleomorf

fajokat is tartalmazó nemzetségekbe sorolt anamorf élesztőgombák esetében a „*forma asexualis*” (*f. a.*) megjelölés fajnévhez illesztése azt jelzi, hogy az adott faj ivaros szaporodása egyelőre nem ismert.

A gombák (valamint az algák és növények) nevezéktanának aktuális szabályrendszerét jelenleg a 2018-ban napvilágot látott Shenzhen Code (Turland és mtsai, 2018) tartalmazza. A Shenzhen Code azonban nem hozott olyan radikális változásokat a gombák nevezéktanában, mint hat évvel korábban a Melbourne Code.

Az élesztőgombák osztályozása

A XIX. század első felében Cagniard-Latour, Kützing és Schwann rájöttek arra, hogy az élesztő egy élő organizmus és Schwann felismerte azt is, hogy az élesztők a gombák közé tartoznak. 1904-ben Hansen már az élesztőgombák rendszerezésével foglalkozó publikációt közölt (Barnett, 2004). Az élesztőgombák rendszertana megszületése óta folyamatos átalakuláson megy keresztül. Az élesztőgomba taxonómiában kiemelkedő szerepet tölt be az 1931-től jegyzett ún. „Holland Iskola” illetve annak továbbvivői (Barnett, 2004). A jelenleg aktuális élesztőgomba monográfia (Kurtzman és mtsai, 2011a) első kiadása 1952-ben látott napvilágot (Lodder és Kreger-van Rij, 1952). Az élesztőgombák osztályozása, csakúgy, mint azonosítása és az új fajok leírása az 1900-as évek végéig elsősorban fenotípusos sajátságokon alapult. Említést érdemel két magyar taxonómus; Novák Ervin Károly és Zsolt János, akik a rendelkezésükre álló fenotípusos adatok alapos elemzése alapján 1961-ben új rendszert javasoltak az élesztőgombák osztályozására (Novák és Zsolt, 1961). A rendszert az ivaros és ivartalan szaporodás alaktani jellemzőire (mikromorfológia), hat szénforrás erjesztésére, nyolc szénforrás és a nitrát asszimilációjára, a keményítőképzésre és a karotinoid anyagok szintézisére való képesség meglétére, ill. hiányára alapozták. Az általuk javasolt számos új taxon közül a Lipomycetaceae család ma is érvényes, bár az abba sorolt nemzetségek köre idő közben megváltozott.

A múlt század végére nyilvánvalóvá vált, hogy az élesztőgombák fenotípusos bélyegekre alapozott rendszertani azonosítása sokszor nem megbízható, a fenotípuson alapuló osztályozás pedig gyakran nem tükrözi a tényleges filogenetikai rokonsági viszonyokat, számos nemzetség polifiletikus (Kurtzman és mtsai, 2011d). Kurtzman és Robnett (1998) valamint Fell és mtsai (2000) korábban említett mérföldkönek számító munkáit követően egyre határozottabbá vált a törekvés az élesztőgombák osztályozásának filogenetikai alapokra

helyezésére. Az ennek a célnak a megvalósítására irányuló munka számos eredménye, már megjelent az élesztőmonográfia legutóbbi kiadásában (Kurtzman és mtsai, 2011a). A szerzők az élesztőgombák rokonsági kapcsolatait vagy a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának nukleotid szekvencia elemzésére alapozva vagy, elsősorban az aszkuszos élesztőgombák esetén, több gén szekvenciájának együttes elemzésére (multigén filogenetikai analízis) alapozva térképezték fel. A monográfiában részletesen tárgyalt 1265 élesztőgombafajt 72 teleomorf és 14 anamorf Ascomycota, valamint 34 teleomorf és 28 anamorf Basidiomycota nemzetségbe sorolták. Az aszkuszos élesztőgombák az Ascomycota törzs két altörzsébe (Taprinomycotina és Saccharomycotina) nyertek besorolást, míg a bazídiumos élesztőgombák a Basidiomycota törzs valamennyi altörzsében (Agaricomycotina, Pucciniomycotina és Ustilaginomycotina) megtalálhatóak. Az aszkuszos és bazídiumos élesztőgombákon kívül helyet kapott még a monográfiában a *Prototheca* nemzetségbe sorolt 7 élesztőgomba-szerű algafaj is. A részletesen tárgyalt fajokon kívül számos további fajt is felsorolnak a szerzők, amelyek túl későn kerültek leírásra ahhoz, hogy érdemben tárgyalásra kerülhessenek a monográfiában.

Bár az élesztőgomba törzsek rendszertani azonosítására és a fajok egymástól való elkülönítésére továbbra is elsősorban a D1/D2 régió, illetve egyre nagyobb mértékben az ITS régió nukleotid bázissorrendjét is használják, az élesztőgombák osztályozását egyre inkább több gén nukleotid szekvenciáinak az elemzésére alapozzák (multigén analízis). Az aszkuszos gombák közé tartozó élesztők taxonómiáját érintő, 2011 után megjelent publikációk közül kiemelésre érdemes Kurtzman és Robnett (2013) munkája, amelynek során 70 élesztőgomba nemzetség típusfajainak filogenetikai rokonsági kapcsolatait vizsgálták 5 génszakasz [a rRNS nagy és kis alegységét kódoló gén, a transzlációs elongációs faktor-1 α (EF-1 α) gén és az RNS polimeráz II gén 1-es és 2-es alegységei] csaknem teljes nukleotid szekvenciái alapján. Az elemzés megerősítette, hogy valamennyi vizsgált Saccharomycotina altörzsbe sorolt élesztőgombafaj egy nagy kládot alkot, amely számos kisebb, egy vagy több nemzetséget magába foglaló csoportra tagozódik. Több gén bázissorrendjének elemzése (multigén analízis) alapján számos új nemzetség is leírásra került. Ezek közé tartozik az élesztőgombák élelmiszeripari szerepét is kutató Deák Tiborról elnevezett *Deakozyma* nemzetség (Kurtzman és Robnett, 2014a).

A bazídiumos élesztőgombák rendszertanában nagy előrelépést jelentettek a holland Boekhout által vezetett kutatócsoport nemrégiben közölt eredményei. (Liu és mtsai, 2015a; 2015b; Wang és mtsai 2015a, 2015b; 2015c). Szintén több (7) gén bázissorrendjének

elemzésére alapozva igyekeztek a nagy polifiletikus nemzetségeket, mint például a jól ismert (*Cryptococcus* és *Rhodotorula*) kisebb, genetikailag jól körülhatárolt monofiletikus nemzetségekre tagolni. A monumentális munka eredményeként számos új családot, 46 új nemzetséget és 325 új kombinációt javasoltak. Az új nemzetségek között található az üszöggombák kutatása terén kimagasló eredményeket felmutató Vánky Kálmánról elnevezett *Kalmanozyma* nemzetség is (Wang és mtsai, 2015a).

Rokas és mtsai (2003) a *Saccharomyces* nemzetség 8 fajt vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy egy vagy néhány gén DNS bázissorrendjének analízise alapján készített törzsfák között gyakoriak az ellentmondások, és a megfelelő statisztikai megbízhatóságú törzsfák készítéséhez legalább 20 gén együttes vizsgálata szükséges. A nagyobb nemzetségekhez tartozó fajok közötti rokonsági viszonyok megbízható feltárásához még több gén DNS bázissorrendjének elemzésére van szükség, csakúgy, mint a nemzetségek családokba sorolásához (Kurtzman és mtsai, 2015). Bár a több gén DNS bázissorrendjének elemzésén alapuló munkák jelentős eredményeket hoztak az élesztőgombák osztályozásában, számos nemzetség továbbra is parafiletikus vagy polifiletikus, míg a családok vagy a családoknál magasabb szintű rendszertani egységek körülhatárolása statisztikailag sokszor nem kellően alátámasztott (Hittinger és mtsai, 2015; Shen és mtsai, 2016).

További jelentős előrelépés várható a genom léptékű filogenetikai elemzésektől. Shen és mtsai (2016) a 2016 januárjában a nyilvános adatbázisokban korlátozás nélkül hozzáférhető teljes genom szekvenciákat használták fel a *Saccharomycotina* altörzsbe sorolt élesztőgombák törzsfajlódási, rokonsági kapcsolatainak feltárására. Az akkor rendelkezésükre álló 86 élesztőgomba genom szekvenciából több mint 1 200 fehérjekódoló gén nukleotid bázissorrendjét vették figyelembe elemzéseikben. A 86 élesztőgomba a *Saccharomycotina* 11 nagy leszármazási vonala közül 9-nek a képviselőit tartalmazta. A különböző elemzési módszerek alkalmazása hasonló eredményekhez vezetett. A *Saccharomycotina* altörzs vizsgálatba vont fajok közötti rokonsági kapcsolatokat statisztikailag megbízható törzsfák formájában vázolták fel (Shen és mtsai, 2016). A jelenleg is dinamikusán futó Y1000+ Projekt (<https://y1000plus.wei.wisc.edu/>) elsődleges célja *Saccharomycotina* altörzsbe sorolt valamennyi élesztőgomba genom nukleotid bázissorrendjének a meghatározása (öt éven belül) törzsfajlódásuk, anyagcseréjük és ökológiai szerepük megismerése céljából. Shen és mtsai (2018) már 332 *Saccharomycotina* faj törzsfáját rajzolták meg 1 759 gén analízise alapján.

Az élesztőgomba genomok szekvenálása tovább folytatódik. A genom léptékű DNS bázissorrend adatok elemzésétől várható a statisztikailag megbízható, a törzsfejlődést jól rekonstruáló törzsfák megalkotása és az élesztőgombák minden eddiginél megalapozottabb osztályozása.

Néhány kiemelkedő élelmiszeripari jelentőségű élesztőgomba csoport

Általában ismert, hogy az egyes élelmiszerek, élelmiszer-összetevők és adalékanyagok előállításához milyen tulajdonságú élesztőgombákra van szükség. Néhány esetben már azt is tudjuk, hogy ezek a tulajdonságok hogyan vannak kódolva a génállományban. Ezek az ismeretek az új technológiákkal párosulva lehetőséget biztosítanak új élelmiszeripari termékek és tökéletesített gyártási eljárások kifejlesztésére, amelyekhez új, a természetből izolált vagy akár genetikailag módosított (GM) élesztőgomba törzseket alkalmaznak (Hittinger és mtsai, 2018). Az első GM élesztőgomba, amelynek élelmiszeripari alkalmazását engedélyezték a *S. cerevisiae* volt. Az Egyesült Királyságban 1990-ben hagyták jóvá egy megnövelt széndioxid termelésű *S. cerevisiae* törzs sütőipari alkalmazását (Aldhous, 1990). A GM élesztőgombák alkalmazását azonban korlátozza az országonként változó, szabályozás és a fogyasztók általi kedvezőtlen fogadtatás (Johnson, 2013). A GM élesztőgombák által termelt anyagokat, például enzimeket, felhasználásuk szerint élelmiszer-összetevők, élelmiszer-adalékanyagok és technológiai segédanyagok közé sorolhatjuk (Spohner és mtsai, 2015). A technológiai segédanyagokra, amelyeket csak az élelmiszer előállításának folyamata során használnak, azaz az élelmiszerben nincs jelen a géntechnológiával módosított alapanyagból származó anyag, nem vonatkozik az Európai Parlament és a Tanács 1829/2003/EK rendelete a géntechnológiával módosított élelmiszerekről és takarmányokról. A heterológ protein expresszióra a *S. cerevisiae* mellett a *Yarrowia lipolytica*-t és a metanol-asszimiláló élesztőgombákat is kiterjedten alkalmazzák, ezért ezeknek az élesztőknek ez a felhasználási területe további kiemelkedő élelmiszeripari jelentőséget kölcsönöz.

A Yarrowia nemzetség

A *Y. lipolytica* jelentős, az adott környezeti tényezőktől és az aktuális törzs tulajdonságaitól függően pozitív vagy negatív, szerepet tölthet be, több élelmiszer, elsősorban tejtermékek, valamint húsok és húskészítmények esetében, emellett kiváló minőségű

takarmányozási célra felhasználható proteinforrás. Számos további, biotechnológiai szempontból figyelemreméltó tulajdonsággal is rendelkezik; szerves savakat (például citromsavat), hidrofób anyagokat (például többszörösen telítetlen zsírsavakat és karotinoidokat) termel; gyógyszerészeti és ipari fehérjék és enzimek heterológ expressziójára, bioüzemanyag termelésre valamint bioremediációs célra is felhasználható (Coelho és mtsai, 2010; Groenewald és mtsai, 2013). Sokrétű alkalmazása miatt ipari igáslónak is nevezik (Coelho és mtsai, 2010). Ez az élesztőgomba a korábban készített filogenetikai törzsfákon egy hosszú ág végén egyedüli fajként helyezkedett el (pl. Kurtzman és Robnett, 1998). Később DNS bázissorrend összehasonlítás (Bigey és mtsai, 2003) és polifázisos megközelítés (Knutsen és mtsai, 2007) eredményeként fény derült a faj heterogenitására, és a korábban a *Y. lipolytica* szinonimjai között nyilvántartott *C. deformans*-t önálló faji rangra helyezték vissza (Groenewald és Smith, 2013). Az utóbbi másfél évtizedben számos további *Yarrowia*, és a *Yarrowia*-kládba tartozó *Candida* faj is leírásra került (Péter és mtsai, 2004; Kurtzman, 2005a; Knutsen és mtsai, 2007; Limtong és mtsai, 2008; Groenewald és Smith, 2013; Chang és mtsai, 2013; Nagy és mtsai, 2013, 2014; Crous és mtsai, 2017, Liu és mtsai, 2018). Crous és mtsai (2017) a Melbourne Code (McNeill és mtsai, 2012) koncepciójának megfelelően a *Yarrowia*-kládba tartozó *Candida* fajokat, a törzsfá korai elágazásán elhelyezkedő *C. hispaniensis*-t leszámítva, új kombinációkként a *Yarrowia* nemzetségbe sorolták. Ezzel a *Yarrowia* nemzetség fajainak száma 14-re nőtt. Néhány újonnan leírt faj (*Y. divulgata*, *Y. keelungensis*, *Y. porcina*) és az ismételten faji rangra emelt *Y. deformans* a *Y. lipolytica*-tól az élesztő taxonómiában alkalmazott standard fenotípusos tulajdonságok alapján nem különíthető el (Nagy és mtsai, 2014), azzal egy kriptikus fajokból álló komplex csoportot (*Yarrowia lipolytica* komplex) alkot. Ebből következik, hogy a korábbi, fenotípus vizsgálatán alapuló azonosítási módszerek felhasználásával készült publikációkban *Y. lipolytica*-ként említett fajok között nagy valószínűséggel egyéb, a *Y. lipolytica*-val közeli rokonságban álló, fajok is szerepelnek, még azokban az esetekben is, amikor a szerzők az elvárható gondossággal jártak el a vizsgált törzsek rendszertani azonosítása során. Az élelmiszerekben előforduló *Yarrowia*-k biodiverzitásának feltárásában kutatócsoportunk is részt vett. Munkánk legfontosabb eredményei a későbbiekben kerülnek ismertetésre.

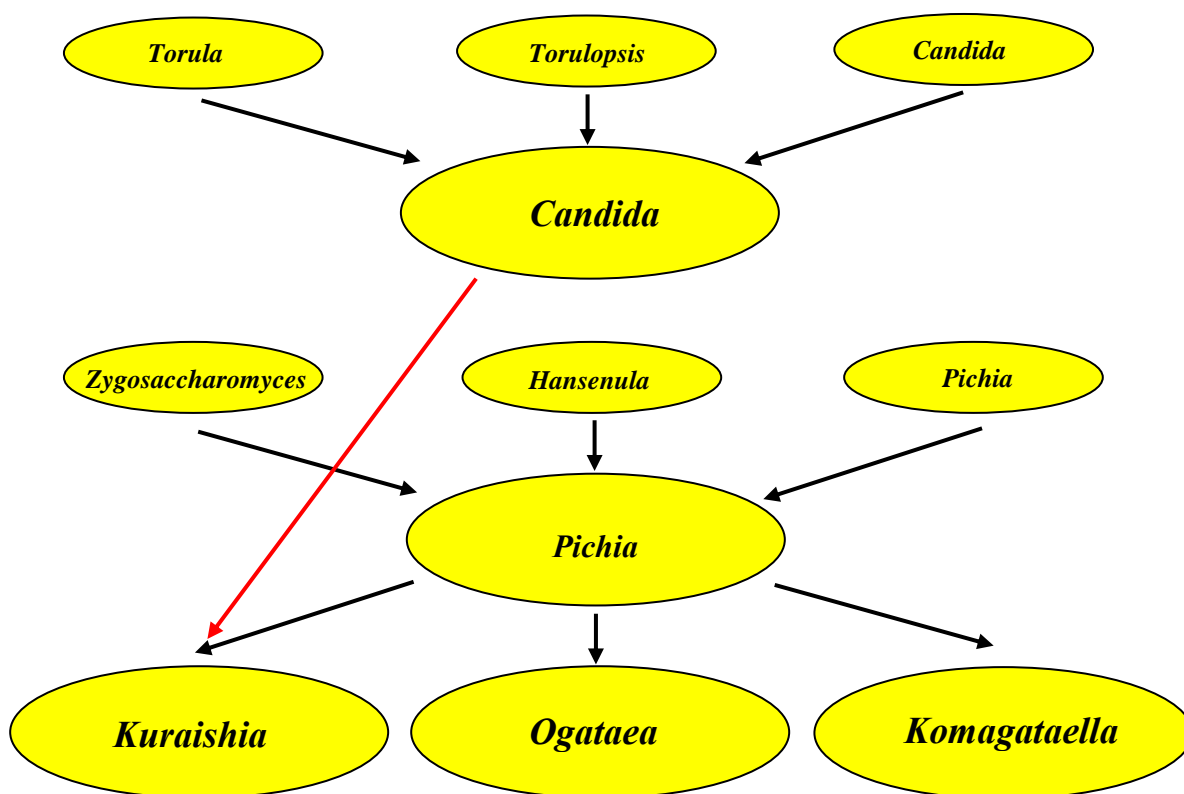
Metanol-asszimiláló élesztőgombák

Több mint 50 év telt el azóta, hogy Ogata és mtsai (1969) először számoltak be metanol asszimilációra képes élesztőgombáról. Amellett, hogy rendszeresen izolálhatók élelmiszerekből, üdítőitalokból és borból (Barnett és mtsai, 1990), egyes metanol-asszimiláló élesztőgombák enzimek és egyéb fehérjék heterológ expressziójának kiváló gazdaszervezeteinek bizonyultak, ezért kiemelkedő szerepet tölthetnek be az élelmiszerek előállításában is. A metanol-asszimiláló élesztőgombák további potenciális felhasználási területe az élelmiszer-ellátási láncban, a takarmányozási célra felhasználható glicerinnel metanol-mentesítése. A biodízel előállítása során melléktermékként nagy mennyiségű glicerinnel keletkezik, amely azonban metanolt is tartalmazhat. Chaucheyras-Durand és mtsai (2008) felvetették, hogy a *C. floccosa*-hoz és az *O. (Hansenula) polymorpha*-hoz hasonló tulajdonságokkal rendelkező élesztőgombákból olyan törzseket lehetne fejleszteni, amelyek a kérődző állatok bendőjében elegendő ideig életben maradnak és a takarmány kiegészítőként alkalmazott glicerinnel található metanolt metabolizálják.

A metilotróf élesztőgombák túlnyomó többsége az Ascomycota törzsbe tartozik, és jelenleg több mint 90, metanol-asszimilációra képes fajt ismerünk, ami az összes leírt élesztőgombának kevesebb, mint 5%-a. A metanol-asszimiláló élesztőgombák előfordulása gyakran növényekhez, növényi eredetű összetevőt tartalmazó élelmiszerekhez kötődik. Ez valószínűleg összefüggésben áll azzal, hogy metanol képződhet a lignin metoxi csoportjaiból (de Koning és Harder, 1992), illetve a növények pektin anyagcseréjének melléktermékeként (Fall és Benson, 1996). A növények gázcsere nyílásaikon keresztül metanolt bocsátanak a levegőbe, aminek egy része a levelek felszínéhez kötődik (Nemecek-Marshall és mtsai 1995). Ismert, hogy a levelek felszínét metanol asszimilációra képes baktériumok népesítik be (Corpe és Rheem, 1989), de metilotróf élesztőgombáknak a filloszférában való előfordulásáról az általunk (Péter és mtsai, 2007a) közölt adatokat megelőzően nem jelentek meg beszámolók.

Az 1990-es évek végére az Ascomycota törzsbe tartozó anamorfnal metilotróf élesztőgombákat a polifiletikus *Candida* nemzetségbe, míg a teleomorfnal fajokat az ugyancsak polifiletikus *Pichia* nemzetségbe sorolták (Kurtzman és Fell, 1998). A DNS, szekvencia elemzések nyilvánvalóvá tették, hogy sem a metanol-asszimiláló *Candida*, sem a metanol-asszimiláló *Pichia* fajok nem állnak szorosabb rendszertani kapcsolatban a két nemzetség típusfajaival [*C. vulgaris* (*C. tropicalis*), ill. *P. membranifaciens*]. Ezt felismerve, a korábban

a *Pichia* nemzetségbe sorolt metanol hasznosító élesztőgombákat a Yamada és mtsai (1994, 1995) által javasolt új nemzetségekbe (*Kuraishia*, *Ogataea*, *Komagataella*) sorolták át, ill. az újonnan leírt fajokat zömében már eleve ezekbe a nemzetségekbe helyezték. A metanol-asszimiláló *Candida* fajok közül a *Kuraishia* nemzetséggel rokon fajokat már átsorolták ebbe a nemzetségbe (Kurtzman és Robnett, 2014b), az *Ogataea*-kládba tartozó *Candida* fajok még átsorolásra várnak, míg a *Komagataella*-klád valamennyi eddig ismert faja aszkospórát képez (2. ábra).



2. ábra. A Saccharomycotina altörzsbe sorolt metanol-asszimiláló élesztőgomba fajok nemzetség szintű rendszertani besorolásának változása

A kutatások célkitűzései

Az irodalmi áttekintésben röviden bemutatott DNS bázissorrend alapú rendszertani azonosítás gyors térnyerésének és az ezredfordulóra létrejött és azóta folyamatosan aktualizált vonalkód DNS szekvencia (elsősorban a rRNS kódoló gén D1/D2 régiója és az ITS régió) adatbázisnak (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) köszönhetően a korábban alkalmazott fenotípus-alapú rendszertani azonosításnál sokkal gyorsabb, pontosabb és hatékonyabb élesztőgomba azonosítási módszer vált elérhetővé. A DNS bázissorrend alapú azonosítási módszereknek köszönhetően kriptikus fajcsoportok létre derült fény, és számos élőhely, köztük az élelmiszerek élesztőgomba biodiverzitásának a korábbinál részletesebb feltárása vált lehetővé.

A DNS bázissorrendek összehasonlítására alapozott azonosítási módszerek adta lehetőséget kihasználva, célul tűztük ki az élesztőgombák biodiverzitásának minél részletesebb feltárását természetes és ember alkotta mesterséges élőhelyeken, köztük élelmiszerekben, valamint az esetlegesen izolálásra kerülő új fajok rendszertani helyének meghatározását, fenotípusos jellemzését és leírását. A törzsgyűjtemények klasszikus szerepét és lehetőségeinket figyelembe véve, a manapság méltán népszerű DNS kivonáson alapuló környezetmikrobiológiai eljárások helyett, a klasszikus, tenyésztésre alapozott eljárásokat alkalmaztuk. Erre azért is szükség volt, mert a munkánk során felhalmozódott élesztőgomba törzsek kiválasztott képviselőit a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményének nyilvános részében kívántuk elhelyezni, ezzel biztosítva, hogy további kutatások céljára hozzáférhetőek legyenek. A napjainkban nem túl nagy tekintélynek örvendő tenyésztési eljárások melletti további érv, hogy bár a metagenomikus adatok információval szolgálhatnak az adott mikroba közösségben rejlő lehetőségekről, e potenciál kiaknázására a tényleges alkalmazások során továbbra is az élő, tenyészthető mikroorganizmusokra van szükség (Boundy-Mills és mtsai, 2016).

Az élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata hosszú múltra tekint vissza, és más mikroba csoportokhoz hasonlóan, nagy mennyiségű adat halmozódott fel az egyes élelmiszereket benépesítő élesztőgombákról is. A nukleinsav bázissorrend alapú rendszertani azonosítás alkalmazása előtt keletkezett adatok azonban magukban hordják a téves azonosítás lehetőségét, pl. a kriptikus fajok esetében, ezért azokat ennek tudatában kell értékelni. A megfelelő körülményekkel kivitelezett DNS szekvencia alapú rendszertani azonosítást alkalmazó tanulmányok ezt a hibaforrást kiküszöbölik, a korábbinál pontosabb, árnyaltabb

képet nyújtanak az egyes élelmiszerek élesztőgomba közösségeinek faji összetételéről. Célul tűztük ki néhány élelmiszerekből rendszeresen izolált nagy jelentőségű élesztőgomba csoport, pl. a *Yarrowia* nemzetség képviselőinek izolálását és az izolált törzsek DNS szekvencia alapú rendszertani azonosítását, valamint az élelmiszerek minőségére gyakorolt hatásukban kulcsszerepet játszó néhány tulajdonság vizsgálatát.

Az általánosan alkalmazott tenyésztési eljárások során a domináns fajoktól több nagyságrenddel elmaradó számbeli kisebbségben lévő fajok képviselői sokszor rejtve maradnak. Igyekeztünk ezért néhány kisebb számarányban jelen lévő komponenst, pl. a *Yarrowia* nemzetség fajait tejből, tejtermékekből és húsokból, valamint a *Saccharomyces* fajokat szőlőről, és a metanol-asszimiláló élesztőgombákat különböző élőhelyekről kimutatni és izolálni. Ehhez, részben általunk kifejlesztett, dúsítási eljárásokat alkalmaztunk, hogy a korábban rejtve maradt kis számarányban jelenlévő élesztőgomba fajok is detektálásra és izolálásra kerüljenek.

Akadnak olyan élelmiszerek is, mint pl. az évezredek óta fogyasztott olívaolaj, amelyekről meglepő módon csak nemrégiben derült ki, hogy élesztőgombák élőhelyei. Ennek tudatában igyekeztünk az olívaolaj élesztőgomba biodiverzitásának feltárásában részt vállalni. Az olívaolaj hidrofób tulajdonságából adódóan a szokványos tenyésztési mikrobiológiai módszerek alkalmazása körülményes és nem kellően hatékony, ezért célul tűztük ki az élesztőgombáknak az olívaolajból történő izolálására alkalmas hatékony módszer kidolgozását.

Mivel az élesztőgombák ökológiai szerepének megértését nagymértékben elősegíti fiziológiai jellemzőik ismerete, az általunk izolált törzsek zömének fenotípusos jellemzését is elvégeztük, annak ellenére, hogy rendszertani azonosításukhoz a fenotípusos bélyegekre egyre kisebb mértékben támaszkodhattunk. Az értekezés során elsősorban azoknak az eredményeinknek a bemutatására szorítkozom, amelyek vagy élelmiszerekből izolált élesztőgombákkal kapcsolatosak, vagy az élelmiszerektől eltérő szubsztrátumokról izolált, de potenciális élelmiszeripari jelentőségű élesztőgombákra vonatkoznak. Ezen belül kiemelt figyelmet szentelek az általunk leírt új élesztőgomba fajoknak. Az élelmiszerekből izolált új, a tudomány számára korábban ismeretlen fajok esetében, amennyiben fenotípusos tulajdonságaik az izolálási forrásul szolgáló élelmiszer tulajdonságaival összevetve erre lehetőséget adtak, megkíséreltük az adott élelmiszerben betöltött lehetséges szerepük meghatározását is.

Anyagok és módszerek

Mintagyűjtés és az élesztőgombák izolálása

A mintagyűjtés steril módon történt a minta jellegének megfelelően. A folyékony mintákat általában steril, csavaros kupakkal ellátott laboratóriumi üvegekbe, a szilárd mintákat pedig steril műanyag zacskókba vagy laboratóriumi üvegekbe gyűjtöttük steril eszközökkel (spatula, nyelvlapoc, csipesz, olló). A különböző szilárd felületeket, például élelmiszeripari berendezések felületét, fakérget stb., valamint fa exudátumokat steril tamponnal mintáztuk meg. A mintákat a lehető leggyorsabban a laboratóriumba szállítottuk, amennyiben lehetséges volt, hűtött körülmények között (hűtőtáskában, jégakkuval), és a mikrobiológiában általánosan használt módszerek alkalmazásával, a lehető legrövidebb időn belül dolgoztuk fel őket.

A folyékony halmazállapotú mintákból peptonvízzel (0,1% pepton, 0,9% NaCl) decimális hígítási sort készítettünk, amelynek tagjaiból 0,1-0,1 ml-t a minta jellegének megfelelő tápagarlemez felületére szélesztettünk. Szilárd halmazállapotú minták esetében, amennyiben a minta mennyisége ezt lehetővé tette, 10 gramm mintához 90 ml peptonvizet adtunk és Stomacher homogenizátorban 2 percig homogenizáltuk, ezt követte a hígítási sor készítése és a felületi szélesztés. A tamponnal vett minták esetében a tampont 5 ml peptonvizet vagy dúsító közeget (lásd később) tartalmazó 16 mm-es kémcsőbe helyeztük, majd kémcsőkeverővel végzett alapos keverés után a fent leírtak szerint folytattuk a minta feldolgozását. Amennyiben kicsi volt a minta várható élesztőgomba száma, például vízminták esetében, membránszűrési módszert is alkalmaztunk az élesztőgombák kitenyésztéséhez. Néhány minta típust a fentiekől eltérően dolgoztunk fel. A méhkenyert tartalmazó lép sejtjeinek tartalmát például egyszer használatos steril műanyag oltókaccsal szélesztettük az agar lemezek felszínére.

Leggyakrabban Rose-Bengal-Chloramphenicol (RBC) agart (Merck 1.00467) használtunk az élesztőgombák kitenyésztéséhez. Ha a chloramphenicol rezisztens baktériumok jelenléte nem tette lehetővé az RBC agar alkalmazását, akkor steril 1N sósavval pH 3,5-3,7 értékre állított glükóz-pepton-élesztőkivonat agart (Kurtzman és mtsai, 2011c) alkalmaztunk. Amennyiben a minták gyorsan növekvő penészgomba propagulumokat tartalmaztak, az RBC agar helyett Dichloran-Rose-Bengal-Chloramphenicol (DRBC) agart (Merck 1.00466) használtunk. Kis vízaktivitású minták (például méz, méhkenyér) feldolgozásakor az RBC agar mellett 30%-os glükóz agart [glükóz 30% (m/m), élesztőkivonat

0,5%] és/vagy 50%-os glükóz agart [glükóz 50% (m/m), élesztőkivonat 0,5%] is alkalmaztunk az élesztőgombák kitenyésztésére.

A leoltott agarlemezeket 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk sötétben, minimum 5-7 napig, amennyiben ezt nagyszámú vagy gyorsan növekedő penészgomba telepek kifejlődése nem akadályozta meg.

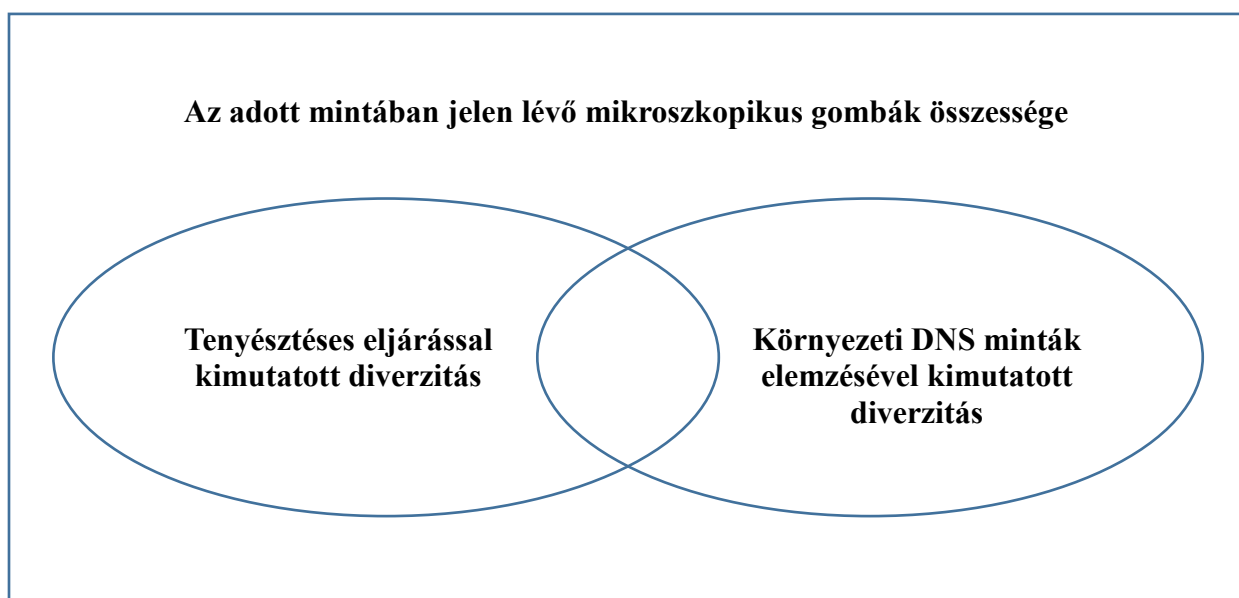
A kifejlődött élesztőgomba telepeket, makro- és mikromorfológiai tulajdonságaik alapján tipizáltuk. Minden teleptípusból egy vagy néhány törzset izoláltunk és két egymást követő szélesztéssel tisztítottuk glükóz-pepton-élesztő kivonat agaron, amennyiben ezen a táptalajon képesek voltak szaporodni. Az izolált törzseket a további vizsgálatokig 2%-os maláta kivonat agaron, hűtőszekrényben és/vagy cseppfolyós nitrogénben és/vagy fagyasztva szárítva tároltuk. Az obligát ozmofil törzsek izolálása, tisztítása és fenntartása 30%-os glükóz agaron történt.

A fent leírt általánosan használt minta feldolgozási eljárások mellett, vagy olykor azok helyett, ritkábban használt vagy teljesen új, általunk kidolgozott módszereket alkalmaztunk egyes speciálisan megcélzott élesztőgomba csoportok izolálása vagy a minta természetéből adódó technikai nehézségek leküzdése céljából. A fentiektől eltérő, általunk gyakrabban használt eljárásokat az alábbiakban ismertetem röviden.

Többször használtunk különféle szelektív dúsításos eljárásokat egyes élesztőgomba csoportok izolálása céljából. A dúsításos eljárások hátrányaik (például a minta eredeti élesztőgomba számára és összetételére nem lehet következtetni dúsítást követően) mellett jelentős előnyöket biztosíthatnak. A megfelelően megválasztott dúsítási eljárást követően az élesztőgomba célcsoport képviselői gyakran olyan mintákból is sikerrel izolálhatók, amelyekből dúsítás nélkül erre kevés esély nyílik. Azok a mikroorganizmusok ugyanis, amelyek a telepképző mikroba közösség domináns összetevőinek 0,5-1%-ánál kisebb arányban vannak jelen, az egyszerű felületi szélesztéses eljárások alkalmával kimutathatatlanok maradhatnak (Flannigan és Campbell, 1977). A környezeti DNS minták elemzése ugyan ennél jóval érzékenyebb, akár 1-2 nagyságrenddel nagyobb a kimutatott gomba fajok száma, mint tenyésztéses módszerek alkalmazása esetén (pl. Menkis és mtsai, 2005), céljainkat jobban szolgálta a tenyésztéses módszerek alkalmazása, ugyanis az általunk vizsgált élőhelyekre jellemző élesztőgomba közösségeket reprezentáló törzsekkel a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményét is gyarapítani kívántuk. Emellett, az egyes élesztőgombáknak az adott élőhelyen betöltött ökológiai szerepének a megértéséhez, valamint esetleges ipari, biotechnológiai felhasználási lehetőségeinek

feltárásához szükséges az izolált törzsek fenotípusos jellemzése is. A tudomány számára új élesztőgomba fajok leírására pedig hosszú ideje csak a típustörzs törzsgyűjteményekben történő letétbe helyezését követően van lehetőség.

További érv a tenyésztési módszerek alkalmazása mellett, hogy míg a Sanger féle DNS szekvenálás során a kis gyakorisággal előforduló DNS variánsok másodlagos csúcsoikként jelennek meg, addig a környezeti DNS „Next Generation Sequencing” (NGS) segítségével történő vizsgálata az alfa diverzitás túlbecslését eredményezi a kis gyakorisággal előforduló DNS variánsok miatt (Roscini és mtsai, 2018). Egyes közleményekből az is nyilvánvaló, hogy a tenyésztési módszereken, és a metagenomikus DNS szekvenálásán alapuló tanulmányok által detektált faj spektrumok olykor csak kis mértékben fedik át egymást. Az azonos mintákból kimutatott, a két módszerrel, faj szinten azonosított taxonok közötti átfedés olykor elhanyagolható (Jayawardena és mtsai, 2018). Feltételezhető, hogy a két módszer együttes alkalmazásával is csak a teljes biodiverzitás egy részét tárjuk fel (3. ábra). A hagyományos tenyésztési eljárások további előnye, hogy azok az izolált törzsek többségének pontos faj szintű rendszertani azonosítását teszik lehetővé, míg a tenyésztés-független módszerek esetében sokszor csak nemzetség vagy család szintű azonosítást sikerül elérni (Jayawardena és mtsai, 2018).



3. ábra. A mikroszkopikus gombák diverzitásából feltárt rész az alkalmazott módszerek függvényében

A *Saccharomyces* és *Yarrowia* nemzetségekbe tartozó törzsek izolálására új módszereket fejlesztettünk ki és írtunk le, csakúgy, mint az élesztőgombák olívaolajból történő izolálására. A metanol-asszimiláló élesztőgombák izolálását megelőzően a vizsgált szubsztrátumokat a megszokottól eltérő összetételű tápközegben dúsítottuk. Az alábbiakban ismertetem ezeket a módszereket.

***Saccharomyces* törzsek izolálása szőlőről**

A szőlő mintákat 2004-ben a szüreti időszakban gyűjtöttük az Egri Borvidéken. A tizenhét vizsgált minta közül 13 a szüretkor, 5 minta pedig 17-23 nappal a szüretet megelőzően került begyűjtésre (2. táblázat). Mintánként egy, vagy kis fürtök esetén néhány fürtöt steril ollóval kisebb darabokra vágunk és szelektív dúsítás céljából 0.5% (m/v) glükózzal és 1/10 térfogat (50 ml/500 ml tápközeg) metanollal (Merck) kiegészített Yeast Nitrogen Base with Amino Acids (Sigma Y1250) táplevesbe helyeztük 1000 ml térfogatú csavaros kupakkal ellátott laboratóriumi üvegbe. A dúsításhoz felhasznált minták tömege 122-272 gramm között volt. A mintákat tartalmazó laboratóriumi üvegeket 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk körkörös síkrázógépen (100 rpm) 7-10 napig. A dúsított mintákból felületi szélesztést [RBC agar (Merck 1.00467)] végeztünk és 5-7 napos sötétben történő inkubációt követően valamennyi morfortípust képviselő élesztőgombából 1-1 törzset izoláltunk, és fent leírtak szerint tisztítottuk őket. A módszer elméleti alapját az adja, hogy előzetes vizsgálataink alapján a kiemelkedő etanol-toleranciával rendelkező *Saccharomyces*-ek nagyobb metanol tartalmú tápközegben is képesek szaporodni, mint a szőlőn megtalálható egyéb élesztőgombák többsége. Ezért, megfelelően megválasztott metanol-koncentrációjú tápközegben való dúsítást követően, sokkal nagyobb valószínűséggel izolálhatók *Saccharomyces* törzsek szőlőről, mint dúsítás alkalmazása nélkül (Péter és mtsai, 2011a).

Élesztőgombák izolálása olívaolajból és olívaolaj üledékből

A munkánk során vizsgált olívaolaj minták részben a kereskedelmi forgalomból, részben az Igazioliva Olívaolaj-szaküzletből (Pomáz) szereztük be, és a Mediterrán térség 8 országából (Portugália, Spanyolország, Olaszország, Szlovénia, Horvátország, Montenegró, Törökország, Izrael) származtak. Az olívaolaj üledék minták szlovén kistermelőktől származtak.

2. táblázat. A szőlőről izolált *Saccharomyces* törzsek eredete és néhány fenotípusos tulajdonsága

A minta sorszáma	Szőlőfajta	Földrajzi hely	A szüretig hátralévő napok száma	<i>Saccharomyces</i> törzsek (NCAIM)	Spóraszám/aszksz	D-galaktóz erjesztés	Asszimiláció				
							D-galaktóz	α , α -Trehalóz	Metil- α -D-glükózid	Melecitóz	Glicerín
1	Leányka	Kőlyuktető	0	Y.01898 Y.01899	2 - 4 2 - 4	+	+	+	-	-	-
2	Kékfrankos	Kőlyuktető	23	Y.01900 Y.01901	1 - 4 1 - 2	+	+	+	-	1 1	+ -/1
3	Merlot	Kőlyuktető	17	Y.01902	1 - 4	+	+	+	-	-/gyl	-/1
4	Pinot noir	Kőlyuktető	23	-							
5	Cabernet franc	Kőlyuktető	23	Y.01903 Y.01904 Y.01905 Y.01906	1 - 4 1 - 4 1 - 4 1 - 4	- + + -	- + + -	1 + + +	1 - - -	- 1 - -	+ + - -
6	Cabernet sauvignon	Kőlyuktető	23	-							
7	Pinot blanc	Kőlyuktető	0	Y.01907 Y.01908	1 - 4 1 - 2	- +	- +	+	-	+	-
8	Chardonnay	Kőlyuktető	0	Y.01909 Y.01910	1 - 4 1	+	+	+	-	-	1 -
9	Kékfrankos	Kőlyuktető	0	Y.01911 Y.01912 Y.01913	1 - 4 1 - 4 1 - 4	- + +	- + +	+	-	1 -/1 1	-/gyl - 1
10	Kékfrankos	Nagygalagonyás	0	Y.01914 Y.01915	1 - 2 1 - 4	+	+	+	-	1 1/gyl	- 1
11	Kékfrankos	Síkhegy	0	Y.01916 Y.01917	1 - 4 1 - 4	+	+	+	-	-/1 1	- 1
12	Kékfrankos	Nagyeged-alsó	0	Y.01918 Y.01919 Y.01920 Y.01921	2 2 - 4 1 - 2 2	+	+	+	+	1 1 1 1	- - - -
13	Kékfrankos	Nagyeged-felső	0	Y.01922 Y.01923	2 - 4 1 - 4	+	+	+	+	1 1	1 -
14	Pinot noir	Kőlyuktető	0	Y.01924 Y.01925	1 - 4 1 - 2	+	+	+	-	1 -	-/1 -
15	Kékfrankos	Kőlyuktető	0	Y.01926 Y.01927	2 1 - 4	+	+	+	-	- 1	- 1

16	Cabernet franc	Kőlyuktető	0	Y.01928 Y.01929	1 - 4 1	+	+	+	-	-/1 -	- -
17	Cabernet sauvignon	Kőlyuktető	0	Y.01930	1 - 4	+	+	+	+	1	-
18	Hárslevelű	Feldebrő-Szőlőhát	0	Y.01931 Y.01932	1 - 2 1 - 4	+	+	+	- -/1	-/1 1	- 1

1: lassú (7 napnál hosszabb inkubációt követő) pozitív reakció; gy: gyenge asszimiláció

Az olívaolaj és olívaolaj üledék minták feldolgozására három különböző módszert alkalmaztunk. Az első feldolgozási módszer a minták 0,1 ml-ének RBC agarra szélesztését jelentette. A következő módszer során 80 mm átmérőjű steril szűrőpapír korongot (Schleicher and Schuell 2043 B) impregnáltunk 1 ml olíva olajjal 1 órán keresztül, majd az olajjal átitatott korongot helyeztük RBC agar felszínére. Mivel egyik módszer sem bizonyult elég hatékonynak (lásd eredmények) egy további módszert is kidolgoztunk az élesztőgombák olívaolaj és olívaolaj üledékből történő izolálására (Péter és mtsai, 2017a). 12,5 ml mintát és azonos térfogatú steril desztillált vizet mértünk 50 ml térfogatú csavaros kupakkal ellátott steril műanyag centrifugacsőbe. A centrifugacső tartalmának alapos összerázása után a mintában található élesztőgomba sejteket centrifugálással (9400 g, 5 °C, 5 perc) a vizes fázisba juttattuk, majd a felülúszó pipettával történő eltávolítása után az üledéket kémcsőkeverőn történő alapos keverés segítségével szuszpendáltuk a vizes fázisban. Ezt követően a szuszpenzió élesztőgomba koncentrációjának függvényében hígítást és felületi szélesztést vagy membránszűrést követően tenyésztettük ki az élesztőgombákat RBC agaron, 25 °C hőmérsékleten legalább 5-7 nap inkubációs idő során, majd a korábban leírtak szerint izoláltuk őket.

***Yarrowia* törzsek izolálása**

A *Yarrowia* törzsek célzott izolálására egyedüli szénforrásként hexadekánt tartalmazó táplevest használtunk dúsító közegként (Nagy és mtsai, 2013, Péter és mtsai, 2019a), mivel az eddig leírt *Yarrowia* fajok kivétel nélkül asszimilálják a hexadekánt, azon ismert élesztőgombáknak viszont, amelyeknél a hexadekán asszimilációra vonatkozó adat rendelkezésre áll, csak körülbelül 10%-a rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. A baktériumok szaporodását kis pH-jú tápközeg alkalmazásával szorítottuk vissza, mivel a húsokkal és csirkemájjal végzett előkísérletek során a chloramphenicol hatástalannak bizonyult erre a

célra. A dúsító tápközeg pH-jának steril sósavval történő beállítása szintén kevésbé volt hatékony, mert a fenti szubsztrátumok megemelték a közeg pH-ját. A leírtakat figyelembe véve az esetek zömében YNB (Sigma Y1250) + 0,5% (v/v) hexadekán összetételű táplevest alkalmaztunk két- vagy háromlépéses dúsításhoz. A dúsító táplevest vagy 3,6 pH értékű dinátrium-hidrogén-foszfát citrát pufferben (McIlvaine, 1921) vagy 34 g/l kálium-dihidrogén-foszfátot és a 3.5-3,6 pH érték eléréséig adagolt foszforsavat tartalmazó pufferben készítettük el.

A vizsgált hús, darált hús, máj, hal és tej minták részben minőségellenőrző laboratóriumokból származtak, részben üzletekben és piacokon kerültek beszerzésre. A szilárd halmazállapotú mintákból 10 vagy 20 grammot, míg a tejből 10 ml-t mértünk 250 vagy 500 ml-es csavaros kupakkal ellátott laboratóriumi üvegekbe, amelyek sorrendben 100 vagy 200 ml dúsító tápközegzet tartalmaztak. Az üvegeket horizontális síkrázógépen (100 rpm) inkubáltuk 25 °C-on hét napig. Darált húsok esetén 10 gramm mintát 90 ml peptonvízzel 2 percig Stomacher-homogenizátorban homogenizáltunk, majd a homogenizátumokból 1 ml-t adtunk 5 ml dúsító folyadékhoz, 16 mm átmérőjű kémcsőben. A kémcsöveket kémcsőforgató készüléken (30 rpm) inkubáltuk 25 °C-on hét napig. Ezt követően a dúsított tenyészetekből 0,1 ml-t adtunk 5 ml azonos összetételű dúsító tápközeghez, 16 mm átmérőjű kémcsőbe. Ezután újabb 7 napos inkubáció következett kémcsőforgató készüléken (30 rpm) 25 °C-on. A minták egy részénél a módszer szelektivitásának fokozása céljából egy, a másodikkal megegyező harmadik dúsítási lépés is beiktatásra került.

A dúsított tenyészetekből hígítási sort készítettünk, RBC agaron felületi szélesztést végeztünk, majd az inkubálást követően az egyes morfortípusok képviselőit izoláltuk és tisztítottuk a fent leírtak szerint.

Metanol-asszimiláló élesztőgombák izolálása

A metanol-asszimilációra képes élesztőgombákat kétlépéses dúsítást követően izoláltuk YNB + 0,5% (v/v) metanol összetételű táplevesben (Dlauchy és mtsai, 2003). Az általunk alkalmazott módszer hasonlít a metanol-hasznosító élesztőgombák dúsítására általában alkalmazott módszerekhez (van Dijken és Harder 1974), azzal az eltéréssel, hogy a dúsító tápközeg nem tartalmaz antibiotikumot a baktériumok szaporodásának visszaszorítása céljából. Szilárd minták esetében az első dúsítási lépés csavaros kupakkal ellátott laboratóriumi üvegekben történt az előző pontban leírtakhoz hasonlóan. Amennyiben a

rendelkezésre álló minta mennyisége ezt lehetővé tette, 10 g minta került dúsításra. A tamponnal vett minták feldolgozása során a tampont 5 ml dúsító táplevesbe helyeztük 16 mm átmérőjű kémcsőbe, majd kémcsőforgató készüléken (30 rpm) inkubáltuk 25 °C-on 7-14 napig. Az első mindkét esetben egy második, 7 napos dúsítási lépés követte az elsővel megegyező összetételű dúsító folyadékban a hexadekános dúsítással analóg módon, majd az élesztőgombák kitenyésztése, izolálása és tisztítása is az előző pontban leírtak szerint történt. A 0,5% (v/v) metanollal kiegészített YNB táplevesben való dúsítást és az RBC agaron való szélesztést alkalmazva több száz korhadt fa, fa exudátum és levél minta feldolgozása során a baktériumok egy esetben sem zavarták a metilotróf élesztőgombák izolálását (Péter és mtsai 2019a).

Az élesztőgombák fenotípusos jellemzése és rendszertani azonosítása

Az élesztőgombák fenotípusos jellemzése

Az élesztőgombák fenotípusos jellemzése a Yarrow (1998) és a Kurtzman és mtsai (2011c) által leírt módszerek segítségével történt. A szénforrás asszimilációt folyadék tenyészetben, a nitrogénforrás asszimilációt pedig auxanográfiás módszerrel vizsgáltuk. Az urea bontás képességét urea rapid broth (URB) tápközegben, az élesztőgombák fonal képzését pedig kukoricaliszt agaron, tárgylemez tenyészetben teszteltük. Az egyes törzsek spóráképzésének vizsgálatához leggyakrabban a következő táptalajokat használtuk: acetát agar, kukoricaliszt agar, ‘‘Spezieller Nährstoffarmer Agar’’ (SNA), burgonya-dextróz agar, 2%-os maláta kivonat agar, glükóz-pepon-élesztőkivonat agar, élesztő kivonat-maláta kivonat (YM) agar, V8 agar, hígított (1:10) V8 agar, yeast-carbon base (YCB) agar, 0,01% ammónium szulfáttal kiegészített YCB agar (YCBAS) [Kurtzman és mtsai (2011c), Nagy és mtsai (2014)]. A spóráképzés indukálására alkalmazott táptalajok köre egyes esetekben továbbiakkal bővült, pl. a *Yarrowia* törzsek esetében a YES agarral (Nagy és mtsai, 2014), az *O. pignaliae* törzsek esetén módosított nitrát agarral (Péter és mtsai, 2010). A tenyészeteket 15 és 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk legalább 3 héten keresztül, és hetente vizsgáltuk mikroszkóppal a spóráképzést. Amennyiben az egyes törzsek tiszta tenyészetei nem sporuláltak, akkor az azonos fajhoz tartozó törzsek kevert tenyészetével oltottuk le a spóráztató táptalajokat, hogy a heterotallikus törzsek esetén is lehetőség nyíljon a spóráképzés megfigyelésére. Amennyiben a kevert tenyészetekben spóráképzést figyeltünk meg, a törzsek

páronként összekevert tenyészetek vizsgálatával állapítottuk meg, hogy az egyes törzsek egymáshoz képest azonos vagy eltérő párosodási típusokhoz tartoznak-e.

A lipolitikus aktivitás vizsgálata a Marquina és mtsai (1992), valamint a Phaff és mtsai (1997) által leírt módszerek alkalmazásával történt. A *Yarrowia* törzsek barna pigment termelő képességét Carreira és Loureiro (1998) módszerével vizsgáltuk.

Az obligát ozmofil élesztőgomba (*Zygosaccharomyces favi* és *Schizosaccharomyces osmophilus*) törzsek fenotípusos jellemzésére a Kurtzman és mtsai (2011c) által leírt módszerek egy része alkalmatlannak bizonyult, csakúgy, mint a *Candida glucophila* (a korábban ismert egyetlen obligát ozmofil élesztőgomba faj) szénforrás asszimilációjának és erjesztésének vizsgálatára Tokuoka és mtsai (1987) által ajánlott módszer (a tápközegek 10% NaCl-dal való kiegészítése). A *Z. favi* és a *Sch. osmophilus* törzsek jellemzéséhez tehát a standard fenotípusos tesztek egy részének módosítására volt szükség, mivel obligát ozmofil tulajdonságuk miatt számos standard tápközegben nem szaporodtak. A makro- és mikromorfológiai tulajdonságok többségét 30%-os glükóz agaron vagy 30% glükózzal kiegészített táptalajokon vizsgáltuk. A *Z. favi* esetében az erjesztési próbákhoz a cukor koncentrációt 20%-ra (m/m) emeltük, a szénforrás asszimilációt pedig kevertágyas ioncserélő gyanta oszlopon tisztított (Anand és Brown, 1968) 50% (m/m) polietilén-glikol 200 (PEG 200) tartalmú tápközegben teszteltük. A nitrogénforrás asszimilációt, a különböző hőmérsékleteken, szaporodás gátló szerek jelenlétében és vitaminmentes tápközegben való szaporodás képességét, valamint a keményítőszerű anyagok képzését és a savtermelést a Kurtzman és mtsai (2011c) által leírt módszerekkel vizsgáltuk, de a tápközegek glükóz tartalmát minden esetben 30%-ra (m/m) emeltük (Čadež és mtsai, 2015). A *Sch. osmophilus* esetében az erjesztő képesség vizsgálatokor felhasznált tápleveseket 30% (m/m), míg az asszimilációs és az egyéb tesztek többsége során felhasznált tápközegeket 50% (m/m) szorbittal egészítettük ki a vízaktivitás csökkentése érdekében (Brysch-Herzberg és mtsai, 2019), mivel a vizsgált törzsek nem voltak képesek a szorbit hasznosítására.

A Yarrowia lipolytica ureáz aktivitásának vizsgálata

A kiválasztott *Y. lipolytica* törzsek ureáz aktivitását Urea rapid Broth (URB) levesben (Stuart és mtsai, 1945) és annak módosított változataiban, valamint Christensen's urea agaron (CUA) (Christensen, 1946) és a Christensen's urea agar módosított változatain teszteltük,

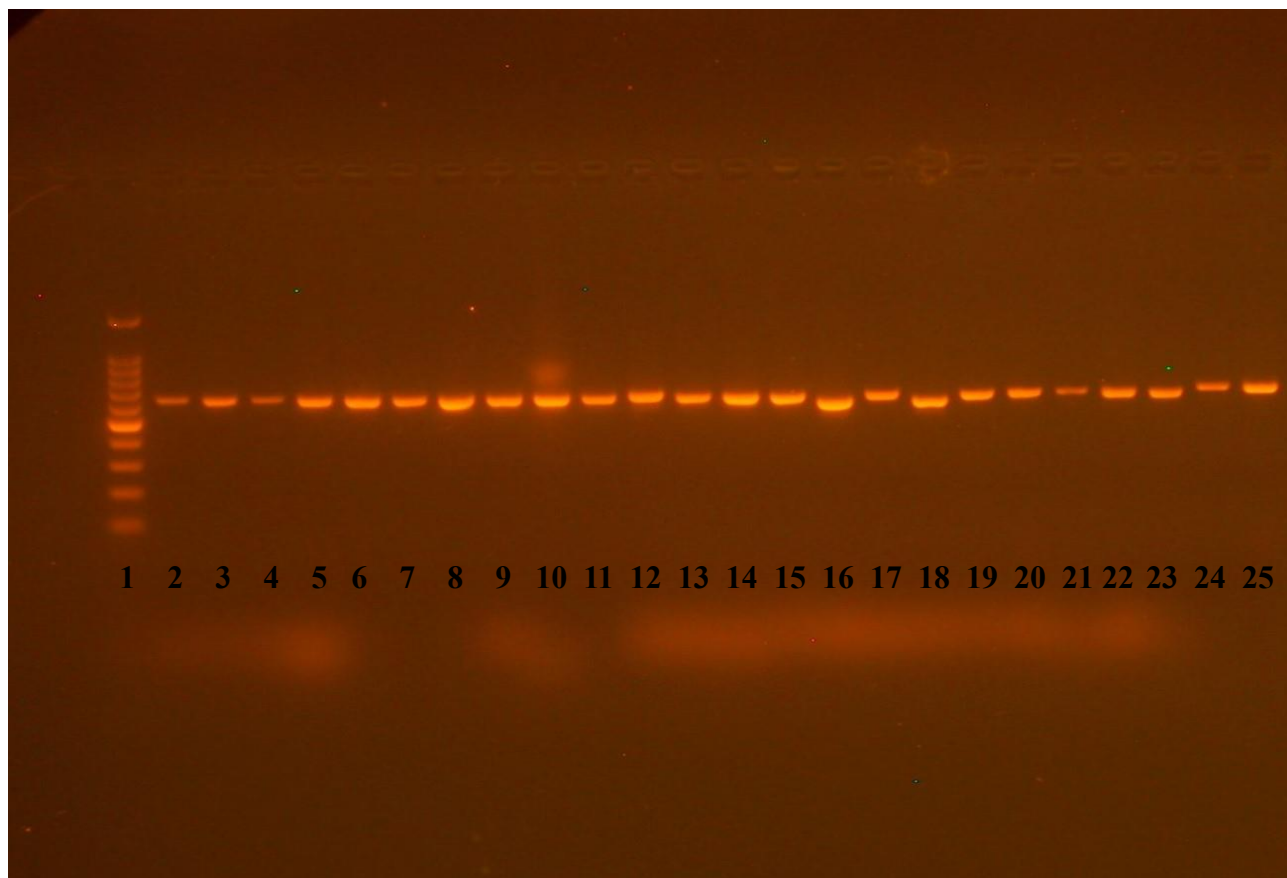
amelyekben az ureát egyéb nitrogénforrásokkal, élesztőkivonattal vagy megnövelt koncentrációjú peptonnal, helyettesítettük (Péter és Deák, 1991).

Az élesztőgombák rendszertani azonosítása

Az értekezésben bemutatott eredmények több mint két évtized munkájának a gyümölcsei. Ez alatt az idő alatt az élesztőgombák rendszertani azonosításának módszerei sokat változtak, fejlődtek. Ezeket a változásokat mi is igyekeztünk lehetőségeinkhez mérten követni a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok nemzeti Gyűjteményénél. Húsz évvel ezelőtt még elsősorban a fent leírt fenotípusos tulajdonságok alapján azonosítottuk az élesztőgomba törzseket és az azonosítás eredményét valamilyen molekuláris biológiai módszerrel igyekeztünk megerősíteni, ha erre mód nyílt. Erre a célra eleinte leggyakrabban a polimeráz láncreakcióval (PCR) felszaporított 18S RNS-t kódoló gén és az azzal szomszédos ITS1 régió restrikciós enzim analízisét használtuk (Dlauchy és mtsai, 1999). A szőlő bogyóról izolált élesztőgomba törzsek esetén a fenotípus alapú rendszertani azonosítás eredményét rotáló gélelektroforézis (rotating field electrophoresis, RFE) (Tornai-Lehoczki és Dlauchy, 1996) alkalmazásával nyert kromoszóma mintázatok összehasonlítása, később pedig a D1/D2 régió bázissorrend meghatározásának segítségével (lásd a következő bekezdést) erősítettük meg.

A DNS szekvenálás árának drasztikus csökkenése és a DNS bázissorrend alapú rendszertani azonosításhoz elengedhetetlenül szükséges referencia adatbázis létrejötte (Kurtzman és Robnett, 1998; Fell és mtsai, 2000) lehetővé tették, hogy a DNS szekvencia alapra helyezzük az élesztőgombák rendszertani azonosítását. Leggyakrabban a riboszómális RNS nagy alegységét kódoló gén, általában körülbelül 600 nukleotid hosszúságú, D1/D2 régiójának a bázissorrendjét használtuk erre a célra, ami az élesztőgombák esetén az első számú vonalkód szekvencia. Szükség szerint más DNS szakaszok, elsősorban az ITS régió, bázissorrendjét is felhasználtuk a rendszertani azonosítás eredményének a megerősítésére. A vizsgált DNS szakaszok felszaporítása a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok nemzeti Gyűjteményénél történt a Kurtzman és Robnett (1998), valamint a Dlauchy és mtsai (2003) által leírt módszerek alkalmazásával. A DNS szakaszok felszaporításának eredményességéről a polimeráz láncreakció termékek gélelektroforézises vizsgálatával győződünk meg [1,2 % (m/v) agaróz gél, 5 V/cm térerősség, 35-40 perc futtatási idő]. A DNS-t 0,05 µg/ml koncentrációjú etidium-bromiddal festettük meg és a gél UV fényben fényképeztük le (4.

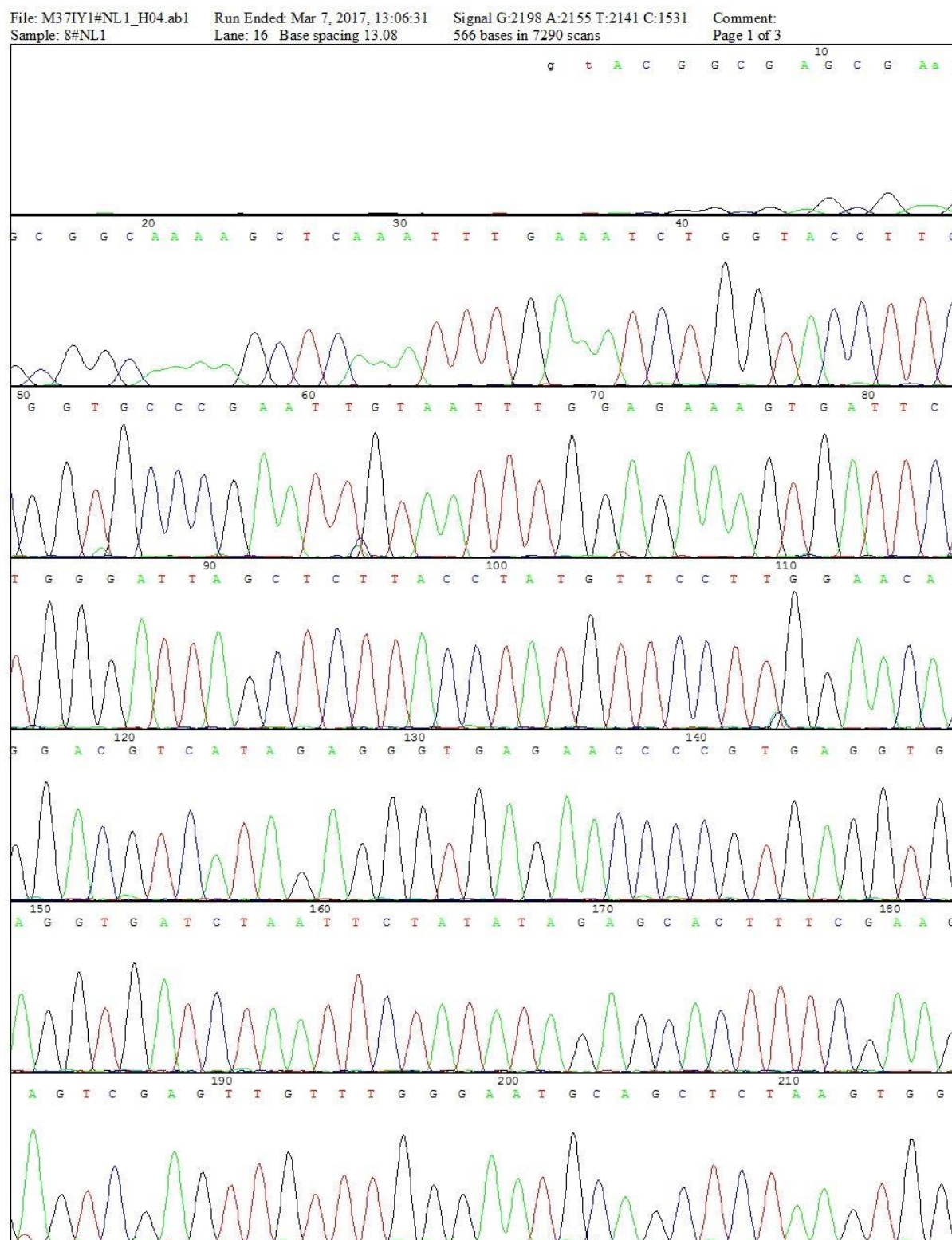
ábra). Az amplikonok bázissorrendjének meghatározására pedig különböző kereskedelmi laboratóriumokban került sor.



4. ábra. A rRNS gén nagy alegysége D1/D2 régiójának NL1 és NL4 indítószekvenciákkal felszaporított DNS fragmentjei (Dlauchy Dénes felvétele)

1) Méretstandard; 2) *Candida albicans*, NCAIM Y.00283; 3) *Candida albicans*, NCAIM Y.00580; 4) *Candida albicans*, NCAIM Y.00728; 5) *Candida albicans*, NCAIM Y.00971; 6) *Candida albicans*, NCAIM Y.01034; 7) *Candida albicans*, NCAIM Y.01506; 8) *Candida albicans*, NCAIM Y.01788; 9) *Candida albicans*, NCAIM Y.01789; 10) *Candida albicans*, NCAIM Y.01790; 11) *Candida albicans*, NCAIM Y.01791; 12) *Zygorhynchus mrakii*, A341/Br1; 13) *Ogataea histrianica*, A341/Br2; 14) *Nakazawaea molendini-olei*, A341/Br3; 15) *Myxozyma udenii*, A341/Br4; 16) *Yamadazyma terventina*, A341/hex1; 17) *Nakazawaea molendini-olei*, A341/hex2; 18) *Yamadazyma terventina*, A341/hex3; 19) *Nakazawaea molendini-olei*, A341/10%met1; 20) *Nakazawaea wickerhamii*, A344/dul1; 21) *Nakazawaea wickerhamii*, A344/dul2; 22) *Ogataea histrianica*, A344/dul3; 23) *Ogataea histrianica*, A344/dul4; 24) *Tremella* sp., NCAIM Y.02192; 25) *Schizosaccharomyces osmophilus*, NCAIM Y.02191

Az eredményül kapott DNS bázissorrendeket (5. ábra) a GenBank adatbázisában található szekvenciákkal vetettük össze a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Johnson és



5. ábra. A *Zygocaccharomyces favi* típusörzse (NCAIM Y.01994^T) D1/D2 régiójának bázissorrendjét szemléltető elektroferogram részlete

mtsai, 2008) segítségével (6. ábra). Két élesztőgomba törzs D1/D2 régiójának a bázissorrendjében észlelt különbségek értékelésénél aszkuszos élesztőgombák esetében a Kurtzman és Robnett (1998), bazídiumos élesztőgombák esetében pedig a Fell és mtsai (2000) által javasolt irányelveket követtük, az ITS régióban detektált bázissorrend különbségek esetében pedig a Daniel és mtsai (2009) által közölt értékeket vettük figyelembe. Amennyiben az Ascomycota törzsbe tartozó élesztőgombák esetében 0-3 nukleotid különbség detektálható a törzsek D1/D2 szekvenciái között, akkor valószínűleg azonos fajhoz vagy testvér fajokhoz tartoznak, míg a szubsztitúciók 1%-ot meghaladó mértéke általában különböző fajokat jelez (Kurtzman és Robnett, 1998). Amennyiben a Basidiomycota törzsbe sorolt élesztőgombák D1/D2 régiói között kettő vagy több nukleotid különbség figyelhető meg, akkor a két törzs különböző fajokhoz tartozik (Fell és mtsai, 2000). Az ITS régióban leggyakrabban 0-4 nukleotid különbség figyelhető meg az azonos fajokhoz tartozó élesztőgomba törzsek között (Daniel és mtsai, 2009). A fenti irányelveket lényegében megerősítették a Vu és mtsai (2016) által a CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) gyűjteményében fenntartott mintegy 9 000 élesztőgomba törzs D1/D2 és ITS szekvenciáinak elemzése alapján megállapított határértékek.

Néhány esetben, amikor a D1/D2 és ITS régiók bázissorrendjében detektált különbségek együttes értékelése sem nyújtott megnyugtató támpontot a törzsek azonos fajba sorolására vagy annak elvetésére, további módszereket, mikroszatellit indítószekvenciák felhasználásával nyert PCR ujjlenyomatok összehasonlítását és parszimónia kapcsolatháló-elemzést (parsimony network analysis) vettünk igénybe a probléma megoldására (Nagy és mtsai, 2014). A parszimónia kapcsolatháló-elemzést az összefűzött ITS és D1/D2 szekvenciákon végeztük el az inszerciót/deléciót tartalmazó pozíciók kizárásával a TCS 1.21 programmal (Clement és mtsai, 2000). A 95%-os kapcsolódási határérték alkalmazásával nyert kapcsolatháléhoz tartozó törzseket azonos fajhoz tartozóknak tekintettük (Lachance és mtsai 2010, 2011a).

Filogenetikai elemzés

Az ismert, már leírt élesztőgomba fajoknak a filogenetikai törzsfán való elhelyezkedése általában ismert. Az élesztőgomba monográfia legutóbbi kiadásának (Kurtzman és mtsai, 2011a) megjelenése előtt leírt fajok többségének filogenetikai elhelyezkedését a monumentális mű tartalmazza. A tudomány számára új élesztőgomba fajok

leírásakor azokat szintén el kell helyezni a filogenetikai törzsfán, hogy megbízható módon megfelelő magasabb rendszertani kategóriába sorolhassuk őket.

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments							
Download Manage Columns Show 100							
select all 100 sequences selected							
GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces favi strain NCAIM Y.01994 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	1086	100%	0.0	100.00%	JF830782.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces favi strain NCAIM Y.02134 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1079	1079	100%	0.0	99.83%	KJ825951.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces gambellarensis strain ATCC MYA-4776 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	989	989	93%	0.0	99.09%	JN874489.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces machadoi strain UFMG-Jat-69.2 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	986	986	99%	0.0	98.60%	AF432228.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain PDA-4 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	MK063705.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain DMic 124141 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	MG009585.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii ribosomal RNA (ZYRO0E10118r), rRNA	863	863	100%	0.0	93.40%	XR_002648422.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii ribosomal RNA (ZYRO0E10108r), rRNA	863	863	100%	0.0	93.40%	XR_002648419.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii ribosomal RNA (ZYRO0E10100r), rRNA	863	863	100%	0.0	93.40%	XR_002648416.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii partial 26S rRNA gene, strain R-55258	863	863	100%	0.0	93.40%	LT831809.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii culture CBS:741 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KY110285.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii culture CBS:710 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KY110279.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii culture CBS:3017 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KY110272.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii culture CBS:678 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KY110259.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii culture CBS:882 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KY110253.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii isolate zrD10211923.1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KX539240.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain ZUSTLX9817 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KT956242.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii gene for 26S ribosomal RNA, partial sequence, strain: S11	863	863	100%	0.0	93.40%	LC068846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces sp. NBRC 10672 partial 26S rRNA gene, strain NBRC 10672, clone copy_r	863	863	100%	0.0	93.40%	LN849110.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces sp. NBRC 10670 partial 26S rRNA gene, strain NBRC 10670, clone copy_r	863	863	100%	0.0	93.40%	LN849108.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces sp. NBRC 10652 partial 26S rRNA gene, strain NBRC 10652, clone copy_r	863	863	100%	0.0	93.40%	LN849101.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KF484400.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain Yx509 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KF154739.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain ATCC 28253 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	KC146373.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain NRRL Y-229 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	863	863	100%	0.0	93.40%	JQ688016.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain CBS732 chromosome E complete sequence	863	2590	100%	0.0	93.40%	CJ928181.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii JFO 1130 28S rRNA, partial sequence: from TYPE material	863	863	100%	0.0	93.40%	NG_055018.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain ATCC 42981	863	863	100%	0.0	93.40%	AM943856.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii 5S rRNA gene, 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene, strain CBS 732	863	863	100%	0.0	93.40%	AM943855.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii gene for 26S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: NT002	861	861	99%	0.0	93.39%	LC145340.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain MT6 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	861	861	99%	0.0	93.39%	KJ909205.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii culture CBS:732 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	859	859	100%	0.0	93.24%	KY110273.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces sp. NBRC 10669 partial 26S rRNA gene, strain NBRC 10669, clone copy_r	859	859	100%	0.0	93.23%	LN849106.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	859	859	100%	0.0	93.23%	U72163.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii isolate MC1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	857	857	100%	0.0	93.24%	KY296088.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain ZUSTLX1119 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	857	857	99%	0.0	93.23%	KT956241.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces sp. NBRC 0505 partial 26S rRNA gene, strain NBRC 0505, clone copy_r	857	857	100%	0.0	93.23%	LN849096.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces pseudorouxii partial 26S rRNA gene, strain ATCC 42981, clone 1	857	857	100%	0.0	93.23%	AM947881.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii strain ZUSTLX1018 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	856	856	99%	0.0	93.36%	KT956240.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zygosaccharomyces rouxii gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: JFO 0597	854	854	100%	0.0	93.06%	AB302802.1

6. ábra. A *Zygosaccharomyces favi* típusörzse (NCAIM Y.01994^T) D1/D2 régiója bázissorrendjének (GenBank azonosítószám: JF830782) összehasonlítása a GenBank adatbázisában található DNS szekvenciákkal (2019. 08. 10.)

A monográfia megjelenést követően leírt fajok filogenetikai törzsfán való elhelyezkedését ezért a fajleírásokat tartalmazó publikációk mutatják be. Amennyiben az általunk izolált élesztőgomba törzseket egyetlen leírt fajjal sem tudtuk azonosítani, akkor az új faj leírásakor filogenetikai analízist végeztünk az új faj törzsfán való elhelyezkedésének meghatározása céljából. Leggyakrabban D1/D2 szekvenciákra alapuló filogenetikai elemzést végeztünk, mert az esetek zömében az új fajok rendszertani helyét ez is kielégítően megmutatta. Amennyiben a vizsgálatba vont fajok között egymással olyan közeli rokonságban álló fajok szerepeltek, amelyeket a D1/D2 szekvenciák elemzése nem választott el megfelelő módon, a filogenetikai elemzést gyakran az összefűzött ITS és D1/D2 szekvenciákra végeztük el. Néhány esetben több gén DNS bázissorrendjének elemzése alapján állapítottuk meg az új faj rendszertani helyét.

Valamennyi, a disszertációban bemutatott, általunk leírt faj esetében új filogenetikai elemzést végeztem az adott faj leírása óta eltelt időben történt esetleges változások (elsősorban további új fajok leírása) figyelembevételével. Az itt bemutatott filogenetikai törzsfák a D1/D2 vagy az összefűzött ITS és D1/D2 szekvenciák elemzésén alapulnak. A DNS szekvenciák összerendezése után az elemzéseket a MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.) programmal (Tamura és mtsai, 2013) végeztem a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) vagy a neighbor-joining módszert alkalmazva. Az egyes összerendezett DNS bázissorrend adatainak elemzéséhez alkalmazott matematikai modellt a MEGA 6 programba ágyazott „Modeltest” eredménye alapján választottam ki, és az adott ábra lábjegyzetében adom meg az alkalmazott külcsoport (outgroup) fajjal/fajokkal együtt. Az általunk vagy a közreműködésünkkel leírt fajokat félkövér karakterrel jelöltem a törzsfákon. Valamennyi itt bemutatott filogenetikai elemzésbe vont fajt a típus- vagy izotípus törzs képviseli, ezért az ábrákon ez nincs külön feltüntetve. Az elemzésbe vont törzseknek és a felhasznált DNS szekvenciáknak GenBank-i azonosítószámainak felsorolását a Függelék tartalmazza.

Eredmények és megvitatásuk

Saccharomyces törzsek izolálása szőlőről

Bár a *Saccharomyces* fajok töltik be a legfontosabb szerepet a must erjesztése során, kis számuk miatt dúsítós eljárások alkalmazása nélkül szőlőről igen ritkán izolálhatóak. Ugyanakkor egyre nagyobb igény mutatkozik az egyes borvidékekhez, azok szőlő fajtáihoz, szőlőművelési gyakorlatához és az alkalmazott borászati technológiákhoz jobban adaptálódott helyi *Saccharomyces* törzsek iránt (Pretorius, 2000), melyek egyik forrása maga a szőlő (Orlic és mtsai, 2005; Romano és mtsai, 2008; Fleet, 2008). A *Saccharomyces* törzsek szőlőről való izolálására általunk kidolgozott dúsítási eljárás (Péter és mtsai, 2011a) alkalmazásával 18, az Egri Borvidékről származó szőlő mintáról kíséreltük meg *Saccharomyces* törzsek izolálását.

A módszer lényege a 10% (v/v) metanollal kiegészített tápközegben való dúsítás, amely azon az elméleti megfontoláson alapul, hogy amennyiben a kiemelkedő etanol-toleranciával rendelkező *Saccharomyces*-ek metanol-toleranciája is meghaladja a szőlőbogyót benépesítő egyéb élesztőgomba fajokét, akkor, a nagy metanol tartalmú tápközegnek alkalmasnak kell lennie a *Saccharomyces*-ek szelektív dúsítására. Mivel az ismert *Saccharomyces* fajok a metanol asszimilációjára képtelenek, a szelektív gátlóanyagként alkalmazott metanol koncentrációjának a szacharomicések általi csökkentésére nincs elméleti lehetőség. A metanol koncentrációját előkísérletek alapján határoztuk meg. Néhány, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származó *Hanseniaspora* és *S. cerevisiae* törzs metanol tartalmú tápközegben való szaporodásának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a 0,5% glükózt tartalmazó, 10% (v/v) metanollal kiegészített tápközeg a *Hanseniaspora* törzsek szaporodását gátolja, a *Saccharomyces*-ekét viszont nem.

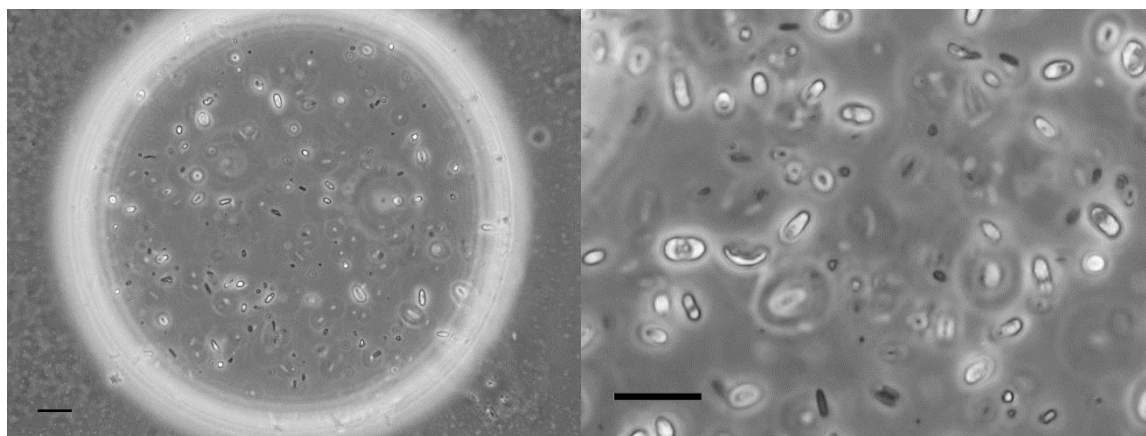
A metanol tartalmú táplevesben történt szelektív dúsítást követően valamennyi szőlő mintáról sikerült élesztőgombát izolálni. Az 49 izolátum közül a 7 µm-nél hosszabb, gömbölyded vagy ellipszoid sejteket képző, ivartalanul holoblasztikus, multilaterális sarjadzással szaporodó 35 izolátumot választottuk ki további vizsgálatra, mint potenciális *Saccharomyces* törzseket. A kiválasztott törzsek fenotípusos tulajdonságai és kromoszóma mintázatuk egyaránt alátámasztották, hogy mindegyikük a *Saccharomyces* nemzetségbe tartozik. Vaughan-Martini és Martini (2011a) határozókulcsa alapján valamennyi kiválasztott törzs a *S. cerevisiae*-vel volt azonosítható, és kromoszóma mintázatuk is erre a fajra jellemző. A kromoszóma mintázat a borélesztő törzsek rendszertani azonosítására alkalmas egyszerű és

megbízható módszer (Pretorius és van der Westhuizen, 1991), de a *S. cerevisiae* és a *S. paradoxus* elkülönítésére nem alkalmas (Tornai-Lehoczki és Dlauchy, 1996). Ez a két faj azonban megbízhatóan elkülöníthető mannit asszimilációjuk alapján. Míg a *S. paradoxus* asszimilálja a mannitot, addig a *S. cerevisiae* nem képes ezt a szénforrást hasznosítani (Vaughan-Martini és Martini, 2011a). Az összesen 49 törzs közül mikromorfológiai tulajdonságaik alapján kiválasztott 35 törzs valóban *S. cerevisiae*-nek bizonyult, amit később D1/D2 régiójuk bázissorrendjének meghatározásával is megerősítettünk, míg a maradék 14 törzs mikromorfológiai tulajdonságai (aszköspóra alak, a spóráképzést közvetlenül megelőző konjugáció, kis sejtméret) alapján kizárható, hogy a *Saccharomyces* nemzetségbe tartoznak. A módszer tehát nem teljesen mértékben szelektív, az izolált törzsek közel 30%-a nem a *Saccharomyces* nemzetséghez tartozott. Ennek ellenére hatékony, mivel a vizsgált 9 szőlőfajtához tartozó 18 minta közül 16 mintából sikerült *Saccharomyces*-t izolálni (2. táblázat). A két szőlő minta, amelyekről nem sikerült *Saccharomyces* törzseket izolálni, 23 nappal a szüret előtt került begyűjtésre, ami összhangban van a korábbi eredményekkel, melyek szerint az éretlen szőlőt kisebb élesztőgomba közösségek népesítik be, mint az érettet (pl. Fleet és munkatársai, 2002). Két mintáról (3-as és 17-es számú minta) csak egy *Saccharomyces* törzset izoláltunk, míg a többiről 2-4 törzset. Az 1-es számú mintáról származó két *Saccharomyces* törzs között sem fenotípusos, sem kromoszóma mintázat, sem D1/D2 bázissorrend különbséget nem sikerült kimutatni. A többi esetben az azonos mintáról izolált *Saccharomyces* törzsek között egyértelmű fenotípusos különbséget találtunk (2. táblázat) és/vagy eltérő kariotípust detektáltunk (Péter és mtsai, 2011a). A korábban leírt (Török és mtsai, 1996; Martini és mtsai, 1996; Sniegowski és mtsai, 2002) módszerektől eltérően, etanol helyett a *Saccharomyces*ek által nem hasznosítható metanol szaporodás gátló hatását használtuk fel a nem-*Saccharomyces*ek szaporodásának a visszaszorítására. Míg, ellentétben az etanollal, a metanol koncentráció *Saccharomyces*ek általi csökkentése nem várható, a tápközegben lévő glükózból esetleg képződő etanol növelheti a dúsító tápközeg szelektív hatását. Az előkísérletekkel összhangban a dúsítás után nem izoláltunk *Hanseniaspora/Kloeckera* törzseket, viszont az izolátumok kb. 30%-a nem a *Saccharomyces* nemzetségbe tartozott. Az irodalmi adatokkal összevetve az általunk kidolgozott módszer hatékonysága felülmúlja az „öndúsításos” izolálási módszerek hatékonyságát. Martini és mtsai (1996) szerint az „öndúsításos” módszerrel nem sikerült *Saccharomyces*-t izolálni 3-4 kg szőlőről. Valero és mtsai (2007) pedig arról számoltak be, hogy az általuk vizsgált 106 szőlő

mintáról (minta nagyság kb. 2 kg) azok spontán erjesztése után izolált több mint 2000 törzsnek több mint 70%-a nem volt *Saccharomyces*.

Az olívaolaj, mint új élesztőgomba élőhely feltárása

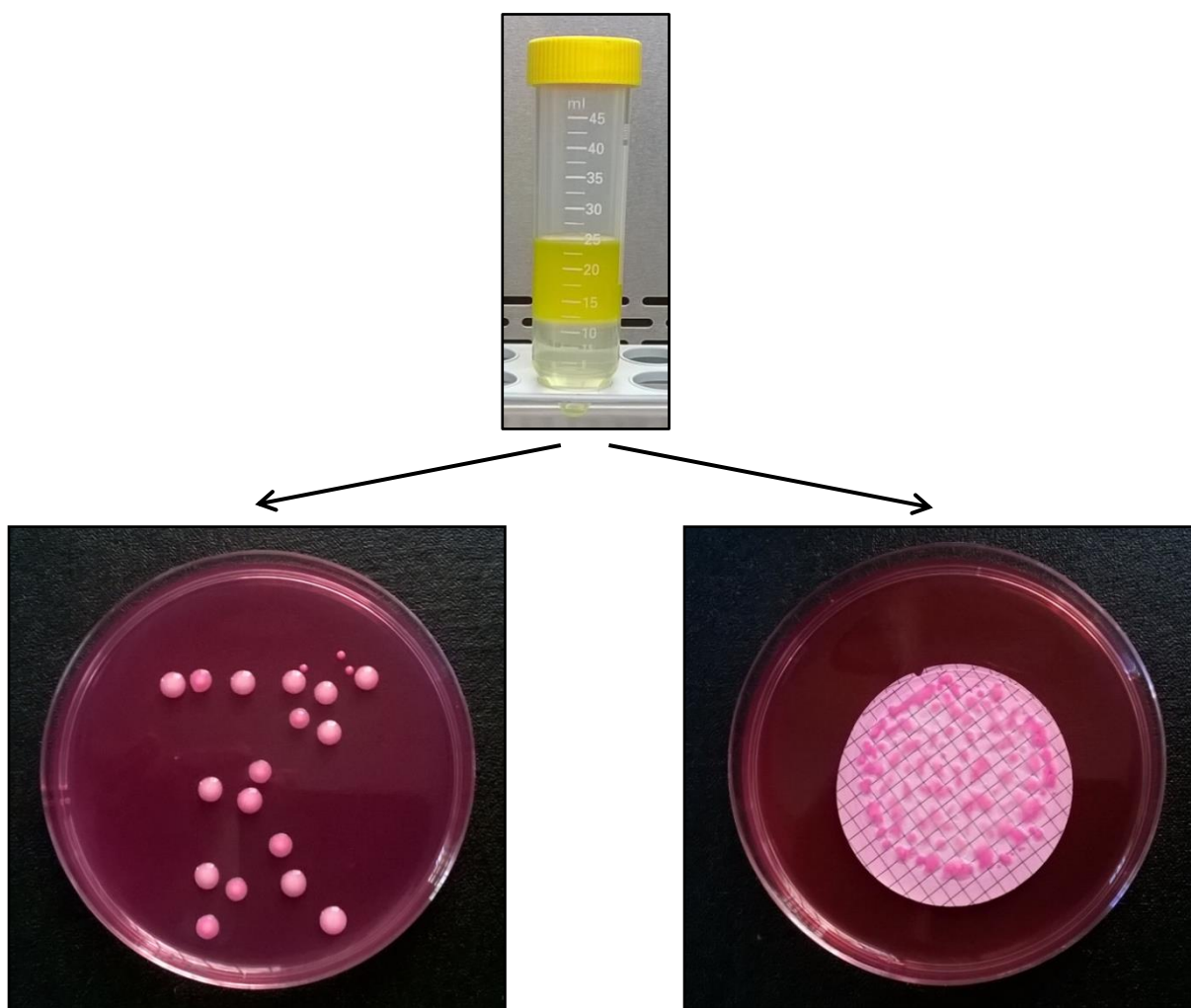
A hidegen sajtolt olívaolajról csak nemrégiben derült ki, hogy számottevő mikroorganizmus közösség élőhelye, amelynek gyakran az élesztőgombák a domináns összetevői (Ciafardini és Zullo, 2002a, b). Az olívaolajban található élesztőgombák elsődleges forrása az olívaogyó, mert az olívaogyóból származó szilárd részecskékkel és a vegetációs víz mikrocseppekkel az élesztőgombák is az olívaolajba vándorolnak annak előállításakor (Ciafardini és Zullo (2015)). Az olívaolajok és azok üledékei élesztőgomba közösségeinek vizsgálatában mi is részt vettünk, részben külföldi partnerekkel együttműködve. Az irodalmi adatokkal összhangban megfigyeltük, hogy az olívaolajban található élesztőgombák jelentős része az olajban található kis mennyiségű vízben koncentrálódik (7. ábra).



7. ábra. Olívaolaj vizes fázisában található mikroorganizmusok (szűretlen, romlott extra szűz olívaolaj, Spanyolország). A méretvonal hossza 10 μm .

A frissen sajtolt olívaolaj körülbelül 0,25% vegetációs vizet tartalmaz (Ciafardini és mtsai, 2006a). A 7. ábra bal oldali panelén jól látszik, hogy a vízcsepp számos mikroorganizmus sejtet tartalmaz, míg az azt körülvevő olajban egyetlen sejt sem figyelhető meg. A jobboldali panel pedig Ciafardini és Zullo (2002a, b) azon állítását támasztja alá, hogy az olívaolajok mikroba közösségeinek gyakran az élesztőgombák a domináns összetevői. Mivel, elsősorban a szűrt olívaolajokban, az élesztőgombák száma általában igen kicsi (< 1 sejt/ml), az olaj mintának közvetlenül a tápagarra történő szélesztésénél vagy az olajjal átitatott szűrőpapírnak a táptalajra helyezésénél hatékonyabbnak bizonyult az általunk

kidolgozott új módszer (Péter és mtsai, 2017a), melynek során az élesztőgomba sejteket centrifugálással az olajhoz adott steril vízbe juttattuk, mert ez a módszer lehetővé tette a membránszűrési eljárás alkalmazását is (8. ábra jobb oldali panel). Nagy élesztőgomba sejtkoncentráció (elsősorban szűretlen és romlott olívaolaj minták) esetén, a felületi szélesztés (8. ábra bal oldali panel) előtt, szükségessé válhat a minta hígítása is, ami sokkal egyszerűbben kivitelezhető az élesztőgomba sejtek vizes fázisba juttatása után, csakúgy, mint maga a szélesztés.



8. ábra. Élesztőgombák kitenyésztése olívaolajból azok vizes fázisba juttatása után

Az általunk vizsgált 83 olívaolaj és olívaolaj üledék mintának kb. a feléből (41 mintából) összesen 95 élesztőgomba törzset izoláltunk. Az izolált törzseket a rRNS-t kódoló gén nagy alegysége D1/D2 szakaszának nukleotid sorrendje alapján azonosítottuk, amennyiben ez lehetséges volt (3. táblázat). Szembetűnő a Basidiomycota törzsbe tartozó

élesztőgombák csaknem teljes hiánya, valamint a tudomány számára korábban ismeretlen fajok nagy előfordulási aránya az olívaolajokban és azok üledékeiben. A bazídiomos élesztőgombák egyes föld feletti növényi részek, ideértve azok termését is, élesztőgomba közösségeinek meghatározó összetevői. Mivel az olívaolajban található élesztőgombák elsődleges forrása maga az olíva bogyó, amelyen bazídiomos élesztőgombák jelenlétét is kimutatták (Fakas és mtsai, 2010) a bazídiomos élesztőgombák jelenléte várható lenne az olívaolajban is. A bazídiomos élesztőgombák előfordulásának csaknem teljes hiányát magyarázhatja, hogy az olívaolajban található, a mikrobák szaporodását gátló egyszerű és komplex fenolvegyületek (Juven és Henis, 1970; Fleming és mtsai, 1973; Gourama és mtsai, 1989; Ciafardini és Zullo, 1998), vagy a hasonló tulajdonsággal rendelkező zsírsavak és trigliceridek (Zullo és mtsai, 2010) szaporodást gátló hatására érzékenyebbek lehetnek az aszkuszos élesztőgombáknál. Ez a hipotézis azonban kísérletes igazolást igényel. A polifenolok mikroorganizmusokra gyakorolt szelektív hatásáról számoltak be Ciafardini és mtsai (2017). Megfigyelték, hogy a Taggiasca extra szűz olívaolaj előállítása során a baktériumok nagy része elpusztult, és a 6 hónapos tárolási idő alatt az (aszkuszos) élesztőgombák túlélése is eltérő volt.

Az olívaolajból a közreműködésünkkel újonnan leírt élesztőgomba fajokat félkövér karakter jelöli a 3. táblázatban. Mivel a zsírbontó képességgel rendelkező mikroorganizmusok kedvezőtlen hatást gyakorolhatnak az olívaolaj minőségére az olívaolajból és olívaolaj üledékből származó újonnan leírt élesztőgombák esetében a lipolitikus aktivitást is vizsgáltuk, amit ugyancsak feltüntettünk a táblázatban. A közreműködésünkkel leírt és a 3. táblázatban félkövér karakterrel kiemelt fajokon kívül egy további új faj, a *Yamadazyma terventina* is leírásra került a közelmúltban olívaolajból (Ciafardini és mtsai, 2013). Az alábbiakban röviden ismertetem a közreműködésünkkel olívaolajból és olívaolaj üledékből leírt új élesztőgomba fajokat.

A *Nakazawaea molendinolei*-t *Candida molendinolei* néven írtuk le, mivel aszkospóra képzést nem sikerült megfigyelnünk egyik vizsgált törzsben és a törzsek keverékében sem (Čadež és mtsai, 2012). Később, összhangban az 1 gomba = 1 név elvvel, Kurtzman és Robnett (2014b) átsorolta a fajt a *Nakazawaea* nemzetségbe. A nemzetség jelenleg ismert 12 faja közül egyedül a típusfaj, a *N. holstii*, esetében dokumentálták az aszkospóra képzést, és valamennyi természetből izolált *N. holstii* törzs spórát nem képző haploid (Kurtzman, 2011a; Kurtzman és Robnett, 2014b; Kaewwichian és Limtong, 2014). A *N. molendinolei*

3. Táblázat. Az olívaolajból és olívaolaj üledékből izolált élesztőgombák fajonkénti megoszlása (95 törzs)

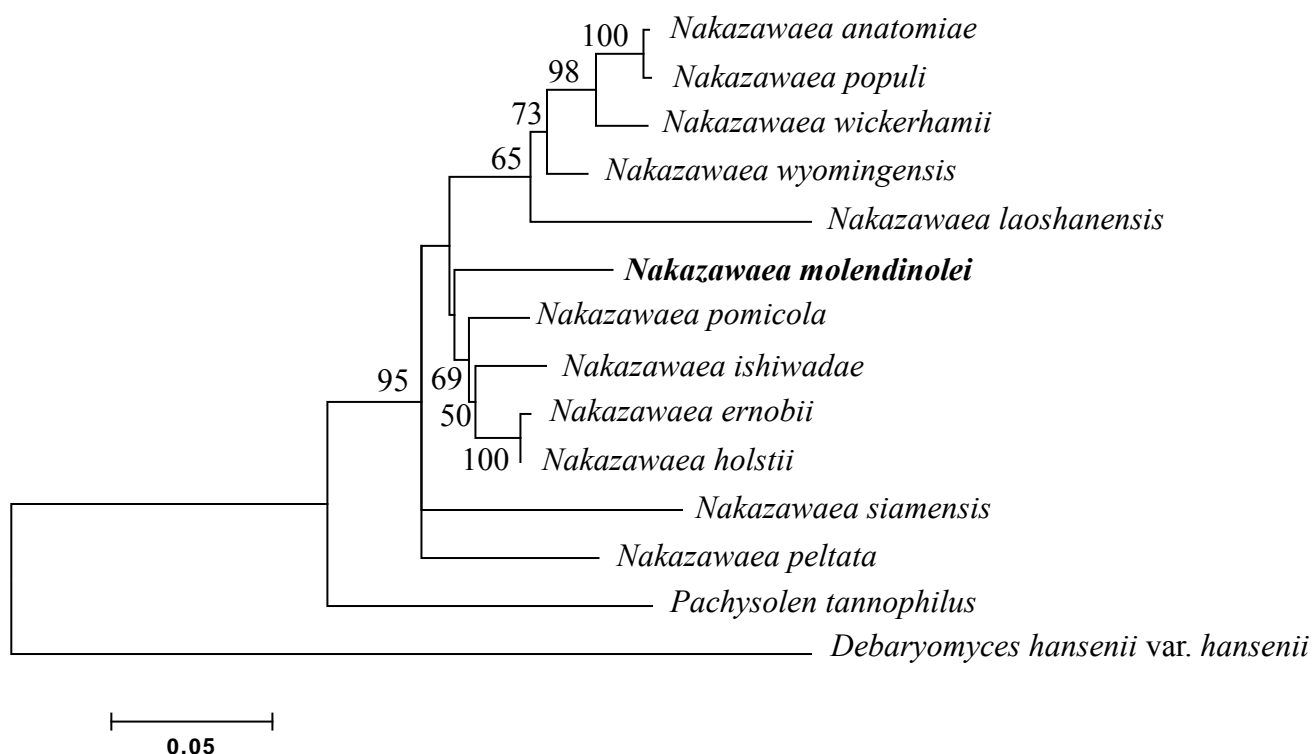
Faj	Az izolált törzsek száma	Lipolitikus aktivitás
<i>Nakazawaea molendinolei</i> (<i>Candida molendinolei</i>)¹	21	-
<i>Ogataea histrianica</i>	20	-
<i>Candida adriatica</i>	11	+
<i>Yamadazyma terventina</i>	7	
<i>Myxozyma udenii</i>	7	
<i>Kuraishia mediterranea</i>	6	-
<i>Groenwaldozyma auringiensis</i>	4	
<i>Brettanomyces acidodurans</i>	2	-
<i>Lachancea fermentati</i>	2	
<i>Candida railenensis</i>	2	
<i>Zygorhynchus mrakii</i>	2	
<i>Ogataea kolombanensis</i>	1	-
<i>Nakazawaea wickerhamii</i>	1	
<i>Candida boidinii</i>	1	
<i>Pichia manshurica</i>	1	
<i>Candida oleophila</i>	1	
<i>Geotrichum</i> sp.	1	
<i>Brettanomyces</i> cf. <i>acidodurans</i>	2	-
<i>Debaryomycetaceae</i> sp. nov.	1	+
<i>Taphrinomycotina</i> sp. nov.	1	-
<i>Tremella</i> sp. nov.	1	-

¹: A zárójelben megadott néven került leírásra

A közreműködésünkkel leírt új fajokat, illetve a még leírásra váró új fajokat félkövér karakter jelöli.

elhelyezkedését az ITS és D1/D2 régiók DNS bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán a 9. ábra szemlélteti. Az elemzésbe vont fajok körében a két filogenetikai marker régió analízise alapján a *Nakazawaea* nemzetség nagy statisztikai megbízhatóságú csoportot alkot (bootstrap érték 95%), amelyben az újonnan leírt *N. (Candida) molendinolei* is elhelyezkedik. A faj leírásakor 8 törzset vizsgáltunk, amelyek szüretlen extra szűz olívaolajból (Olaszország), extra szűz olívaolajból (Szlovénia,

Horvátország), olíva vegetációs víz fenol koncentrátumból (Olaszország) és olaját tartalmazó romlott olívaolajból (Izrael) származtak (Čadež és mtsai, 2012).



9. ábra. A *Nakazawaea molendinolei* elhelyezkedése az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a „General Time Reversible modellre” (Nei és Kumar, 2000) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 1050 pozíciót tartalmazott. A *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

A faj leírását követően további törzseket izoláltunk extra szűz olívaolajból (kifogástalan minőségű és romlott olajok, Portugália, Spanyolország). A faj vizsgált törzsei lipolitikus aktivitást nem mutattak. A *N. molendinolei* olívaolaj minőségére gyakorolt hatása még feltárára vár, bár β -glükózidáz aktivitásának köszönhetően szerepet játszhat a friss olívaolaj keserű ízének mérséklésében (Ciafardini és Zullo, 2002a). Az olívaolaj keserű ízét a benne

található oleuropein nevű glükozid adja, amely azonban kisebb alkotóira bomlása után már nem keserű (Montedoro és mtsai, 1993; Ciafardini és mtsai, 1994; Angerosa és mtsai, 1995; Ciafardini és Zullo, 2002a, b), de kedvező élettani hatását megőrzi (Ciafardini és Zullo, 2015). A *N. molendinolei* és az alábbiakban bemutatásra kerülő *C. adriatica*, más olívaolajból izolált élesztőgombákkal együtt több, táplálkozási szempontból figyelemre méltó tulajdonsággal is rendelkeznek. Mindkét faj vizsgált törzsei jelentős mennyiségű többszörösen telítetlen zsírsavat termelnek, amelyeknek kedvező egészségügyi hatást tulajdonítanak és a koleszterin lebontására is képesek (Zullo és Ciafardini, 2019).

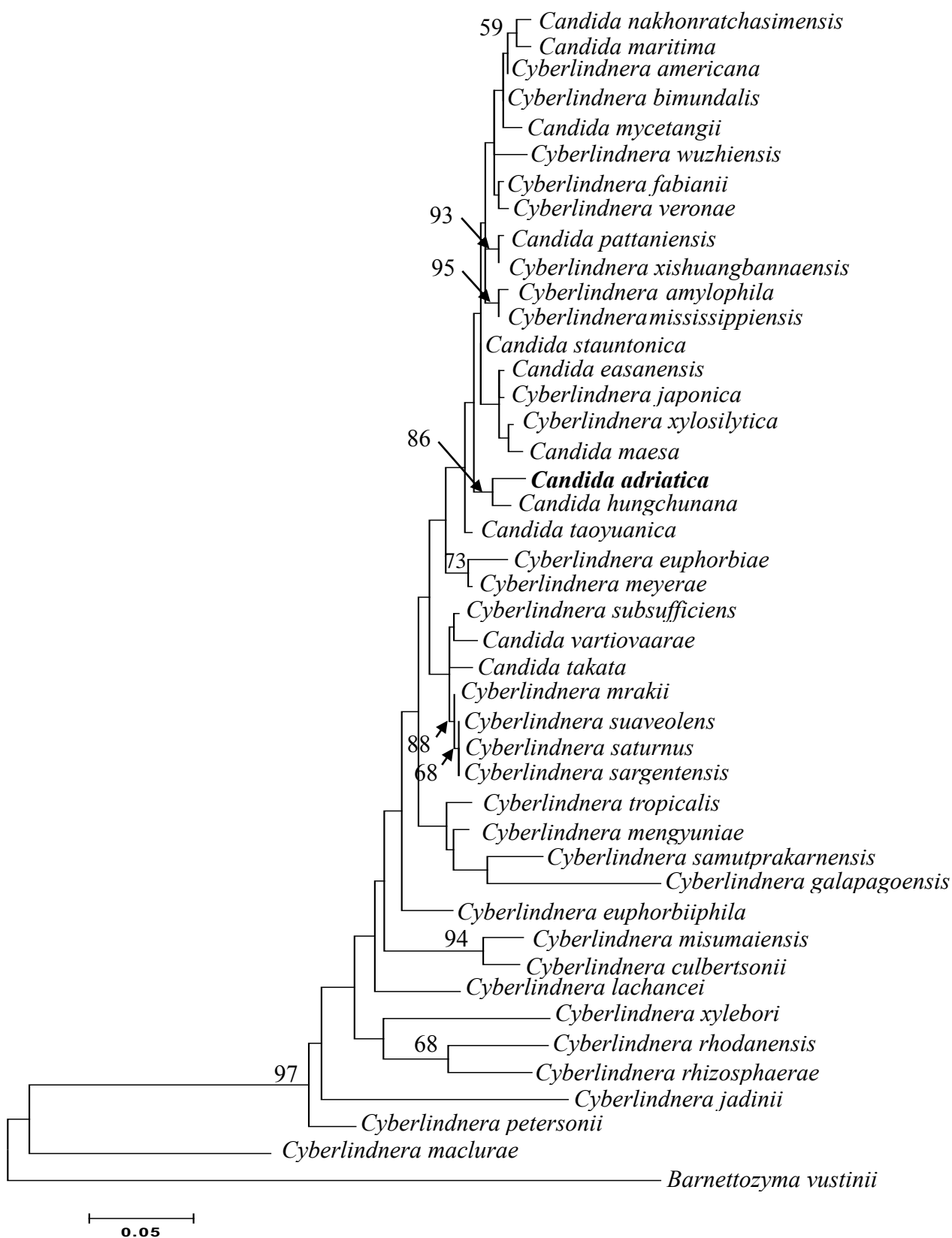
A *Candida adriatica* a filogenetikai elemzések alapján a *Cyberlindnera*-klád tagja (10. és 11. ábra; Čadež és mtsai, 2012, 1. ábra).

A 10. ábra, amely a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzésén alapul, valamennyi, e fejezet írásakor ismert *Cyberlindnera* fajt és számos, a *Cyberlindnera*-kládba tartozó *Candida* fajt magában foglal, míg az ITS és D1/D2 régiók elemzését tükröző 11. ábrán néhány faj (*Cyberlindnera culbertsonii*, *Cyb. euphorbiiphila*, *Cyb. rhodanensis*) nem szerepel a fentiek közül, mivel ezeknek a fajoknak az ITS régió DNS bázissorrendjei nyilvános adatbázisokban nem voltak hozzáférhetőek a filogenetikai elemzés elvégzésekor. A *C. adriatica* mind a D1/D2 régió elemzése alapján (10. ábra) mind az ITS és a D1/D2 régiók elemzésére alapján készített törzsfán (11. ábra) az ugyancsak növényi eredetű, korhadtt fáról izolált, *C. hungchunana*-val (Chang és mtsai, 2012) alkot közös csoportot 86%-os statisztikai megbízhatósággal. Az elemzésbe vont *Cyberlindnera* és *Candida* fajok, a bazális elágazást képző *Cyb. macluræ* kivételével egy nagy statisztikai megbízhatóságú csoportot alkotnak (a bootstrap érték a D1/D2 illetve az ITS-D1/D2 törzsfán sorrendben 97% és 79%). A Čadež és mtsai (2012) által közölt multigén [a rRNS kis alegységét kódoló gén, a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 doménje és a transzlációs elongációs faktor-1 α (EF-1 α) gén] DNS bázissorrend analízisen alapuló filogenetikai törzsfán jóval kevesebb faj szerepel. A multigén analízis eredményeként a *C. adriatica* a *Cyberlindnera*-klád azon szubkládjába tartozik (bootstrap érték 83%), amely a nemzetség típusfaját (*Cyb. americana*) is magába foglalja (Čadež és mtsai, 2012, 1. ábra). A *C. adriatica* leírásakor végzett filogenetikai analízisben a *C. hungchunana* még nem szerepelt. Aszkospóra képzést sem a *C. adriatica* egyes törzseiben, sem a vizsgált törzsek keverékében nem sikerült megfigyelnünk (Čadež és mtsai, 2012). Számos *Cyberlindnera* faj, köztük a nemzetség típusfaja is heterotallikus (Kurtzman, 2011b). Annak ellenére, hogy a *C. adriatica*-nak a *Cyberlindnera*-kládba való beágyazottsága statisztikailag kellően alátámasztott, átsorolása a

Cyberlindnera nemzetségbe egyelőre nem történt meg. A faj leírásakor 5 törzset vizsgáltunk, amelyek extra szűz olívaolajból és szűretlen extra szűz olívaolajból (Olaszország), romlott szűz olívaolajból (Horvátország) és extra szűz olívaolaj üledékből (Szlovénia) származtak. Mind az 5 törzs lipolitikus aktivitással rendelkezett (Čadež és mtsai, 2012). A *C. adriatica*, zsírbontó képességét a 12. ábra szemlélteti.

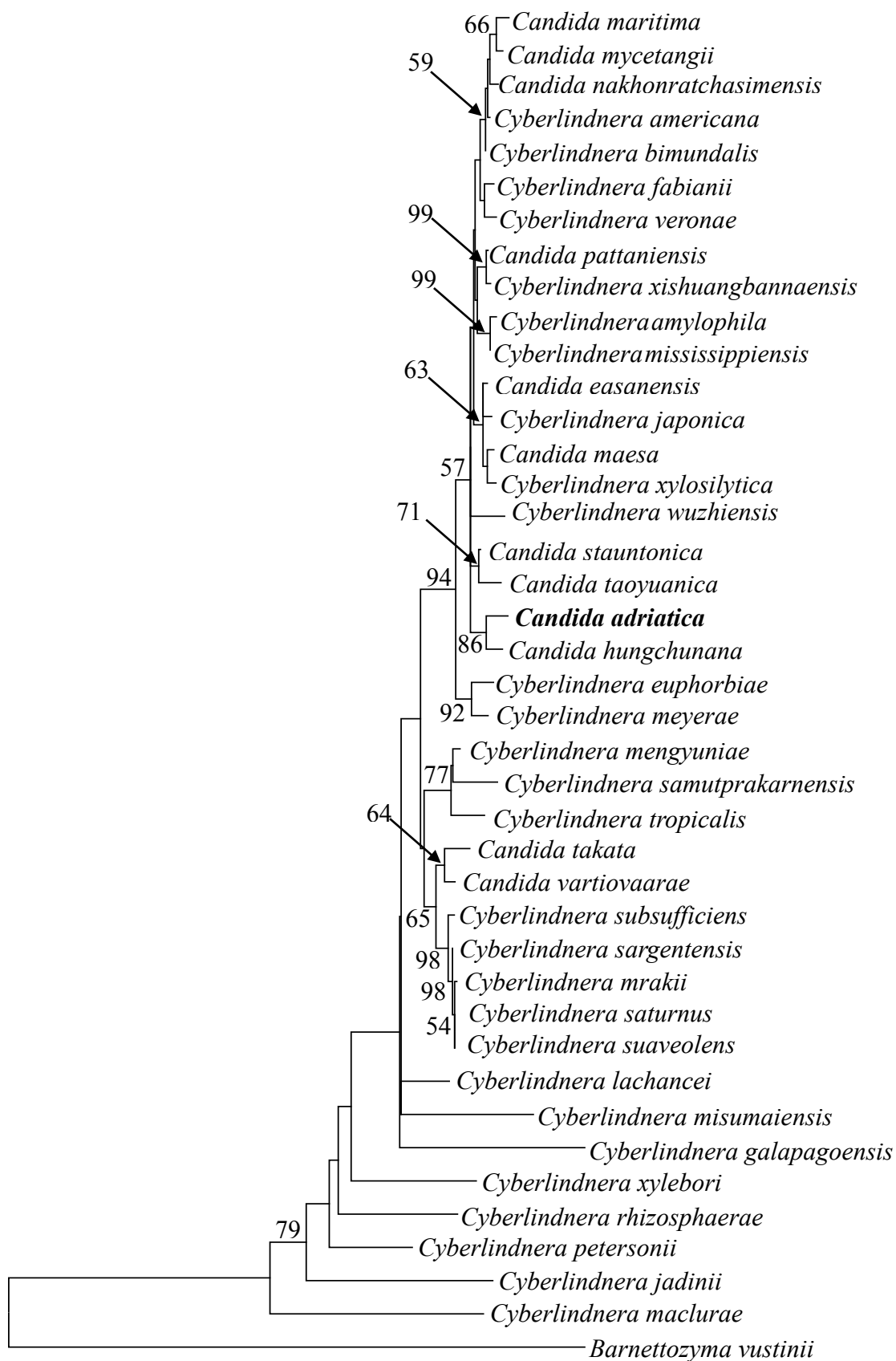
A Marquina és mtsai (1992) módszerével végzett teszt során az olívaolajat tartalmazó táptalajra oltott élesztőgombák inkubálása után a táptalajt telített rézszulfát oldattal árasztjuk el. A lipáz aktivitás eredményeként keletkező szabad zsírsavak a rézzel kék színű sötét alkotnak. Mivel a lipáz a trigliceridek hidrolízisén keresztül az olívaolaj savtartalmának növekedését idézi elő (Frega és mtsai, 1999), feltételezhető volt, hogy a *C. adriatica* kedvezőtlen hatással van az olívaolaj minőségére. Ezt olívaolaj *C. adriatica* törzzsel történő inokulálása segítségével Zullo és mtsai (2013), valamint Ciafardini és Zullo (2015) kísérleti úton is igazolták. Vizsgálataik szerint a *C. adriatica* a tárolás során előidézhetheti az olívaolaj „iszapos üledék” nevű minőségi hibáját valamint avasodását is. A *Candida adriatica* leírása óta több további törzset izoláltunk extra szűz olívaolajból (kifogástalan minőségű és romlott olajok, Portugália, Spanyolország). Ciafardini és Zullo (2018) áttekintő publikációja szerint a *C. adriatica* és a *N. molendinolei* az olívaolajból leggyakrabban izolált két élesztőgomba faj. Vizsgálataink során a *C. adriatica* és a *N. molendinolei* szintén a leggyakrabban izolált fajok közé tartozott (3. táblázat), de az alábbiakban tárgyalt *O. histrianica*-t gyakrabban izoláltuk, mint a *C. adriatica*-t.

Mivel a metanol a növények pektin anyagcseréjének a mellékterméke (Fall és Benson, 1996), a metanol-asszimiláló élesztőgombák jelenléte a növényi eredetű élelmiszerekben is várható. Nincs ez másképp az olívaolajból sajtoló olívaolaj esetében sem, az olívaolaj nagy pektin tartalma (Jiménez és mtsai, 1994) miatt. Olívaolajból és olívaolaj üledékből rendszeresen izoláltunk metanol hasznosítására képes élesztőgombákat (3. táblázat) dúsítás alkalmazása nélkül is. Figyelemre méltó két korábban leíratlan metanol-asszimiláló élesztőgomba (*O. histrianica*, *Ku. mediterranea*) gyakori előfordulása. A számos élőhelyen közönséges *C. boidinii*-t leszámítva csak új fajokat képviselő metilotróf törzseket izoláltunk olívaolajból és olívaolaj üledékből.



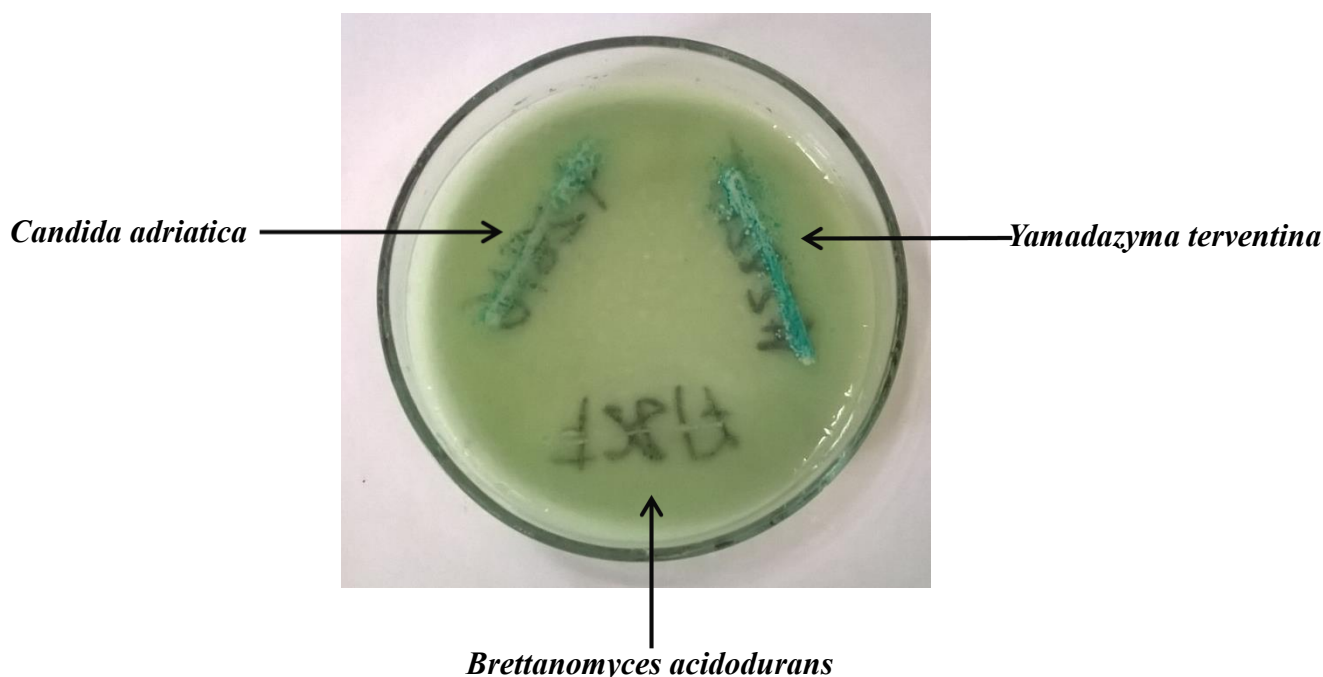
10. ábra. A *Candida adriatica* elhelyezkedése a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfa a

maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a „Kimura 2-parameter modellre” (Kimura, 1980) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfa kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciókat/deléciókat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 486 pozíciót tartalmazott. A *Barnettozyma vustinii* szolgált külsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.



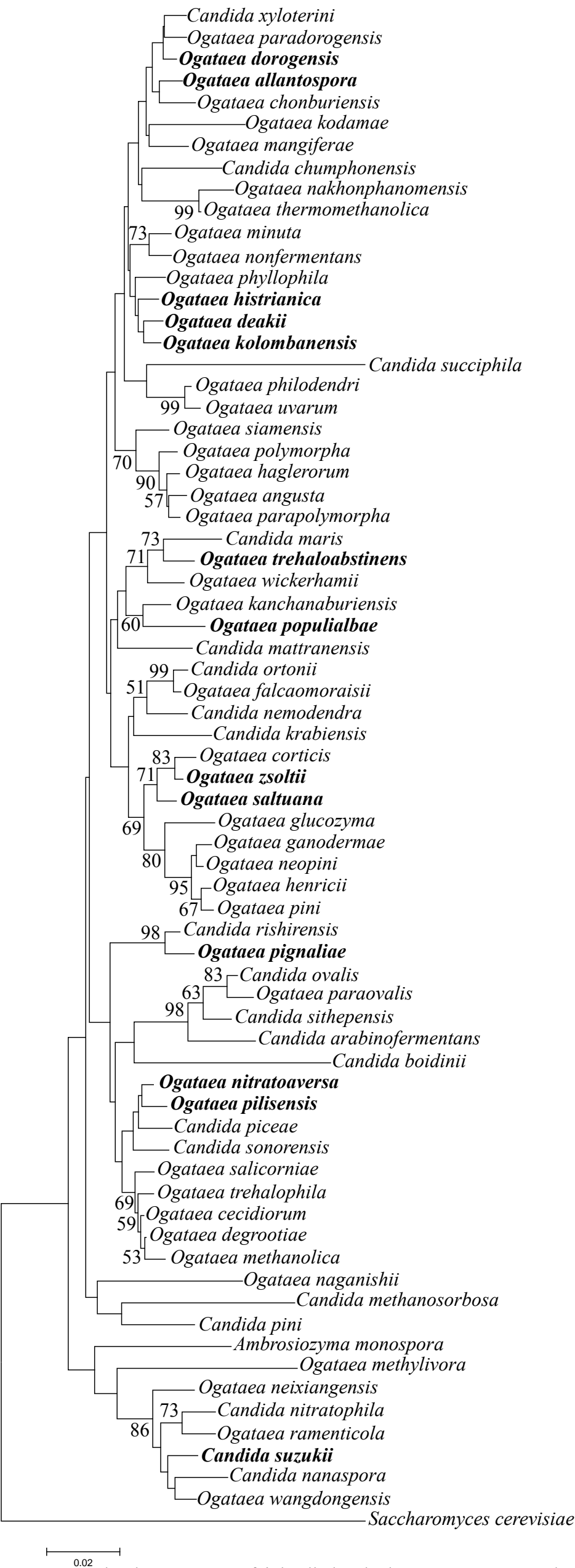
11. ábra. A *Candida adriatica* elhelyezkedése az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a

maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura-Nei modellre (Tamura és Nei, 1993) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfák kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 789 pozíciót tartalmazott. A *Barnettozyma vustinii* szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.



12. ábra. Néhány olívaolajból izolált élesztőgomba törzs zsírbontó képessége. A zsírbontó képességet kék szín jelzi.

Az olívaolajból nemrégiben leírt új metilotróf fajok az *Ogataea* (*O. histrianica*, *O. kolombanensis*) és a *Kuraishia* (*Ku. mediterranea*) nemzetségekhez tartoznak. A rRNS-t kódoló gén nagy alegysége D1/D2 régiójának bázissorrend elemzésén alapuló törzsfán (13. ábra) az *O. kolombanensis* és az *O. histrianica* az *O. deakii*-val és az *O. phyllophila*-val alkot egy kládot, amely a nemzetség típusfaja, az *O. minuta*, közelében helyezkedik el, azonban sem maga a klád, sem annak az *O. minuta* közelében való elhelyezkedése nem rendelkezik számottevő statisztikai megbízhatósággal. Az *O. histrianica* leírásakor ismert 6 törzs közül 5 Szlovéniában gyűjtött olívaolaj üledékekből, egy pedig szüretlen extra szűz olívaolajból (Olaszország) került izolálásra, míg az *O. kolombanensis* 2 ismert törzse szlovén olívaolaj üledékekből származott (Čadež és mtsai, 2013).



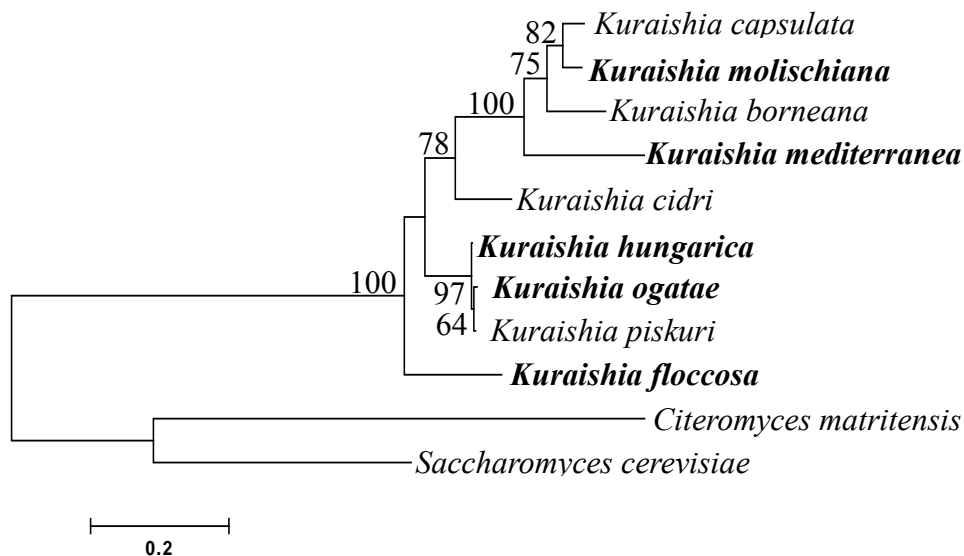
13. ábra. Az *Ogataea* nemzetség és az azzal rokon *Candida* fajok elhelyezkedése a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a neighbor-joining módszerrel (Saitou és Nei, 1987) készült. Az optimális törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciókat/deléciókat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 503 pozíciót tartalmazott. A *Saccharomyces cerevisiae* szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

A két faj leírása óta számos további *O. histrianica* törzset izoláltunk Szlovéniából származó olívaolaj üledékekből és különböző földrajzi eredetű olívaolajokból, amelyek között néhány romlott is volt. A csoport két további faja is növényi szubsztrátumokról ismert. Az *O. deakii* egyetlen ismert törzsét barnakorhadt faanyagról (*Fagus sylvatica*, Pilis hegység) izoláltuk, míg az *O. phyllophila* típus törzse és két további paratípus törzse azonosítatlan fa leveléről származik Thaiföldről (Koowadjanakul és mtsai, 2011). Az *O. deakii*-t Deák Tibor tiszteletére neveztük el, aki jelentős mértékben járult hozzá az élesztőgombák élelmiszerekben betöltött szerepének a feltárásához. Lipolitikus aktivitást sem az *O. histrianica*, sem az *O. kolombanensis* vizsgált törzsei nem mutattak. Az olívaolaj minőségére gyakorolt esetleges hatás mindkét faj esetén még feltárássra vár. β -glükozidáz aktivitásuknak köszönhetően szerepet játszhatnak az friss olívaolaj keserű ízének mérséklésében (Ciafardini és Zullo, 2002a).

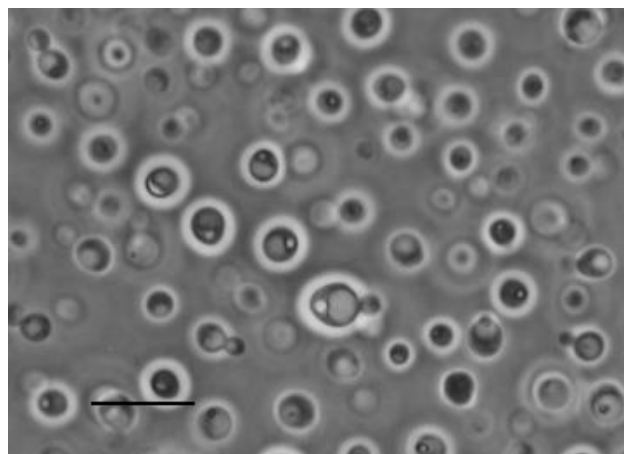
A nemrégiben leírt *Kuraishia mediterranea* a nemzetség típusfajával, a *Ku. capsulata*-val, valamint a *Ku. molischiana*-val és a *C. borneonana*-ként leírt (Sipiczki, 2012), *Ku. borneana*-val egy központi csoportot (100% bootstrap érték) alkot a nemzetségen belül. Az ITS és D1/D2 régiók elemzésén alapuló törzsfán az elemzésbe vont fajok körében a *Kuraishia* nemzetségnek is 100%-os a statisztikai megbízhatósága (14. ábra). A fent említett központi csoport magába foglalja a nemzetség jelenleg ismert valamennyi aszkospóra képző fajt (*Ku. capsulata*, *Ku. molischiana* és *Ku. mediterranea*). A *Ku. mediterranea* a nemzetség típusfajához és a *Ku. molischianához* hasonlóan bőséges tokanyagot termel (15. ábra), és heterogám, ritkábban izogám konjugációt követően 2 könnyen kiszabaduló kalap alakú aszkospórát képez.

Míg a *Ku. mediterranea* a *Ku. borneana*-tól számos szén- és nitrogénforrás asszimilációjának képességben különbözik, a standard fenotípusos bélyegek skáláján mindössze a glükózamin nitrogénforrásként történő hasznosításának képességében tér el a *Ku. capsulata*-tól és a *Ku. molischiana*-tól. Míg utóbbi két faj képes a glükózamint nitrogén forrásként hasznosítani, a *Ku. mediterranea* nem rendelkezik ezzel a tulajdonsággal (Čadež és mtsai, 2017). A faj leírásakor vizsgált hat törzs közül kettő szlovén olívaolaj üledékből származott, míg négy törzs romlott portugál olívaolaj mintákból. A faj olívaolajban betöltött szerepe egyelőre ismeretlen. Ahogy fent említésre került, β -glükozidáz aktivitásának köszönhetően a *K. mediterranea* is betölthet pozitív szerepet az olívaolaj organoleptikus tulajdonságainak alakításában. Lipolitikus aktivitást egyik törzs esetében sem tapasztaltunk. Egyelőre az sem ismert, hogy a *Ku. mediterranea* törzsek gyakorolhatnak-e negatív hatást az

olívaolaj minőségére, viszont mind a négy portugál olívaolaj romlott volt, amelyből a *Ku. mediterranea* paratípus törzsek származtak (Čadež és mtsai, 2017).



14. ábra. A *Kuraishia* nemzetség rokonsági viszonyai az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Hasegawa-Kishino-Yano modellre (Hasegawa és mtsai, 1985) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 946 pozíciót tartalmazott. A *Saccharomyces cerevisiae* és a *Citeromyces matritensis* szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.



15. ábra. A *Kuraishia mediterranea* (ZIM 2473^T) tokanyag képzése. 5%-os maláta kivonat agar, 25°C, 3 nap. Tussal készített preparátum. A tokanyag a sejtek körüli világos udvarként figyelhető meg. Léptékvonal 10 µm.

A fent említetteknél jóval ritkábban izoláltuk egy korábban ismeretlen *Brettanomyces* faj képviselőit. A faj leírásakor (Péter és mtsai, 2017a) mindössze két törzs állt a rendelkezésünkre. Ezek egyikét Izraelből származó, olíva ágat tartalmazó, romlott olívaolajból izoláltuk 2003-ban, majd számos sikertelen próbálkozás után, több mint 10 évvel később egy további törzset izoláltunk egy Spanyolországból származó extra szűz olívaolajból. Utóbbi törzs izolálására az anyagok és módszerek fejezetben leírt, általunk kidolgozott módszer (Péter és mtsai, 2017a) alkalmazását követően került sor, melynek során centrifugálás segítségével vizes fázisba juttattuk az olívaolajban található mikroorganizmusokat. A két, a minta származásának földrajzi elhelyezkedést tekintve meglehetősen eltérő eredetű, különböző időpontban izolált törzs rRNS gén nagy alegysége D1/D2 doménjének bázissorrendjei, néhány nehezen azonosítható nukleotid bázist leszámítva, gyakorlatilag azonosnak bizonyultak. Radikálisan eltértek azonban minden a GenBank adatbázisában megtalálható DNS bázissorrendtől. A GenBank adatbázisában található szekvenciákkal való összevetés során még a kevésbé szigorú BLASTN algoritmus is csak az új faj D1/D2 szekvenciájának egy részét (mintegy 70%-át) volt képes összehasonlítani az adatbázisban található szekvenciákkal, a bázissorrendekben fellelhető különbségek mértéke miatt. A legközelebbi találat a *Brettanomyces naardenensis* típus-törzse volt, amitől azonban a CLUSTAL_X (Thompson és mtsai, 1997) programmal történt összehasonlítás alapján 126 szubsztitúcióval (22%) és 30 inszercióval/delécioval (5%) tért el az új faj szekvenciája. A rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzésén alapuló törzsfá az új faj helyét *Brettanomyces/Dekkera* kládban jelölte ki (16. ábra) nagy statisztikai valószínűséggel (bootstrap érték 98%), egy szokatlanul hosszú elágazás végén. A transzlációs elongációs faktor 1- α (EF-1 α) gén szekvencia elemzés szintén a *Brettanomyces/Dekkera* kládba helyezi az új fajt, de jóval kisebb statisztikai alátámasztottsággal, míg a rRNS gén kis alegységének elemzése alapján kapott törzsfán a *Brettanomyces/Dekkera* kládon kívül helyezkedik el (Péter és mtsai, 2017a, 2. kiegészítő ábra). A rRNS gén kis és nagy alegységének valamint az EF-1 α gén összefűzött szekvenciáinak elemzése azonban szintén a *Brettanomyces/Dekkera* nemzetségekben jelöli ki az új faj helyét 100%-os statisztikai valószínűséggel (Péter és mtsai, 2017a, 1. ábra).



16. ábra. A *Brettanomyces acidodurans* elhelyezkedése a filogenetikai törzsfán a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura-Nei modellre (Tamura és Nei, 1993) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 449 pozíciót tartalmazott. A *Schizosaccharomyces pombe* szolgált kijelölt külcsoportként (outgroup). A léptékvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

Az új faj mindkét vizsgált törzse, hasonlóan az eddig ismert *Brettanomyces* és *Dekkera* fajokhoz nagy mennyiségű ecetsavat termel (17. ábra). Figyelemre méltó, hogy az erős ecetsavtermelés ellenére ezek a törzsek, eltérően az ismert *Brettanomyces* és *Dekkera* fajoktól, nem rövid életűek, a táptalajhoz adott kalcium-karbonát nélkül is hosszú ideig fenntarthatóak

ferdeagar tenyészet formájában, akár szobahőmérsékleten is. Aszkospóra képzést sem az egyes törzsekben, sem a két törzs keverékében nem sikerült megfigyelnünk.



17. ábra. A *Brettanomyces acidodurans* típustörzsének (NCAIM Y. 02178^T) ecetsav termelése (Custers' agar, 25 °C, 14 nap)

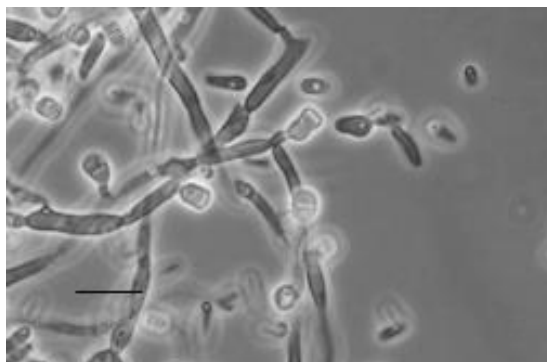
A szokatlanul nagy DNS szekvencia különbségek miatt felmerült egy új nemzetség bevezetésének lehetősége is. Mivel azonban a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése, csakúgy, mint a multigén filogenetikai analízis nagy statisztikai valószínűséggel a *Brettanomyces/Dekkera* kládba helyezte az új fajt, amely rendelkezik a *Brettanomyces* és *Dekkera* fajokra jellemző szünapomorf tulajdonsággal, az ecetsavtermelés képességével is, a két nemzetség egyikébe való besorolása mellett döntöttünk. A Melbourne Kód (McNeill és mtsai, 2012) nem teszi lehetővé különböző nevek használatát egyazon pleomorf gomba anamorf és teleomorf alakjai esetében, ezért szükségszerűvé válik a jól körülhatárolt filogenetikai csoportot alkotó *Brettanomyces* és *Dekkera* nemzetségek összevonása. A Melbourne Kód azonban már nem írja elő, hogy a holomorf az ivaros forma nevét viselje. Mivel valószínű, hogy a sokkal elterjedtebben használt *Brettanomyces* nevet fogják előnyben részesíteni a *Dekkera*-val szemben (Steensels és mtsai, 2015; Kurtzman, személyes kommunikáció, 2017), az új fajt *Brettanomyces*-ként írtuk le. A törzsek savtűrő képességére utalva a *Brettanomyces acidodurans* nevet választottuk. A faj leírása óta két, a *B. acidodurans* törzsekhez mind fenotípusos tulajdonságaikat, mind D1/D2 DNS szekvenciájukat tekintve nagyon hasonló törzset

izoláltunk egy Spanyolországból származó romlott extra szűz olívaolajból, amelyeknek ITS szekvenciája azonban az azonos fajon belül megszokottnál nagyobb mértékben (> 2% szubsztitúció) eltér a *B. acidodurans* típustörzs ITS szekvenciájától. A két új izolátum pontos faji besorolását további génszakaszok DNS bázissorrendjeinek összehasonlítása segítségével kívánjuk meghatározni. Lipolitikus aktivitást egyik vizsgált *B. acidodurans* törzs esetében sem tapasztaltunk. A *B. acidodurans* erős ecetsavtermelő képessége miatt viszont szerepet játszhat az olívaolaj boros-ecetes íz minőségi hibájának kialakulásában (Péter és mtsai, 2017a), amelyet eddig kizárólag az ecetsav baktériumok tevékenységének tulajdonítottak (Angerosa és mtsai, 1996; Cayuela és mtsai, 2015).

Az olívaolaj és olívaolaj üledék mintákból származó, már leírt és a fentiekben röviden bemutatott új fajokon kívül további három új fajhoz tartozó törzseket izoláltunk, amelyek leírására egyelőre még nem került sor.

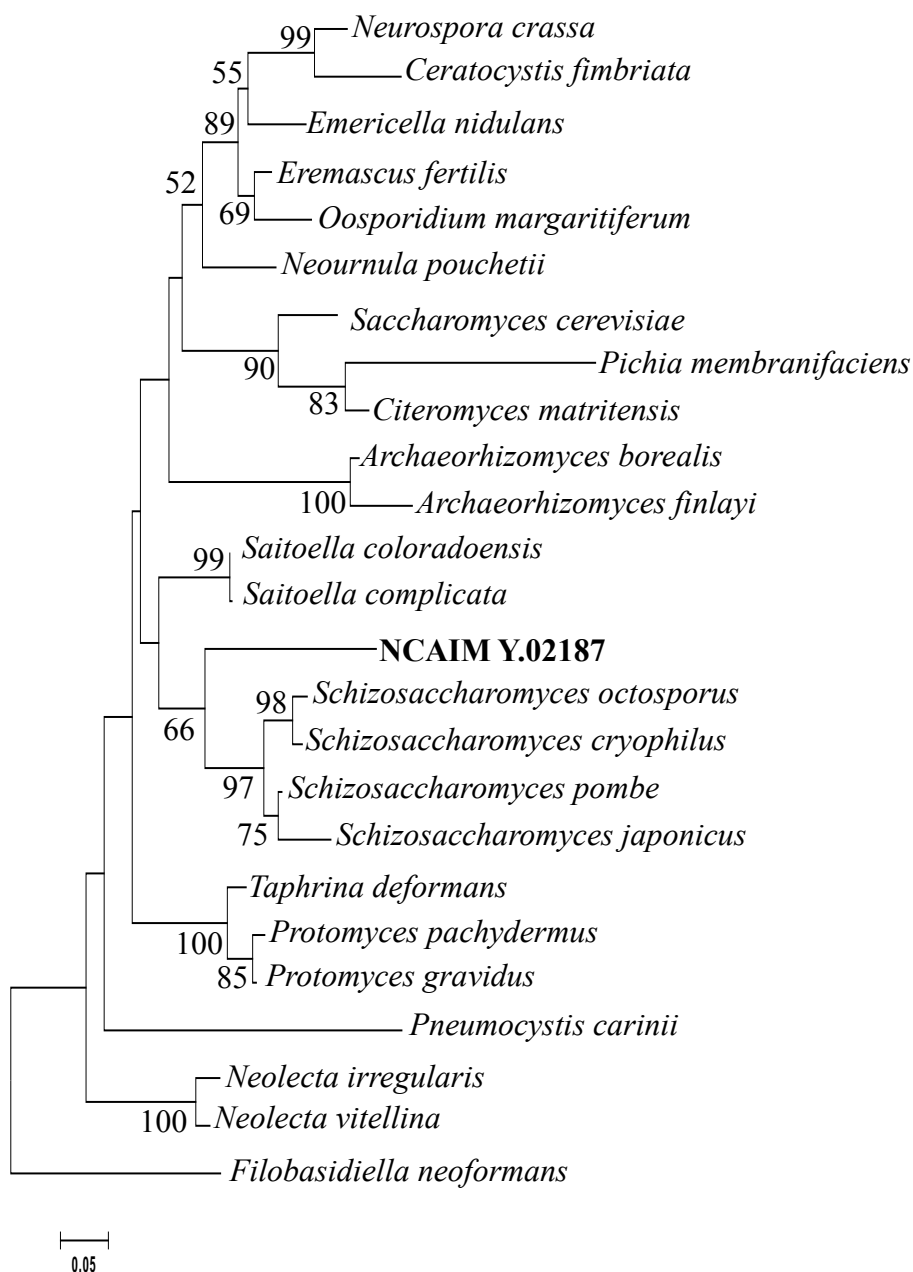
A három leíratlan faj közül az első, olívaolaj üledékből származó, a tudomány számára ismeretlen fajt reprezentáló törzs (A311/1) egy szlovén olívaolaj üledék mintából származik és a Debaryomycetaceae családba tartozik. Az A311/1 jelű törzs rRNS gén nagy alegysége D1/D2 doménjének valamint ITS régiójának bázissorrendje 100%-ban megegyezik a ZIM 2471 jelű törzs megfelelő DNS szakaszainak a bázissorrendjével. A ZIM 2471 jelű törzset a szlovén kollégáink ugyanabból a mintából izolálták, amelyből az A311/1 jelű törzs is származik, tehát valószínű, hogy a ZIM 2471 és az A311/1 törzsek azonosak. A ZIM 2471 jelű törzs D1/D2 szekvenciája deponálásra került a GenBank-ban, ahol a HE799685 azonosítót kapta. A GenBank-ban található DNS szekvenciák közül egy leíratlan „*Pichia diana*e” törzs D1/D2 szekvenciája áll a legközelebb hozzá. A rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának előzetes bázissorrend elemzésén alapuló törzsfán (nem kerül bemutatásra) az A311/1 jelű törzs a *Schwanniomyces etchellsii*-vel és a „*Pichia diana*e”-vel alkot egy számottevő statisztikai megbízhatósággal nem rendelkező kis kládot. A *Schw. etchellsii* a rRNS kis alegységét kódoló gén és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának elemzése alapján bazális pozíciót foglal el a *Schwanniomyces* nemzetségben, de elhelyezkedése nem rendelkezik jelentős statisztikai megbízhatósággal, a nemzetségbe való besorolása ideiglenes, új fajok leírása esetén változhat (Kurtzman és Suzuki, 2010). Az A311/1 jelű törzs a *Schwanniomyces etchellsii*-vel és a „*Pichia diana*e”-vel alkotott csoportjának filogenetikai pozícióját megbízható módon multigén vagy teljes genom bázissorrend elemzés fogja kijelölni. Az A311/1 jelű törzs erős álhifa képző és intenzíven sporulál. Álhifához kapcsolódó aszkuszaiban többnyire két könnyen kiszabaduló kalap alakú

spóra képződik (18. ábra). Erős zsírbontó képességgel rendelkezik, ezért az olívaolajban való ritka előfordulása ellenére valószínű, hogy annak minőségére negatív hatást gyakorol.



18. ábra. Az A311/1 jelű törzs sporuláló tenyésztete (kukoricaliszt agar, 25 °C, 14 nap). A méretvonal hossza 10 µm.

Egy további új faj egyetlen törzsét (NCAIM Y.02187; D1/D2 domén DNS szekvencia GenBank azonosító MG250349) izoláltuk spanyol olívaolajból. A törzs D1/D2 régiójának DNS bázissorrendje valamennyi, a GenBank adatbázisában található DNS szekvenciától jelentősen mértékben különbözik. A fejezet írásakor a legközelebbi találatok sem haladták meg a 88%-os, ha a keresésből a nem tenyésztett mikroorganizmusokból és a környezeti mintákból származó DNS szekvenciákat kizárjuk, akkor a 86%-os hasonlóságot. A rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának elemzése az NCAIM Y.02187 jelű törzs helyét a Taphrinomycotina altörzsben a *Schizosaccharomyces* nemzetség szomszédságában jelöli ki, az elemzésbe vont taxonoktól függően változó, de minden esetben 50%-ot meghaladó statisztikai megbízhatósággal (19. ábra). A 19. ábrán példaként bemutatott filogenetikai törzsfán, és a más fajokat magába foglaló D1/D2 szekvencia elemzések alapján generált filogenetikai törzsfákon sem alkot monofiletikus csoportot a Taphrinomycotina altörzs. A Taphrinomycotina altörzs még a Kurtzman és Robnett (2013) által, 70 Ascomycota élesztőgomba nemzetség típusfajainak bevonásával elvégzett multigén [rRNS gén kis és nagy alegység, EF-1 α , RNS polimeráz II gén 1-es (RPB 1) és 2-es (RPB 2) alegység] analízis eredményeként megalkotott törzsfán sem képez monofiletikus csoportot. Monofiletikus csoportként különül viszont el a Taphrinomycotina altörzs a filogenomikai elemzésekben (Liu és mtsai, 2009; Riley és mtsai, 2016).



19. ábra. Az NCAIM Y.02187 törzs elhelyezkedése a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázis sorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfa a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura-Nei modellre (Tamura és Nei, 1993) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfa kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 451 pozíciót tartalmazott. A *Filobasidiella neoformans* szolgált kijelölt külsőportként (outgroup). A léptékvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

Annak ellenére, hogy ivartalanul sarjadzással szaporodik, az NCAIM Y.02187 jelű törzs semmilyen általunk alkalmazott taxon szelekció mellett nem alkotott a Taphrinomycotina altörzs sarjadzó élesztőgombáit magába foglaló nemzetségeivel (*Protomyces*, *Saitoella*, *Taphrina*) közös csoportot. A rRNS kis alegységét kódoló gén DNS szekvenciájának elemzése alapján készített törzsfán (nem kerül bemutatásra) is a *Schizosaccharomyces*-szel alkot közös kládot a törzs. Valószínűleg egy eddig teljesen ismeretlen, új leszármazási vonalat képvisel a Taphrinomycotina altörzsön belül. Az NCAIM Y.02187 jelű törzs filogenetikai pozícióját a teljes genom szekvencia adatokra támaszkodva kívánjuk megbízható módon meghatározni. A törzs fenotípusos tulajdonságai (enteroblasztikus sarjadzás, ureáz aktivitással és negatív Diazónium-blue B reakcióval társulva) összhangban vannak az előzetes filogenetikai elemzések alapján a Taphrinomycotina altörzsbe történt besorolással. Erőfeszítéseink ellenére, az NCAIM Y.02187 jelű törzs által képviselt új faj további törzseit egyelőre nem sikerült izolálnunk. Mivel az új faj rendkívül ritkán fordul elő olívaolajban és annak üledékében, és az egyetlen eddig ismert törzse zsírbontó képességgel nem rendelkezik, mind az elsődleges élőhelye, mind az olívaolaj minőségére esetlegesen gyakorolt hatása ismeretlen.

Szlovén olívaolaj üledékből származik egy eddig leíratlan *Tremella* faj egyetlen ismert törzse (NCAIM Y.02192) is. Ez az egyetlen bazídiumos élesztőgomba, amelyet olívaolajból vagy annak üledékéből eddig izoláltunk.

A Szlovéniából származó olívaolaj üledékekben többször megfigyeltünk olyan orsó alakú, hosszan elvékonyodó és ostorszerű függelékben végződő képleteket (20. ábra), amelyek egyes *Eremothecium* fajok, elsősorban az *E. coryli* (*Nematospora coryli*) aszkospóráira (Kurtzman és de Hoog, 2011) hasonlítanak. Ezeknek a képleteknek (feltehetően aszkospóráknak) érdekes tulajdonsága, hogy sűrűségük kisebb a víz sűrűségénél, centrifugáláskor a vizes fázis tetején koncentrálódnak. Erőfeszítéseink ellenére egyelőre nem sikerült kitenyészteni őket. Az *E. coryli* a trópusi és szubtrópusi területeken a gyapot, a mogoró, a lima bab, a szója és a paradicsom, rovarok által terjesztett parazitájaként ismert (Batra, 1973; Kurtzman és de Hoog, 2011). Az *Eremothecium* olívaolajban való előfordulásáról a legutóbbi időkig nem volt publikált adat. Palla és mtsai (2018) olasz extra szűz olívaolaj mintákból kivont DNS-ből szaporították fel a D1/D2 régió egy kb. 250 bázispár hosszúságú szakaszát, majd a felszaporított DNS fragmentek denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) alkalmazásával választották el egymástól. Az elválasztott DNS fragmentek bázissorrendjeinek meghatározása és a GenBank-ban található szekvenciákkal

való összevetése alapján *E. coryli* és *E. cymbalariae* jelenlétét mutatták ki az általuk vizsgált olívaolajokban. A tanulmányozott D1/D2 fragmentek csekély hosszúsága és a megnevezett fajok típustörzsének homológ DNS szekvenciáihoz képest fennálló 1% körüli vagy azt meghaladó szubsztitúció miatt azonban véleményem szerint a közölt rendszertani azonosítás eredménye megerősítésre szorul.



20. ábra. *Eremothecium* fajok aszkospóráira emlékeztető képlet Szlovéniából származó olívaolaj üledékben. A léptékvonal hossza 10 μ m.

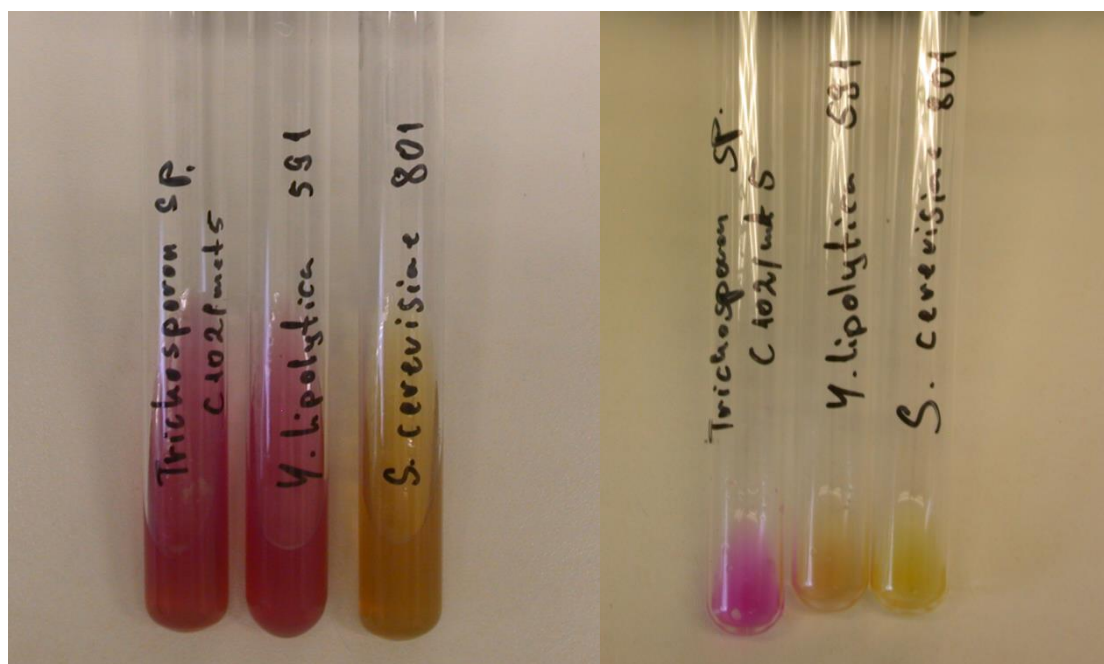
A *Pseudophemoniella oleae* (Pezizomycotina) ugyan nem élesztőgomba, de a fiatal telepei az élesztőgombák telepeire emlékeztetnek. Egy Spanyolországból származó extra szűz olívaolajból és egy Szlovéniából származó olívaolaj üledékből izoláltuk egy-egy törzsét 2016-ban és 2017-ben. A fajt csupán nemrégiben írták le, és a típusanyagot egy *Xylella fastidiosa* nevű baktériummal fertőzött hervadó olajfa ág feketére színeződött farészéről gyűjtötték Olaszországban (Crous és mtsai, 2015). A nemzetség másik fajával, a *Ps. oleicola*-val együtt a különböző olajfa fajták faanyagának elszíneződésével áll kapcsolatban. Fiatal és évszázados fákat egyaránt érinthet az elszíneződés. Az olajfára gyakorolt patogén hatást előzetes inokulációs tesztek mindkét faj esetében megerősítették. Mindkét faj kiterjedt elszíneződést okozott a faanyagban. Az eredmények azt valószínűsítik, hogy szerepet játszanak az olajfák korai elhalásában (Crous és mtsai, 2015). A *Ps. oleae* jelenlétét korábban sem olívaolajból, sem Spanyolországból, sem Szlovéniából származó anyagból nem mutatták ki.

Néhány új *Yarrowia* faj és potenciális szerepük az élelmiszeriparban

Mind az előkísérleteink, mind pedig Nagy (2015) eredményei alátámasztják, hogy a pufferrel kis pH értékre (3,5 - 3,6) beállított, egyedüli szénforrásként hexadekánt tartalmazó tápközegben való dúsítás növeli a *Yarrowia* nemzetségbe tartozó élesztőgombák izolálásának a valószínűségét. Előkísérleteink során a dúsítást követően olyan hús és máj mintákból is izoláltunk *Yarrowia* törzseket, amelyekből dúsítás nélkül ez nem sikerült.

A *Yarrowia* nemzetségnek hosszú ideig csupán a típusfaja, a *Y. lipolytica* volt ismert, és meglehetősen izolált pozíciót foglalt el a filogenetikai törzsfán (Kurtzman és Robnett, 1998). Amikor van der Walt és von Arx (1980) javasolták a monotípusos *Yarrowia* nemzetség bevezetését a *Saccharomycopsis lipolytica* számára, az egyik diagnosztikus bélyegként a pozitív ureáz reakciót említették, amely egyedülálló a Saccharomycotina altörzsből. A Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében található *Y. lipolytica* törzsek rendszertani azonosításának fenotípusos bélyegek alapján történő ellenőrzése során ezt a fontos tulajdonságot nem tudtuk megerősíteni. A jelenség alaposabb vizsgálatát követően kiderült, hogy a *Y. lipolytica* pozitív ureáz tesztje valójában nem ureáz aktivitás, hanem egy módszertani probléma eredménye (Péter és Deák, 1991). A vizsgált *Y. lipolytica* törzsek Christensen's urea agaron (CUA, Christensen, 1946) kivétel nélkül pozitív színreakciót adtak, míg a „Urea Rapid Broth” (URB) levesben (Stuart és mtsai, 1945) egyik törzs esetében sem tapasztaltunk színváltozást (21. ábra). Az élesztőgombák ureáz aktivitását sokáig szinte kizárólag a bakteriológiából átvett CUA-on vizsgálták, 25 °C hőmérsékleten 4-5 napos inkubációs időt követően. A módszer elméleti alapját az adja, hogy az urea bontása során felszabaduló ammónia hatására megemelkedik a közeg pH-ja, amit a fenolvörös indikátor színváltozása (narancsszínűből mélyvörös) jelez. Hasonló elven alapul az URB működési elve is, azzal a különbséggel, hogy ennek a tápközegnek kisebb a puffer kapacitása. Egy nagy kacsnyi fiatal (maximum 48 órás) élesztőgomba tenyésztet inokulálunk 0,5 ml táplevest és az ureáz enzim hőmérsékleti optimumához közeli hőmérsékleten, 37 °C-on, inkubáljuk 4 órán keresztül (Roberts és mtsai, 1978), függetlenül attól, hogy a vizsgált törzs képes-e szaporodni ezen a hőmérsékleten. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy amennyiben a CUA-t urea nélkül készítjük el, de helyette vagy 0,5% élesztőkivonatot adunk a táptalajhoz vagy a pepton mennyiségét emeljük meg 0,5%-ra, akkor a *Y. lipolytica* törzsek ugyanolyan vörös színreakciót adnak, mint urea jelenlétében. Ebből, és a színreakciónak az URB alkalmazásakor tapasztalt hiányából következik, hogy a *Y. lipolytica* törzsek esetében a

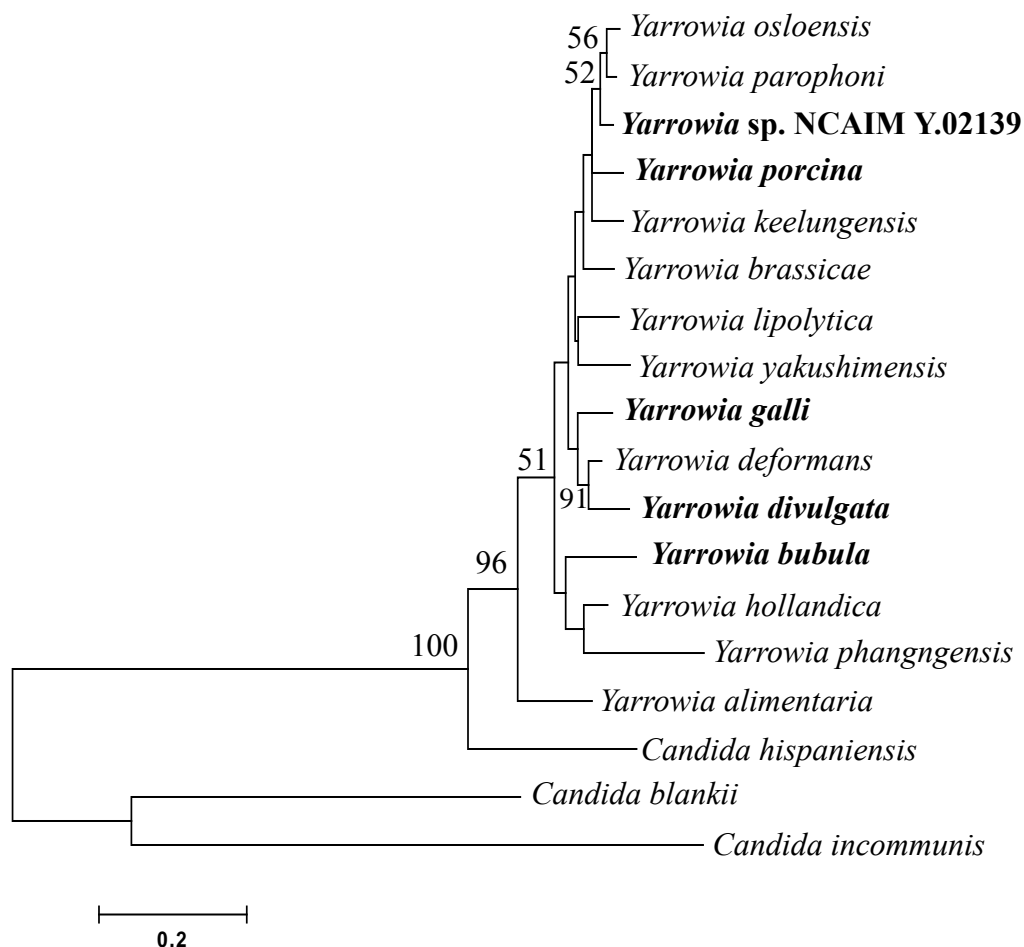
CUA színváltozását nem az ureáz enzim aktivitása, hanem egy nem-specifikus lúgosodási folyamat okozza, ezért a *Yarrowia* törzsek esetén az URB alkalmazását javasoltuk az ureáz aktivitás vizsgálatára (Péter és Deák, 1991). A *Y. lipolytica* típus törzséről Booth és Vishniac (1987) már korábban kimutatták, hogy ureáz negatív. A régi beidegződések következtében lassan ment át a köztudatba, hogy a korábban feltételezettel ellentétben a *Y. lipolytica* nem termel ureáz enzimet, de a *The Yeasts: A Taxonomic Study* legutóbbi kiadásában (Kurtzman és mtsai, 2011a) már ezt az eredményt fogadják el a szerzők.



21. ábra. A *Yarrowia lipolytica* ureáz aktivitásának vizsgálata. Bal oldali panel Christensen's urea agar, jobb oldali panel „Urea Rapid Broth”. A vizsgált törzsek sorrendben balról jobbra (mindkét panel) *Trichosporon* sp. (C102/met5), pozitív kontroll; *Yarrowia lipolytica* (NCAIM Y.00591^T); *Saccharomyces cerevisiae* (NCAIM Y.00801^T), negatív kontroll.

A *Y. lipolytica* a húsról és húskészítményekről leggyakrabban izolált élesztőgombák közé tartozik (Deák, 2008a). Egy korábbi tanulmány során (Ismail és mtsai, 2000) csirkehúsról és májból fenotípusos tulajdonságai alapján a *Y. lipolytica*-ra nagymértékben hasonló törzseket izoláltak az Amerikai Egyesült Államokban. A fenti tanulmányból származó hat törzs vizsgálata során észrevettük, hogy a nagyfokú fenotípusos hasonlóság ellenére a hat törzs rRNS kis alegységét kódoló gén és az azzal szomszédos ITS régió restrikciós enzim analízise (Dlauchy és mtsai, 1999) során kapott mintázata jelentősen eltér a *Y. lipolytica* típus törzs mintázatától (Péter és mtsai, 2004). Az amerikai izolátumoknak a *Y.*

lipolytica típustörzsétől való genetikai eltérését a D1/D2 régió DNS bázissorrendjének összehasonlítása is megerősítette. Míg az amerikai törzsek több mint negyven nukleotidban (zömében szubsztitúció) különböztek a *Y. lipolytica* típustörzsétől, az amerikai törzsek D1/D2 szekvenciái között mindössze 1 szubsztitúciót detektáltunk. Mivel sem az egyes törzsekben, sem a törzsek keverékének tenyészeiben nem sikerült spóráképzést megfigyelnünk, az új fajt az akkor érvényes nevezéktani szabályoknak megfelelően a *Candida* nemzetségbe soroltuk, és *C. galli* néven írtuk le (Péter és mtsai, 2004). A faj leírása óta számos további törzset izoláltunk, elsősorban különböző húsokról. A *C. galli* törzsei közötti keresztezések a faj leírása óta eltelt időben sem eredményeztek sporuláló tenyészeteket, viszont érdekes módon Knutsen és mtsai (2007) aszkospóra képzésről számoltak be *C. galli* és *Y. lipolytica* valamint *C. galli* és *C. deformans* törzsek keresztezését követően. Ennek ellenére a *C. galli* önálló faji státuszát Knutsen és mtsai (2007) is megerősítették PCR ujjlenyomatok és DNS bázissorrend (ITS és D1/D2 régiók) összehasonlítása, valamint az általuk vizsgált törzsek közötti DNS homológia mértékek alapján. A fajon belüli ivaros szaporodás detektálásának hiánya ellenére, összhangban a Melbourne Code-dal, Crous és mtsai (2017) a *C. galli*-t a *Yarrowia* nemzetségbe sorolták. A *Y. (Candida) galli* a *Y. lipolytica*-tól fenotípusosan mindössze az N-acetil-D-glükózamin asszimilációjára való képesség hiányában tér el egyértelműen. A *Y. galli* elhelyezkedését az ITS és D1/D2 szekvenciák elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán a 22. ábra szemlélteti. A faj leírása óta számos törzset izoláltunk különböző húsokról. A *Y. galli* mitokondriális genomjának bázissorrendjét Gaillardin és mtsai (2012) meghatározták és összevetették a *Y. lipolytica* és a nemzetség néhány további fájának mitokondriális genom bázissorrendjével. A *Y. galli*, a *Y. lipolytica*-hoz hasonlóan, képes sejtjeiben a teljes szárazanyag tartalma 20-25%-ának megfelelő lipidet felhalmozni (Michely és mtsai, 2013; Quarterman és mtsai, 2017), ami potenciális élelmiszeripari felhasználási lehetőséget rejt magában, de takarmányozási célra és biodízel előállítására is szóba jöhet. Ashengroph és mtsai (2011) a *Y. (Candida) galli* egy törzséről, élesztőgombák közül elsőként, kimutatták, hogy az izoeugenolt vanillinné és vanillinsavvá képes transzformálni. A vanillin a második legnagyobb, évi 15 000 tonna, mennyiségben előállított aroma komponens (Zheng és mtsai, 2007). Bár két ízben izoláltak *Y. galli* törzset gombás körömről is (Galán-Sánchez és mtsai, 2014; Abdel-Sater és mtsai, 2016), a szerzők egyik esetben sem bizonyították, hogy a *Y. galli* okozta a gombás megbetegedést. A *Y. galli* nem képes szaporodni sem 35 °C, sem 37 °C hőmérsékleten.



22. ábra. A *Yarrowia* fajok közötti rokonsági viszonyok az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázis sorrend elemzése alapján. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura-Nei modellre (Tamura és Nei, 1993) alapozva. A legnagyobb logaritmusos valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 677 pozíciót tartalmazott. A *Candida blankii* és a *C. incommunis* szolgált külsoporként (outgroup). A léptékvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

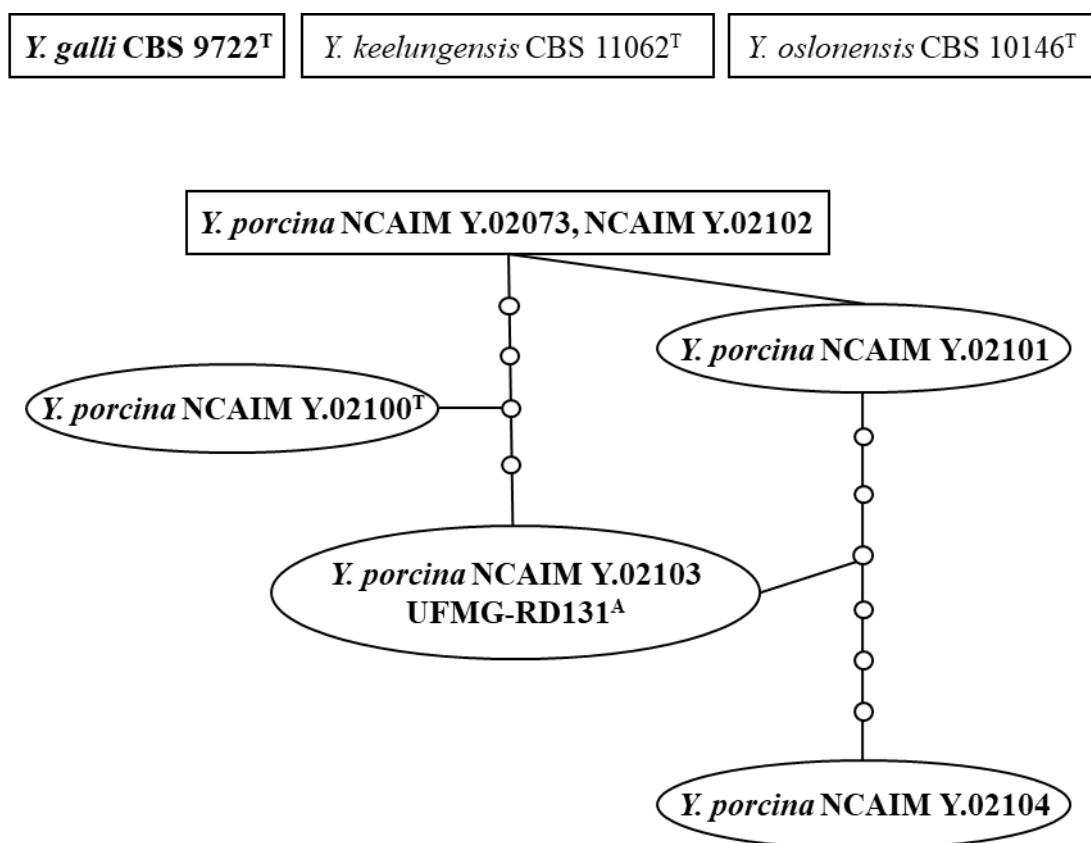
A következő, közreműködésünkkel leírt *Yarrowia* faj a *Y. divulgata* (Nagy és mtsai, 2013) volt. A *Y. divulgata* leírását 5 törzs alapján végeztük el. A típustörzs egy dán szalonna feldolgozó üzem berendezésének a felszínéről, két törzs csirkemájáról származott az Amerikai Egyesült Államokból (Ismail és mtsai, 2000), a további két törzset pedig Magyarországon izoláltunk csirkemellről illetve darált marhahúsról. Eltérő földrajzi eredetük ellenére a hat törzs D1/D2 és ITS régióinak azonos volt a DNS bázissorrendje, és jelentősen különbözött a bázissorrend összehasonlítások alapján legközelebbi faj, a *Y. deformans* bázissorrendjétől

(sorrendben 3 és 6% különbséget detektáltunk a D1/D2 és az ITS régiók esetében). Az ITS és D1/D2 szekvenciák elemzésén alapuló törzsfán (22. ábra) a *Y. divulgata* a *Y. (Candida) deformans*-szal alkot egy nagy statisztikai megbízhatósággal rendelkező csoportot (bootstrap érték 91%). A jelentős genetikai különbség ellenére az élesztőgombák jellemzésére használt standard fenotípusos tesztek alapján a *Y. divulgata* nem különíthető el a *Y. lipolytica*-tól és a *Y. deformans*-tól. A *Y. divulgata* a *Y. galli*-hoz hasonlóan nem szaporodik 35 °C hőmérsékleten. Mind az öt paratípus törzs melegvérű állatokhoz kapcsolódó környezetből (szalonna feldolgozó üzem, csirkemáj, csirke- és marhahús) származott és a faj leírását követően néhány további törzset is izoláltunk húsokról. A melegvérű állatokhoz köthető előfordulás mellett valószínűsíthető, hogy a faj tengeri környezetben is előfordul, ugyanis a GenBank adatbázisában található a *Y. divulgata* típustörzsének D1/D2 szekvenciájával megegyező D1/D2 szekvenciák (EU596435, EU583484, EU560880, EU360775, EU285507 és EU294124), amelyek tengeri élőhelyekről (mélytenger víz és tengeri hal) izolált élesztőgomba törzseket képviselnek. Sajnos, erőfeszítéseink ellenére, ezeket a törzseket nem tudtuk beszerezni és tanulmányozni. Aszkospóra képzést sem az egyes törzsek, sem a törzsek keverékének tenyésztésében nem tudtunk kimutatni. Ennek ellenére, a Melbourne Code-dal összhangban, a *Yarrowia* nemzetség tagjaként írtuk le az új fajt, Lachance (2012) ajánlását követve a *forma asexualis* (f.a.) megjelölés feltüntetésével, annak jelölésére, hogy ivaros szaporodást nem sikerült megfigyelnünk. A „divulgata” fajnév az új faj széleskörű (globális) földrajzi elterjedésére (Magyarország, Dánia, USA, Kína) utal. A *Y. divulgata* az élelmiszeriparban használatos édesítőszeres ígéretes forrása, mivel glicerint tartalmazó tápközegben szaporítva nagy mennyiségű eritritet és mannitot termel (Rakicka és mtsai, 2016).

Ugyancsak elsősorban melegvérű állatokhoz kötődik a *Y. bubula* és a *Y. porcina* (Nagy és mtsai, 2014). A *Y. bubula* leírásakor öt törzset vizsgáltunk. Mind az öt törzset Magyarországon izoláltuk marhahúsról, darált marhahúsról, darált sertéshúsról és pulyka húspépről. A fent bemutatott *Y. divulgata*-hoz hasonlóan az öt törzsnek azonos volt a D1/D2 és ITS DNS bázissorrendje, és a nemzetség többi fajától legalább 9% eltérést tapasztaltunk mindkét régió esetében. Sem az egyes törzsek, sem az öt törzs keverékének a tenyésztésében nem sikerült aszkospóra képzést megfigyelnünk. Egyik törzs sem szaporodott 30 °C vagy annál nagyobb hőmérsékleten. A *Yarrowia* nemzetség jelenleg további két olyan fajt (*Y. alimentaria*, *Y. yakushimensis*) foglal magába, amelyek nem képesek 30 °C hőmérsékleten szaporodni. Ezekről a *Y. bubula* néhány szén-forrás asszimilációs teszt alapján elkülöníthető.

A *Y. bubula* az ITS és D1/D2 szekvenciák elemzésén alapuló filogenetikai törzsfá (22. ábra) alapján 100%-os valószínűséggel a *Yarrowia*-kládba tartozik, ezért *forma asexualis* (f.a.) megjelölés feltüntetésével *Yarrowia*-ként írtuk le. A faj leírása óta számos további törzset izoláltunk húsokról.

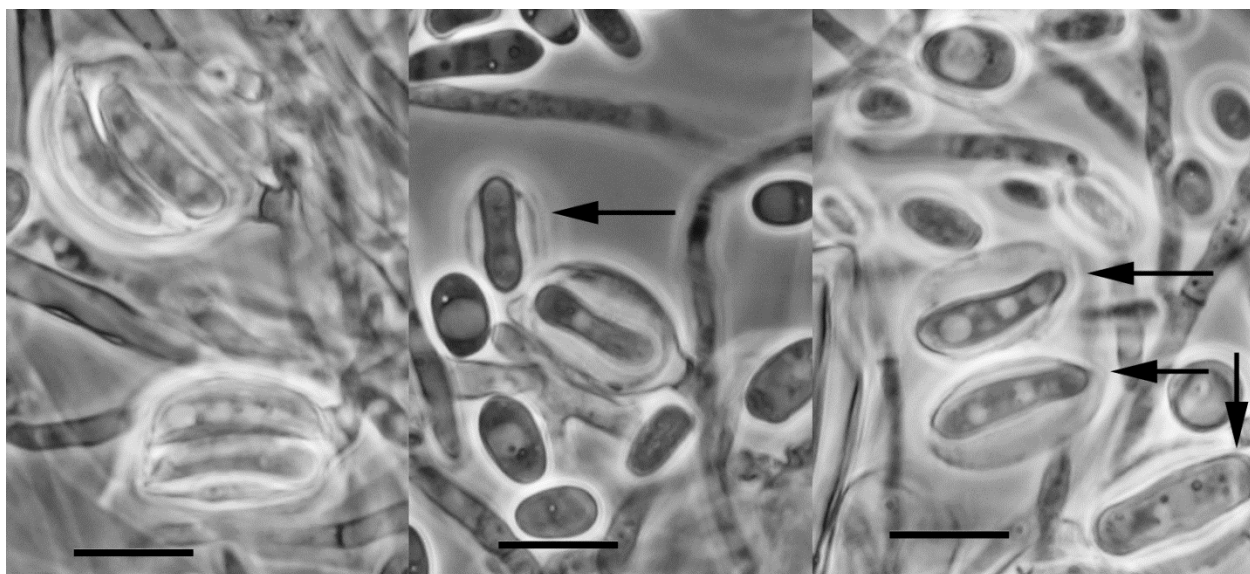
A *Y. porcina* hét paratípus törzse közül ötöt darált sertéshúsról, egyet pedig darált marhahúsról izoláltunk Magyarországon. A hetedik törzs egy trópusi folyó (Doce) üledékéből származott, Brazíliából. A Doce folyó különböző emberi tevékenységek (szarvasmarhatartás, bányászat, kommunális és ipari szennyvíz) hatásának van kitéve (Medeiros és mtsai, 2008). A *Y. bubula*-val ellentétben a *Y. porcina* törzsek mind D1/D2 mind ITS régiókban egymástól eltérő DNS bázissorrenddel rendelkeztek. Elsősorban egy, darált marhahúsról izolált, törzs (NCAIM Y.02104) mutatott a többi törzstől jelentősen eltérő D1/D2 bázissorrendet. A D1/D2 domén szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján 0-7 szubsztitúcióban tértek el a törzsek egymástól, ezen belül az NCAIM Y.02104 jelű törzs 5-7 szubsztitúcióban különbözött a többi törzstől. Ez a különbség mind Kurtzman és Robnett (1998), mind Vu és mtsai (2016) iránymutatása alapján azt sugallta, hogy a többitől leginkább eltérő törzs (NCAIM Y.02104) külön fajba tartozik. Ezzel szemben az ITS régiók bázissorrendjének összehasonlítása jóval kisebb diverzitást (0-3 szubsztitúció) tárt fel a törzsek között, ezen belül az NCAIM Y.02104 azonosítószámú törzs bázissorrendje legfeljebb 2 szubsztitúcióval tért el a többi törzsetől. Ez mind a Daniel és mtsai (2009), mind a Vu és mtsai (2016) által adott előrejelzés szerint a törzsek azonos fajhoz tartozását valószínűsítette. Az ITS régióban megfigyelt, a D1/D2 régióban detektált variabilitásnál kisebb, DNS bázissorrend eltérés meglehetősen szokatlan, mert a rRNS-t kódoló géneket egymástól elválasztó ITS régió általában gyorsabban változik, mint a kódoló régiók (Chen és mtsai, 2000), bár nem példa nélküli. Fonseca és mtsai (2000) például arról számoltak be, hogy egyes *Cryptococcus* fajták esetében az ITS 2 régióban kisebb volt a fajok közötti bázissorrend eltérés, mint a D1/D2 régióban. Hasonló esetet figyeltek meg a *Yarrowia*-kládban Knutsen és mtsai (2007). A *C. alimentaria* két vizsgált törzsének D1/D2 domén bázissorrendjei között 9 szubsztitúciót detektáltak, míg az ITS szekvenciái között mindössze egyet. A két törzs azonos fajhoz való tartozását a PCR-ujjlenyomat technikával nyert hasonló mintázatok és a 100%-os DNS homológia érték erősítették meg. A *Y. porcina* esetében a törzsek azonos fajba sorolását ugyancsak a PCR-ujjlenyomat technikával nyert hasonló, és a rokon fajokétól eltérő, mintázatok valamint a parszimónia (takarékoság) kapcsolatháló-elemzés (parsimony network analysis) eredménye támasztotta alá (Nagy és mtsai, 2014, 23. ábra).



23. ábra. Parszimónia (takarékoság) kapcsolatháló a *Yarrowia porcina* paratípustörzsének és néhány közeli rokon faj típustörzsének az összefűzött ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján. Az összekötő szakaszok 1-1 szubsztitúciót, a kis körök pedig hiányzó köztes szekvenciákat jelölnek. Az elemzés által ősiként azonosított szekvenciákat téglalap jelöli. Az elemzést a TCS 1.21 programmal (Clement és mtsai, 2000) végeztük, az inszerciót/deléciót tartalmazó pozíciók kizárásával, 95%-os kapcsolódási határérték alkalmazásával [Nagy és mtsai (2014) nyomán, módosítva.]

A hét vizsgált *Y. porcina* törzs egyike sem sporulált tiszta tenyészetben az általunk alkalmazott spóráztató táptalajokon, sem 15 °C, sem 25 °C hőmérsékleten. A törzsekből előállított kevert tenyészet azonban a penészgombák másodlagos anyagcsere termékeinek vizsgálatára ajánlott YES agaron (Samson és mtsai, 2004), 25 °C hőmérsékleten, 1-3 hét inkubációt követően aszkospórát képzett. A YES agart korábban nem használták élesztőgombák aszkospóra képzésének vizsgálatára. A törzsek valamennyi lehetséges módon végrehajtott páronkénti keresztezése felfedte, hogy a brazil folyó üledékéből származó törzs három Magyarországon izolált törzssel, köztük a D1/D2 domén bázissorrendjében a többitől leginkább eltérő NCAIM Y.02104 azonosítószámú törzssel, keresztezve aszkospórát képzett, míg a további három magyarországi izolátummal nem. Aszkuszonként 1-4, könnyen kiszabaduló, kalap alakú, ellipszoid vagy allantoid, tokanyagba ágyazott aszkospórát

figyeltünk meg (24. ábra). Két törzs (a típus és az allotípus törzsek) sporuláló tenyészetében, több mint 100 nap inkubációt követően néhány askospóra esetében a spóra sarjadzással történő kicsírázását is megfigyeltük (Nagy és mtsai, 2014), ami azt jelzi, hogy a spóráknak egy része bizonyosan életképes volt. A húsokról Magyarországon izolált törzsek semmilyen kombinációban történt keresztezése után nem sikerült askospóra képződést megfigyelnünk. A hét vizsgált törzs közül három esetében egyáltalán nem tudtunk sporulációt indukálni. Leírásakor a *Y. porcina* volt a nemzetség harmadik teleomorf faja, és mindmáig az egyetlen ismert *Yarrowia* faj, melynek askospórái tokanyagba vannak ágyazva. A *Y. porcina* leírásakor ismert (*Y. lipolytica*, *Y. deformans*) és az azóta leírt (*Y. parophoni*) feltárt ivaros szaporodású *Yarrowia* fajok a *Y. porcina*-hoz hasonlóan heterotallikusak (Kurtzman, 2011c; Groenewald és Smith, 2013; Crous és mtsai, 2017). A *Y. porcina* esetében (leszámítva a tokanyagba ágyazott askospórák képzését) nem találtunk olyan fenotípusos tulajdonságot, aminek segítségével egyértelműen el lehetne különíteni a *Y. deformans*-tól, a *Y. divulgata*-tól, a *Y. keelungensis*-től és a *Y. lipolytica*-tól. A felsorolt öt faj tehát egy, a standard fenotípusos tesztek alapján egymástól megkülönböztethetetlen fajokból álló komplexet alkot.



24. ábra. A *Yarrowia porcina* típus- és allotípustörzseinek (NCAIM Y.02100^T és UFMG-RD131^A) keresztezésével létrehozott sporuláló tenyészet (YES agar, 25 °C, 7 nap). A nyilak az askuszokból kiszabadult, tokanyagba ágyazott, askospórákat jelölnek. A méretvonal hossza 10 µm. (Nagy és mtsai, 2014; a kiadó engedélyével)

Egy általunk csirkemájról izolált *Yarrowia* törzs (NCAIM Y.01999) D1/D2 régiójának DNS bázissorrendje a bázissorrendek páronkénti összehasonlítása alapján legközelebbi leírt

faj, a *Y. galli*, típustörzsétől (NCAIM Y.01482^T) 19 szubsztitúcióval tér el. ITS szekvenciája a faj típustörzsétől 6 szubsztitúcióval és 2 indellel tér el, egy további igazoltan konspecifikus törzsétől (NCAIM Y.01486) viszont mindössze két indellel. A fenti példák figyelembevételére alapján a majdnem 4%-os D1/D2 divergencia ellenére valószínűsíthető, hogy az NCAIM Y.01999 azonosító számú törzs egy, a faj típustörzsétől szokatlanul nagymértékben eltérő D1/D2 DNS szekvenciával jellemzett *Y. galli* törzs. Az NCAIM Y.01999 azonosítószámú törzs megbízható rendszertani besorolását további lokuszok bázissorrendjeinek összehasonlítását követően fogjuk elvégezni.

Egy további, darált marhahúsról izolált, törzs (NCAIM Y.02139; Nagy, 2015) mind D1/D2, mind ITS bázissorrendjei alapján körülbelül 4%-kal eltér a bázissorrendek páronkénti összehasonlítása alapján legközelebbi leírt faj, a *Y. oslonensis* típustörzsének megfelelő szekvenciáitól, azaz nagy valószínűséggel a *Yarrowia* nemzetség egy eddig ismeretlen fájának a képviselője (22. ábra). Az új faj további törzseit egyelőre nem sikerült izolálnunk, ezért egyelőre leírása sem történt meg.

A *Y. bubula* és a *Y. porcina* leírása (Nagy és mtsai, 2014) óta két további *Yarrowia* faj, a *Y. parophoni* (mint *Y. parophonii*; Crous és mtsai, 2017) és a *Y. brassicae* (Liu és mtsai, 2018) került leírásra. A *Y. parophoni* hét törzsét egy bogár [*Parophonus hirsutulus* (Carabidae)] bélcsatornájából izolálták Bulgáriában, míg a *Y. brassicae* két ismert törzse kínai savanyú káposztából származik. A *Y. parophoni* leírásával kapcsolatban érdemes megjegyezni a következőt. A hét vizsgált törzs (egymással azonos) D1/D2 domén DNS bázissorrendje jelentősen, 16 szubsztitúcióval különbözik a D1/D2 szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján legközelebbi leírt faj, a *Y. oslonensis* megfelelő DNS szakaszának bázissorrendjétől, tehát a fent említett útmutatók (Kurtzman és Robnett, 1998; Vu és mtsai, 2016) alapján feltételezhető, hogy a szerzők által vizsgált törzsek valószínűleg a *Y. oslonensis*-től különböző fajt képviselnek. Crous és mtsai (2017) közleményéből azonban az is kiderül, hogy a *Y. parophoni* és a *Y. oslonensis* típustörzseinek ITS szekvenciái mindössze 2 nukleotidban (1 szubsztitúció és 1 indel) térnek el egymástól. Ezzel szemben a *Y. parophoni* törzsek ITS szekvenciái között 3 szubsztitúciót is megfigyeltek a szerzők. Tehát, a Schoch és mtsai (2012) által a gombák esetén univerzális DNS-vonalkódnak (DNA barcode) javasolt régióban a *Y. parophoni* és a *Y. oslonensis* típustörzseinek DNS bázissorrendjei között kisebb az eltérés, mint a *Y. parophoni* paratípus törzsei között, ami legalábbis kételyt ébreszt azzal kapcsolatban, hogy a *Y. parophoni* és a *Y. oslonensis* különböző fajok. A fent említett példák esetén, ahol a D1/D2 és az ITS szekvenciák eltérő faji besorolást sugalltak, mind a *Y.*

(*Candida alimentaria* (Knutsen és mtsai, 2007), mind a *Y. porcina* (Nagy és mtsai, 2014) esetén az ITS régió bázissorrendjének összehasonlítása nyújtott pontosabb előrejelzést a faji hovatartozást illetően.

Crous és mtsai (2017) a *Yarrowia*-kládba tartozó *Candida* fajokat, a bazális elhelyezkedésű *C. hispaniensis* kivételével, a Melbourne Code adta lehetőséget kihasználva átsorolták a *Yarrowia* nemzetségbe. A *Yarrowia*-klád korai elágazását képező *C. hispaniensis* szén-forrás asszimilációs spektruma közel áll a *Yarrowia*-klád többi tagjának asszimilációs spektrumához, és a *Yarrowia* nemzetség fajaihoz hasonlóan a *C. hispaniensis* is képes jelentős mennyiségű lipidet felhalmozni sejtjeiben (Michely és mtsai, 2013). Számos filogenetikai törzsfán, így a Crous és mtsai (2017) által közölt és az általunk az ITS és D1/D2 szekvenciák elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán (22. ábra) is 100%-os valószínűséggel a *Yarrowia* nemzetséghez kapcsolódik (bazálisan) a *C. hispaniensis*.

A *Yarrowia* nemzetség fajai és a hozzá filogenetikailag szorosan kötődő *C. hispaniensis* meglehetősen változatos élőhelyekről kerültek izolálásra. A leggyakoribb izolálási forrásaikat a 4. táblázat tartalmazza, elsősorban az aktuális élesztőgomba monográfia és az új fajok leírásait tartalmazó publikációk alapján. A *Yarrowia* fajok izolálási forrásai közé tartoznak az ember és a melegvérű állati eredetű termékek, húsok húskészítmények, tej, tejtermékek; a talaj és a szénhidrogének; egyes növényi eredetű élelmiszerek; rovarok és vízi élőhelyek szubsztrátumai. A *Yarrowia* fajok élelmiszerekben való előfordulásáról szolgáltatott értékes adatokat Nagy (2015). Több mint 130, húsokról, elsősorban sertés- és marhahúsról izolált *Yarrowia* törzset azonosított DNS bázissorrend alapján. Eredményeiből kitűnik, hogy a vizsgált húsokról, egyedüli szénforrásként hexadekánt tartalmazó tápközegben történt dúsítást követően izolált *Yarrowia* törzsek közül leggyakoribb a *Y. deformans* volt, ezt követte, az izolálás gyakoriságának csökkenő sorrendjében a *Y. lipolytica*, a *Y. galli*, a *Y. bubula*, a *Y. alimentaria*, a *Y. porcina* és a *Y. divulgata*. A húsokról izolált *Yarrowia* törzsek változatosságával ellentétben, a nyers tejből és tejtermékekről ugyancsak dúsítást követően izolált több mint 90 törzs közül három *Y. bubula* és egy *Y. alimentaria* kivételével, valamennyi törzs *Y. lipolytica*-nak bizonyult (Nagy, 2015; Péter és mtsai, 2019a). Ezzel kapcsolatban két dolgot érdemes megjegyezni. Először, a *Y. deformans*, a *Y. lipolytica*, a *Y. porcina*, a *Y. divulgata* és a *Y. keelungensis* egy, a rutinszerűen vizsgált hagyományos fenotípusos bélyegek alapján elkülöníthetetlen fajkomplexet alkot. Ebből következik, hogy a fenotípus alapú rendszertani azonosítási módszereket alkalmazó tanulmányokban (ide tartozik az ezredforduló előtt publikált munkák zöme) a *Y. lipolytica*-ként azonosított törzsek egy

része valószínűleg nem *Y. lipolytica*, hanem egy attól fenotípusos tulajdonságok alapján elválaszthatatlan rokon faj volt.

4. Táblázat. A *Yarrowia* fajok és a *Candida hispaniensis* izolálási forrásai

Faj	Izolálási forrás ¹
<i>Yarrowia lipolytica</i>	kukoricadara, köröm, szaruhártya lézió, üzemanyag tartály, hűtve tárolt virsli, köpet, fagyasztott húskészítmények, fagyasztott kanadai bacon, talaj, avas margarin, olívbogyó, tüdő, bőr, szénhidrogének, tejtermékek, szennyvíz, kerozin, majonéz alapú saláta, almalé
<i>Yarrowia alimentaria</i>	joghurt, pácolt sonka
<i>Yarrowia brassicae</i>	savanyú káposzta
<i>Yarrowia bubula</i>	marhahús, disznóhús, pulykahús
<i>Yarrowia deformans</i>	ember, köröm, tartósított hal, hús
<i>Yarrowia divulgata</i>	szalonna feldolgozó üzem berendezésének a felszíne, csirkemáj, csirkehús, marhahús, mélytenger víz, tengeri hal
<i>Yarrowia galli</i>	csirkemáj, csirkehús, gombás köröm, sertéshús, marhahús
<i>Yarrowia hollandica</i>	szarvasmarha háta
<i>Yarrowia keelungensis</i>	tengervíz felszíni mikroréteg
<i>Yarrowia oslonensis</i>	joghurt
<i>Yarrowia phangngensis</i>	brakkvíz mangrove erdőből
<i>Yarrowia parophoni</i>	<i>Parophonus hirsutulus</i> (Carabidae)
<i>Yarrowia porcina</i>	sertéshús, marhahús, trópusi folyó üledéke
<i>Yarrowia yakushimensis</i>	japán termesztés bélcsatornája
<i>Candida hispaniensis</i>	<i>Spondylus buprestoides</i> lárv (Cerambycidae)

¹Az adatok forrása: Péter és mtsai (2004), Knutzen és mtsai (2007), Limtong és mtsai (2008), Kurtzman és mtsai (2011a), Chang és mtsai (2013), Groenewald és Smith (2013), Nagy és mtsai (2013), Galán-Sánchez és mtsai (2014), Nagy és mtsai (2014), Abdel-Sater és mtsai (2016), Crous és mtsai (2017), Liu és mtsai (2018)

Másodszor, a melegvérű állatokból készült termékekből, pl. nyers húsokból, származó *Yarrowia* törzsek diverzitásának adatait áttekintve szembetűnő, hogy rendszeresen izolálásra kerülnek olyan fajoknak a képviselői, amelyek nem képesek 37 °C hőmérsékleten szaporodni.

Míg a *Y. lipolytica* 37 °C-on való szaporodási képessége változó, a *Y. deformans*, a *Y. galli*, a *Y. bubula*, a *Y. porcina*, a *Y. alimentaria* és a *Y. divulgata* nem képes szaporodni ezen a hőfokon. A *Y. deformans*, a *Y. galli*, a *Y. bubula*, a *Y. alimentaria* és a *Y. divulgata* 35 °C hőmérsékleten sem szaporodik, míg a *Y. bubula*, és a *Y. alimentaria* már 30 °C hőmérsékleten sem szaporodik. A nyers húsok mikrobiális szennyeződésének legfontosabb forrásai a talaj és állati bélsár, amelyek az állatok leölése és feldolgozása során kerülnek a húsrá, pl. az állatok bőréről. A szennyeződés további forrásai a feldolgozó eszközök és berendezések, a dolgozók keze és a levegő (Kabisch és mtsai, 2016). A fent felsorolt, 35 °C-on vagy annál nagyobb hőmérsékleten szaporodni képtelen élesztőgomba fajoknak a melegvérű állatokból készült termékekről izolált törzseinek az eredete még feltárára vár.

A *Y. lipolytica* (vagy az annak vélt rokon fajok) leggyakrabban nagy zsír és/vagy fehérje tartalmú élelmiszerekben fordul elő, és jelentős szerepet tölthet be azok minőségének alakításában. Elsősorban fermentált tejtermékekben és húskészítményekben juthat kiemelkedő szerephez. Egyes sajtok és húskészítmények érlelése során a terméknek kiemelkedő érzékszervi tulajdonságokat kölcsönözhet aromaanyag termelése révén, kedvező hatást gyakorolhat a sajtok állagára, rövidítheti az érlelési és meghosszabbíthatja az eltarthatósági időt, lisztéria-ellenes aktivitást fejthet ki, gátolhatja a *Bacillus cereus* szaporodását és a zöld penészek növekedését, késleltetheti a húsok avasodását és hozzájárulhat az erjesztett kolbászok és szalámik piros színének megőrzéséhez. Nemkívánatos hatásai közé tartozik a mellékíz előidézése, esetenként kedvezőtlenül is befolyásolhatja a sajtok állagát és a sajt felszínének barna elszíneződését okozhatja, gátolhatja a *Penicillium roqueforti* növekedését és indirekt módon elősegítheti a biogén aminok képződését (Groenewald és munkatársai, 2013 és az általuk hivatkozott publikációk). Groenewald és munkatársai (2013) széleskörű irodalmi áttekintésükből levont következtetésként hangsúlyozzák egyrészt az egyes törzsekre jellemző specifikus tulajdonságok jelentőségét, másrészt, hogy néhány esetben nagyon szűk a határ a *Y. lipolytica* (vagy valamelyik közeli rokon faj) által kifejtett pozitív vagy negatív hatás között. A *Y. lipolytica* élelmiszerek minőségére gyakorolt, akár pozitív, akár negatív hatásában kulcsfontosságú erős lipolitikus és proteolitikus aktivitása, valamint az egyes sajtok esztétikai hibáját okozó barna pigment termelő képessége (tirozin tartalmú szubsztrátumon). Annak előrejelzésére, hogy a jelenleg a *Yarrowia* nemzetségbe sorolt, általunk leírt négy új élesztőgomba faj (*C. galli*, *Y. divulgata*, *Y. porcina*, *Y. bubula*) milyen hatással lehet az élelmiszerek minőségére, megvizsgáltuk, hogy az egyes új fajok rendelkeznek-e lipolitikus, és proteolitikus aktivitással, valamint képesek-e barna pigmentet termelni tirozin tartalmú

tápközegben. Az eredmények szerint (Péter és mtsai, 2004; Nagy és mtsai, 2013, 2014; Nagy, 2015) mind a négy általunk leírt új, jelenleg a *Yarrowia* nemzetségbe sorolt faj erős zsír- és fehérjebontó aktivitással, valamint barna pigment termelő képességgel rendelkezik. Az új fajok barna pigment termelését a 25. ábra szemlélteti. Ezen eredmények alapján várható, hogy az általunk leírt új fajok (*C. galli*, *Y. divulgata*, *Y. porcina*, *Y. bubula*) a *Y. lipolytica*-hoz hasonló - pozitív vagy negatív - hatást gyakorolnak az élelmiszerek minőségére.



25. ábra. A *Yarrowia lipolytica* és a négy általunk leírt *Yarrowia* faj egy-egy törzsének pigment termelése tirozin tartalmú táptalajon (Carreira és Loureiro, 1998), 25°, 48 óra. Balról jobbra: *Y. lipolytica*, NCAIM Y.00591^T; *Y. galli*, NCAIM Y.01482^T; *Y. divulgata*, NCAIM Y.01485; *Y. bubula*, NCAIM Y.01998^T; *Y. porcina*, NCAIM Y.02100^T.

Új metanol-asszimiláló élesztőgomba fajok

Egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó tápközegben való kétlépcsős dúsítást követően nagy hatékonysággal izoláltunk metilotróf élesztőgombákat különböző természetes szubsztrátumokból és élelmiszerekből. A korábban tárgyalt, olívaolajból izolált új metilotróf élesztőgombákon kívül, számos további leíratlan metanol-asszimiláló élesztőgomba fajt képviselő törzset izoláltunk az utóbbi két évtizedben. Az eddig ismert 92 metanol-asszimilációra képes élesztőgomba faj közül 20-at mi írtunk le, vagy közreműködtünk a leírásukban. Bár a metanol-asszimiláló fajok törzseit zömében nem élelmiszerekről izoláltuk, potenciálisan ezek is jelentős hatással lehetnek az élelmiszerekre, mivel a módosított anyagcseréjű metanol-asszimiláló élesztőgombák egyéb ipari alkalmazásuk mellett élelmiszer-összetevők termelésére is alkalmasak (Geier és mtsai, 2015; Duan és mtsai, 2018).

Az alábbiakban először bemutatom az általunk leggyakrabban vizsgált három növényi szubsztrátumról, fa-exudátum, korhadt faanyag és levél, izolált élesztőgomba törzsek fajok szerinti megoszlását. Ezt követően pedig az általunk leírt, és az olívaolaj kapcsán nem említett új metanol-asszimiláló élesztőgomba fajokat ismertetem röviden. Ahogy már említésre került,

az izolálás hatékonyságának növelése céljából általában egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó táplevesben történő kétlépcsős dúsítást követően izoláltuk a metanol-asszimiláló élesztőgombákat. Bár így sem a metilotróf élesztőgombáknak az egyes szubsztrátumokat benépesítő élesztőgomba közösségeken belüli részaránya, sem az egyes szubsztrátumokon megtalálható metilotróf élesztőgombák mennyisége nem került meghatározásra, a dúsítási módszer hatékonyságának köszönhetően sikerült nagyszámú metanol-asszimiláló törzset, köztük eddig ismeretlen fajok képviselőit, izolálni olyan szubsztrátumokról is, ahol előfordulásukra korábban nem volt adat. Az új fajokat rendszertani besorolásuk szerint (*Komagataella* és *Kuraishia* nemzetség, *Ogataea*-klád) csoportosítva tárgyalom.

Fanedvekből (exudátumokból) izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák

Különböző fák exudátumaiból, tamponnal történt mintavételt és metanol tartalmú táplevesben történt dúsítást követően, a 197 vizsgált minta közül 137-ből, azaz a minták mintegy 70%-ából sikerült a metanolt egyedüli szénforrásként hasznosítani képes élesztőgombát izoláltunk. A minták 15 nemzetség fafajainak exudátumaiból származtak. A leggyakrabban megmintázott fajok a tölgyek (*Quercus* spp., 69 minta), a nyárfák (*Populus* spp., 56 minta), a gyertyán (*Carpinus betulus*, 18 minta) és a bükk (*Fagus sylvatica*, 17 minta) voltak. Összesen 149 metanol-asszimiláló élesztőgomba törzset izoláltunk fa-exudátumokból, amelyek fajonkénti megoszlását az 5. táblázat szemlélteti. Szembetűnő a *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* gyakori előfordulása. Az összes fa-exudátumból izolált metanol-asszimiláló élesztőgomba törzs 65%-a *K. pastoris*-nak bizonyult. A második leggyakrabban izolált faj a törzsek kb. 13%-át képviselő, az *Ogataea populiabae* volt. Gyakori előfordulásában azonban szerepet játszott a számára élőhelyet biztosító fehér nyár (*Populus alba*) exudátum minták nagy száma (31) ami az összes minta kb. 16 százaléka. Az *O. populiabae*-t kizárólag fehér nyár exudátumból izoláltuk. Néhány további gazdanövény specifikus mintázatot is megfigyeltünk az élesztőgombák előfordulásában, amelyeket az egyes általunk leírt élesztőgomba fajok tárgyalásakor röviden bemutatok.

5. Táblázat. A fanedvekből (exudátumokból) izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák fajonkénti megoszlása (összesen 149 törzs)

Faj	Az izolált törzsek száma
<i>Komagataella pastoris</i>	97
<i>Ogataea populiabae</i>	19
<i>Candida boidinii</i>	14
<i>Komagataella pseudopastoris</i> (<i>Pichia pseudopastoris</i>)¹	4
<i>Ogataea trehaloabstinens</i> (<i>Pichia trehaloabstinens</i>)¹	3
<i>Candida succiphila</i>	2
<i>Kuraishia floccosa</i> (<i>Candida floccosa</i>)¹	2
<i>Ogataea pignaliae</i>	2
<i>Candia nitratoiphila</i>	1
<i>Kuraishia cidri</i>	1
<i>Kuraishia molischiana</i>	1
<i>Ogataea pini</i>	1
<i>Candida</i> cf. <i>boidinii</i>	1
<i>Ogataea</i> cf. <i>trehalphila</i>	1

¹: A zárójelben megadott néven került leírásra

A közreműködésünkkel leírt új fajokat, illetve a még leírásra váró új fajokat félkövér karakter jelöli.

Korhadrt faanyagokról izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák

A különböző korhadrt faanyagokról izolált élesztőgomba törzsek fajonkénti megoszlását a 6. táblázatban tüntettem fel. Az általunk vizsgált 242 korhadrt faanyag minta közül 134-ből (55%) sikerült, összesen 150, metanol-asszimilációra képes élesztőgomba törzset izolálnunk. A leggyakrabban megmintázott fajok a tölgyek (*Quercus* spp., 52 minta), a bükk (*Fagus sylvatica*, 44 minta) és a gyertyán (*Carpinus betulus*, 14 minta) voltak, de jelentős számú (36) azonosítatlan mintát is feldolgoztunk. A fanedvekhez hasonlóan a korhadrt faanyagok esetében is kiugróan nagy volt a *K. pastoris* előfordulási aránya. A 150 törzs 54%-a (81 törzs) volt *K. pastoris*, ezt követte a *Candida boidinii* 12%-kal (18 törzs). Míg a korhadrt faanyagokról izolált metilotróf élesztőgomba törzsek száma gyakorlatilag megegyezett a fa-exudátumokból izolált törzsek számával, a faji diverzitásuk nagyobb volt,

21 fajt képviseltek, szemben a 14 fa-exudátumból izolált fajjal. A korhadts faanyagokból izolált, korábban ismeretlen élesztőgomba fajok száma is jelentősen meghaladta a fa-exudátumokból izolált új fajok számát. Mindkét szubsztrátum csoport esetében a táblázatok (5. és 6. táblázat) alján elkülönítetten tüntettem fel a feltehetően új, leírásra váró, fajokat (*Candida* cf. *boidinii*, *Ogataea* cf. *trehalophila*).

6. táblázat. A korhadts faanyagokból izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák fajonkénti megoszlása (összesen 150 törzs)

Faj	Az izolált törzsek száma
<i>Komagataella pastoris</i>	81
<i>Candida boidinii</i>	18
<i>Komagataella pseudopastoris</i> (<i>Pichia pseudopastoris</i>)¹	9
<i>Candida succiphila</i>	4
<i>Ogataea nitratoaversa</i>	4
<i>Ogataea trehalophila</i>	4
<i>Ogataea trehaloabstinens</i> (<i>Pichia trehaloabstinens</i>)¹	4
<i>Kuraishia capsulata</i>	3
<i>Kuraishia molischiana</i>	3
<i>Ogataea saltuana</i>	3
<i>Kuraishia cidri</i>	2
<i>Kuraishia hungarica</i> (<i>Candida hungarica</i>)¹	2
<i>Kuraishia ogatae</i> (<i>Candida ogatae</i>)¹	2
<i>Ogataea dorogensis</i> (<i>Pichia dorogensis</i>)¹	2
<i>Ogataea zsoltii</i> (<i>Pichia zsoltii</i>)¹	2
<i>Candia nitratoiphila</i>	1
<i>Ogataea deakii</i>	1
<i>Ogataea pilisensis</i> (<i>Pichia pilisensis</i>)¹	1
<i>Ogataea parapolyomorpha</i>	1
<i>Ogataea polymorpha</i>	1
<i>Ogataea</i> cf. <i>trehalophila</i>	2

¹: A zárójelben megadott néven került leírásra

A közreműködésünkkel leírt új fajokat, illetve a még leírásra váró új fajokat félkövér karakter jelöli.

Levelekről izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák

Az általunk vizsgált levelek esetében dúsításhoz felhasznált minta nagysága általában 10 gramm volt. Faleveleken és néhány lágyszárú növény levelén egyaránt kimutattuk metilotróf élesztőgombák jelenlétét egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó táplevesben történt kétlépcsős dúsítást követően. A 121 minta 55%-áról (67 minta) sikerült metanol-asszimiláló élesztőgombát izolálnunk. Tudomásom szerint erről szóló közleményünk (Péter és mtsai, 2007a) előtt senki nem számolt be Ascomycota törzsbe sorolt metanol-asszimiláló élesztőgombák filloszférában történő előfordulásáról. A leggyakrabban megmintázott fajok a tölgyek (*Quercus* spp., 18 minta), a gyertyán (*Carpinus betulus*, 18 minta) és a bükk (*Fagus sylvatica*, 10 minta) voltak. Összesen 77 metanol-asszimiláló élesztőgomba törzset izoláltunk, amelyek fajonkénti megoszlását a 7. táblázat szemlélteti.

7. táblázat. A levelekről izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák fajonkénti megoszlása (összesen 77 törzs)

Faj	Az izolált törzsek száma
<i>Komagataella pastoris</i>	44
<i>Kuraishia molischiana</i>	9
<i>Ogataea allantospora</i>	5
<i>Ogataea dorogensis</i> (<i>Pichia dorogensis</i>)¹	5
<i>Ogataea pignaliae</i>	4
<i>Candida succiphila</i>	2
<i>Ogataea saltuana</i>	2
<i>Ogataea trehaloabstinens</i> (<i>Pichia trehaloabstinens</i>)¹	2
<i>Ogataea nitratoaversa</i>	1
<i>Ogataea polymorpha</i>	1
<i>Ogataea trehalophila</i>	1
<i>Ogataea zsoltii</i> (<i>Pichia zsoltii</i>)¹	1

¹: A zárójelben megadott néven került leírásra

A közreműködésünkkel leírt új fajokat, illetve a még leírásra váró új fajokat félkövér karakter jelöli.

Hasonlóan a fa-exudátumokhoz és a korhadt faanyagokhoz, a levelekről izolált metilotróf élesztőgombák között is a *Komagataella pastoris* fordult elő a leggyakrabban. Az izolátumok 57%-a tartozott ehhez a fajhoz, a második leggyakoribb faj a *Kuraishia molischiana* volt

mindössze kb. 12%-os részaránnal. Az *Ogataea allantospora*-t kizárólag falevélről izoláltuk, annak ellenére, hogy összességében több mint 400 fa-exudátum és korhadt fa mintát is vizsgáltunk.

Az *O. allantospora*-t leíró közleményünk (Péter és mtsai, 2007a) megjelenését követően több fillozférából származó új metanol-asszimiláló élesztőgombát is leírtak Thaiföldről (Koowadjanakul és mtsai, 2011; Limtong és mtsai 2013) és Brazíliából (Santos és mtsai, 2015).

A fanedvekből, korhadt faanyagokról és a fillozférából izolált metanol-asszimiláló élesztőgombák között egyaránt 50%-ot meghaladó részarányt képviselt a *K. pastoris*. A fa-exudátumokban való előfordulása jól dokumentált. Phaff és mtsai (1978) szerint a széleslevelű fák exudátumaiban előforduló egyik leggyakoribb faj, amely közönséges Észak-Amerika nyugati részén és Európában, viszont nem található meg Japánban. Feltételezésük szerint bizonyos rovarokhoz kötődik az előfordulása, amelyek fanedvekbe juttatják őket, és ezeknek a rovaroknak a földrajzi elterjedése korlátozott.

Az alábbiakban röviden bemutatom az általunk vagy a közreműködésünkkel leírt és korábban még nem tárgyalt új metanol-asszimiláló élesztőgomba fajokat.

Komagataella pseudopastoris

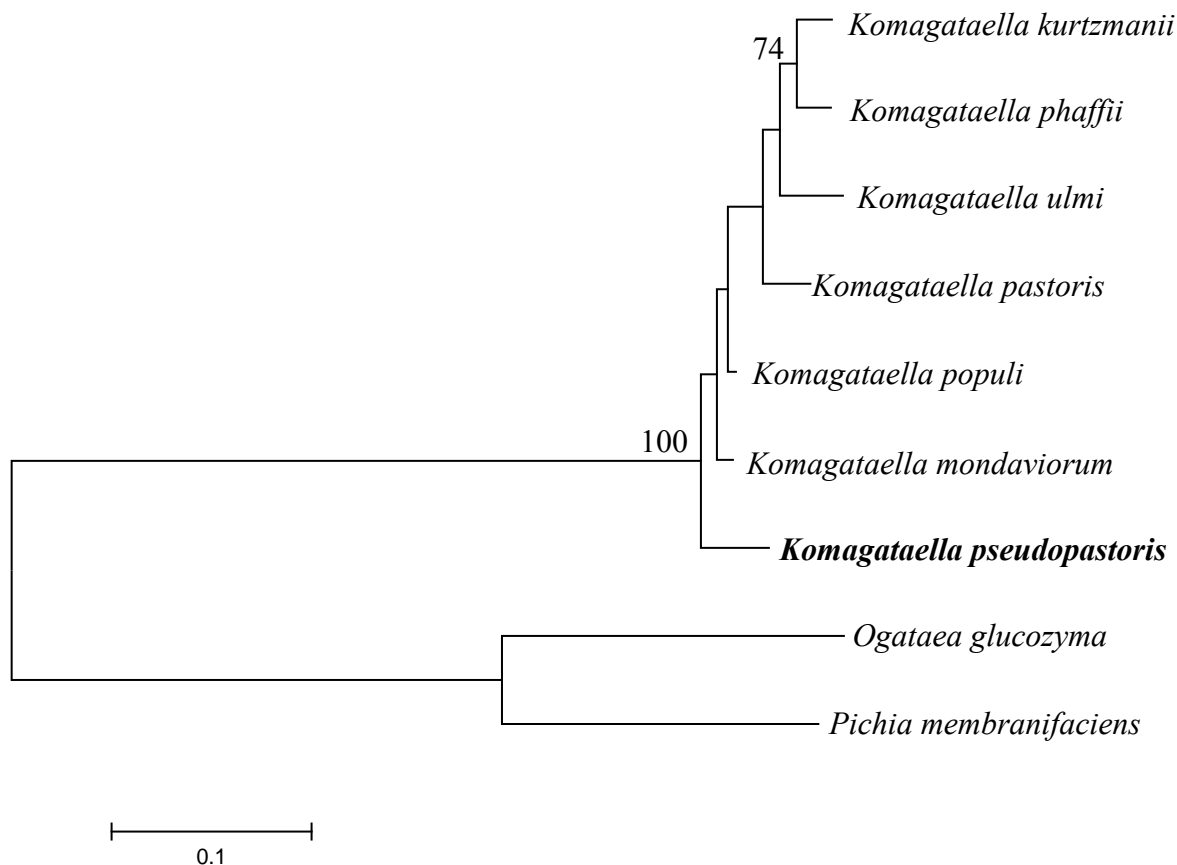
A Yamada és mtsai (1995) által a 18S és a 26S riboszómális RNS részleges nukleotid bázissorrendjeinek elemzése alapján a *P. pastoris* számára vezették be a *Komagataella* nemzetséget. Nyolc évvel később az akkor még monotípusos nemzetség egyetlen fájával, a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának nukleotid bázissorrendje alapján, közeli rokonságban álló leíratlan élesztőgomba faj néhány törzsét izoláltuk korhadt fehér fűz (*Salix alba*) mintákról. A négy törzs *K. pastoris*-tól való genetikai eltérését a rRNS kis alegységét kódoló gén restrikciós enzim analízise (Dlauchy és mtsai, 1999) is megerősítette. Mivel az új faj leírása idején a *Komagataella* nemzetség még nem volt általánosan elfogadott (Kurtzman, 2000), a fajt a *Pichia pseudopastoris* néven írtuk le (Dlauchy és mtsai, 2003), a publikáció címében zárójelben megadtuk a *Komagataella* nevet is, előrevetítve a faj esetleges későbbi átsorolását a *Komagataella* nemzetségbe, amit Kurtzman (2005b) meg is tett. A fajnév a *K. pastoris*-hoz való nagyfokú fenotípusos hasonlóságra utal. Bár az élesztőgomba taxonómiában alkalmazott standard fenotípusos tesztek alapján a *K. pseudopastoris* nem különíthető el a *K. pastoris*-tól, megfigyeltük, hogy a *K. pseudopastoris* szaporodását a

csersav kisebb koncentrációja gátolja, mint a *K. pastoris*-ét. A vizsgálataink során alkalmazott 0,03%-os (m/v) csersav koncentráció mind a négy *K. pseudopastoris* paratípus törzs szaporodását gátolta, míg a vizsgálatba vont 32 *K. pastoris* törzs mindegyike képes volt szaporodni a 0,03% csersavat tartalmazó tápközegben (Dlauchy és mtsai, 2003). A csersav szaporodást gátló hatásával szembeni eltérő érzékenység valószínűleg összefüggésben van a *K. pastoris* és a *K. pseudopastoris* természetes előfordulásával. Míg eredményeink alapján a *K. pastoris* rendszeresen előfordul (egyéb szubsztrátumokon kívül) a nagy tannin tartalmú (Hathway, 1958; Salminen és mtsai, 2004) tölgyfa (*Quercus* spp.) exudátumában, korhadt tölgyfán és tölgyfa levélen, a *K. pseudopastoris*-t, a több mint 130 általunk vizsgált tölgyfa eredetű minta egyikéből sem sikerült izolálni. Viszont leírását követően számos további törzsét izoláltuk egyéb fák exudátumából és korhadt faanyagából, amelyek szaporodását szintén gátolta a 0,03%-os koncentrációjú csersav. Érdekes adalék, hogy bár a *K. pastoris* számos fa exudátumában, korhadékában és levelén előfordul, fehér nyár (*Populus alba*) exudátumból (31 minta) egyszer sem tudtuk izolálni. A fehér nyár exudátumokban az *O. populialbae* mellett az egyéb mintákból leggyakrabban izolált *K. pastoris* helyett a *K. pseudopastoris* fordult elő, egyelőre ismeretlen okból.

A *K. pseudopastoris*-nak a filogenetikai törzsfán való elhelyezkedését a nemzetség tagjai között, az ITS és a D1/D2 régiók bázissorrend analízise alapján a 26. ábra szemlélteti. A nemzetségnek az analizált filogenetikai markerek és az adott taxon merítés mellett 100%-os a statisztikai megbízhatósága, viszont a törzsfá nemzetségen belüli topológiája nem rendelkezik számottevő statisztikai megbízhatósággal. A *Komagataella* nemzetség jelenleg hét, egymástól fenotípusos bélyegek alapján jórészt elkülöníthetetlen fajból áll. A *K. pastoris* és a *K. pseudopastoris* elválasztására alkalmas csersavtűrésben általunk észlelt különbségen kívül, a *K. kurtzmanii*-t leszámítva a nemzetség fajait fenotípusos tulajdonságok alapján nem lehet megbízhatóan elkülöníteni egymástól (Naumov és mtsai, 2018).

A *Komagataella* nemzetség kiemelkedő biotechnológiai jelentőségű, a heterológ fehérje expresszióra alkalmas „*Pichia pastoris* Expressziós Rendszer” kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető. Mivel azonban, ahogy fent említésre került, a *Komagataella* nemzetség zömében kriptikus fajokat foglal magában, és a „*Pichia pastoris* Expressziós Rendszer” kifejlesztésekor a múlt század végén még nem volt lehetőség az ahhoz felhasznált élesztőgomba törzs megbízható rendszertani azonosítására, tisztázásra várt, hogy valójában melyik fajt hasznosították a „*Pichia pastoris* Expressziós Rendszer” kifejlesztésekor. Kurtzman (2009) több gén bázissorrendjének az elemzése alapján kimutatta, hogy a „*Pichia*

pastoris Expressziós Rendszer”-ben felhasznált *K. (Pichia) pastoris*-nak hitt törzs valójában *K. phaffii*. Gasser és Mattanovich (2018) szerint a legtöbb, de nem az összes, ipari alkalmazást nyert, „*Pichia pastoris*”-ként megjelölt törzs *K. phaffii*.



26. ábra. A *Komagataella pseudopastoris* elhelyezkedése az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázis sorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Kimura-2 paraméter modellre (Kimura, 1980) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciókat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 563 pozíciót tartalmazott. Az *Ogataea glucozyma* és a *Pichia membranifaciens* szolgáltak kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

Új fajok a *Kuraishia* nemzetségben

A *Kuraishia* nemzetség jelenleg ismert fajainak rokonsági viszonyait a 14. ábra szemlélteti. A nemzetség kilenc faja közül öt faj leírásában vettünk részt. A korábban tárgyalt *K. mediterranea*-n kívül a többi általunk leírt fajt röviden az alábbiakban mutatom be.

A Yamada és mtsai (1994) által a *P. capsulata* számára bevezetett *Kuraishia* nemzetség egyetlen fajáról, a *Ku. capsulata*-ról kiderült, hogy genetikailag heterogén. A fenotípusos bélyegek alapján anamorf alakjának tartott (Wickerham, 1970) *C. molischiana*-ról kimutatták, hogy enzimeinek elektroforetikus mintázata (Lee és Komagata, 1983), a rRNS-t kódoló gén nagy alegysége D1/D2 régiójának (Kurtzman és Robnett, 1998) és kis alegységének (Suzuki és Nakase, 1999) DNS bázissorrendje is jelentősen eltér a *Ku. capsulata*-étól. A *Ku. capsulata* és a *C. molischiana* számos, összesen 32, törzsét vizsgálva megfigyeltük, hogy a két faj rRNS kis alegységét kódoló génjének és a szomszédos ITS-1 régióknak restrikciós enzimekkel történő emésztése eltérő méretű DNS fragmenteket eredményezett. A kétféle restrikciós fragment mintázat korrelált a D1/D2 régiók nukleotid bázissorrendjében detektált különbséggel. Ugyanakkor, több *C. molischiana* törzs tenyésztéseiben askospóra képzést figyeltünk meg. A felsorolt különbségek és a *C. molischiana* askospóra képzése alapján a korábban a *Ku. capsulata* ivartalan alakjának vélt *C. molischiana*-t önálló fajként írtuk le *Ku. molischiana* néven (Péter és mtsai, 2005a). Bár a *Ku. capsulata* és a *Ku. molischiana* vonalkód DNS szakaszainak bázissorrendje jelentősen eltér egymástól (D1/D2 régió csaknem 3%, rRNS kis alegységét kódoló gén csaknem 2% eltérés), fenotípus alapú elkülönítésük bizonytalan. A *Ku. molischiana* törzsek zöme jól szaporodik, míg a *Ku. capsulata* törzsek zöme nem szaporodik 37 °C hőmérsékleten, de mindkét esetben ismertek kivételek is.

A *Ku. hungarica* és a *Ku. ogatae* fajokat, mivel egyikük esetében sem sikerült askospóra képzést megfigyelnünk, a leírásukkor érvényes nomenklaturai szabályoknak megfelelően a *Candida* nemzetségbe soroltuk be (Péter és mtsai, 2003; Péter és mtsai, 2009a). A *C. hungarica* leírásakor vizsgált két törzset eltérő földrajzi eredetű tölgy (*Quercus* sp.) korhadt faanyagáról izoláltuk kétlépcsős, metanol tartalmú táplevesben történt dúsítást követően. A három *C. ogatae* törzset, ugyancsak dúsítást követően izoláltuk, kettőt szintén eltérő földrajzi eredetű tölgy (*Quercus* sp.) korhadt faanyagáról, míg a harmadikat a Duna Budapesten gyűjtött vizéből (minta nagyság 100 ml). A két faj D1/D2 régiójának bázissorrendje mindössze 4-5 szubsztitúcióban tér el egymástól, de az ITS régiók között már több mint 1%, a mitokondriális RNS kis alegységét kódoló gén (548 nukleotid hosszúságú) vizsgált szakaszán pedig 4%-ot meghaladó eltérést detektáltunk a *C. hungarica* és a *C. ogatae* törzsek között (Péter és mtsai, 2009a), ami kellőképpen alátámasztja, hogy két különböző fajról van szó. A két faj fenotípusos tulajdonságai is nagyon hasonlóak, de *C. hungarica*-tól eltérően a *C. ogatae* (lassan) erjeszti a trehalózt és szaporodik 37 °C hőmérsékleten. A *C.*

(*Kuraishia*) *hungarica* és a *C. (Kuraishia) ogatae* az ITS-D1/D2 törzsfán (14. ábra) 97%-os valószínűséggel alkot közös csoportot, aminek harmadik tagja a *Ku. piskuri* (Kurtzman és Robnett, 2014b). A *Ku. piskuri* leírásakor figyelembe vett három törzset fákön élő rovarok ürülékéből izolálták Floridában. Kurtzman és Robnett (2014b) 70 fajt magába foglaló multigén filogenetikai analízise megerősítette, hogy a *C. hungarica* és a *C. ogatae* a *Kuraishia*-klád közeli rokonságban álló, de eltérő fajai, és az új nevezéktani szabályokat (Melbourne Code) követve a két fajt átsorolták a *Kuraishia* nemzetségbe. A leírásuk óta sem további *Ku. hungarica*, sem további *Ku. ogatae* törzset nem izoláltunk.

Az ITS-D1/D2 törzsfán (14. ábra) és a Kurtzman és Robnett (2014b) multigén filogenetikai elemzése alapján készített törzsfán egyaránt a *Kuraishia* nemzetség korai elágazását képezi a *Ku. floccosa*, amelyet az előző két fajnál említett okokból *C. floccosa* néven írtunk le (Péter és mtsai, 2006), és ugyancsak Kurtzman és Robnett (2014b) sorolták át a *Kuraishia* nemzetségbe. A *Ku. floccosa* leírásakor két általunk kocsánytalan tölgy (*Quercus petrea*) exudátumából izolált törzsön kívül egy MA Lachance által rendelkezésünkre bocsátott, Kanadában vörös tölgy (*Quercus rubra*) exudátumából izolált törzset vizsgáltunk. A kanadai izolátum D1/D2 régiójának bázissorrendje megegyezik a Magyarországon izolált típustörzs azonos DNS régiójának bázissorrendjével, és jelentősen különbözik valamennyi ismert élesztőgomba D1/D2 régiójának nukleotid szekvenciájától. A *Ku. floccosa* neve a folyékony tápközegben mutatott pelyhes szaporodására utal. Ezen a morfológiai tulajdonságán kívül szénforrás-asszimilációs spektruma is jelentősen különbözik a nemzetség többi tagjától, és a jelenleg ismert *Kuraishia* fajok közül a *Ku. floccosa* az egyetlen, amelyik nem képes a nitrátot asszimilálni. Leírása óta, kiterjedt metilotróf élesztőgomba izolálási programunk ellenére, nem sikerült további *Ku. floccosa* törzseket izolálnunk. A *Ku. floccosa*-t és a hozzá hasonló tulajdonságú élesztőgombákat Chaucheyras-Durand és mtsai (2008) a biodízel előállításnak melléktermékeként keletkező glicerint metanol mentesítésére történő felhasználásra javasolták. Ezáltal a toxikus hatású metanoltól mentes glicerint biztonságosan felhasználhatóvá válna takarmányozási célra (Chaucheyras-Durand és mtsai, 2008).

Új fajok az *Ogataea*-kládban

Az *Ogataea*-klád fajai (az *Ogataea* nemzetség és az azzal rokon *Candida* fajok) alkotják a jelenleg ismert metanol-asszimiláló élesztőgombák legnagyobb csoportját (13. ábra). A bemutatott törzsfák elágazásainak jó része nem rendelkezik számottevő statisztikai

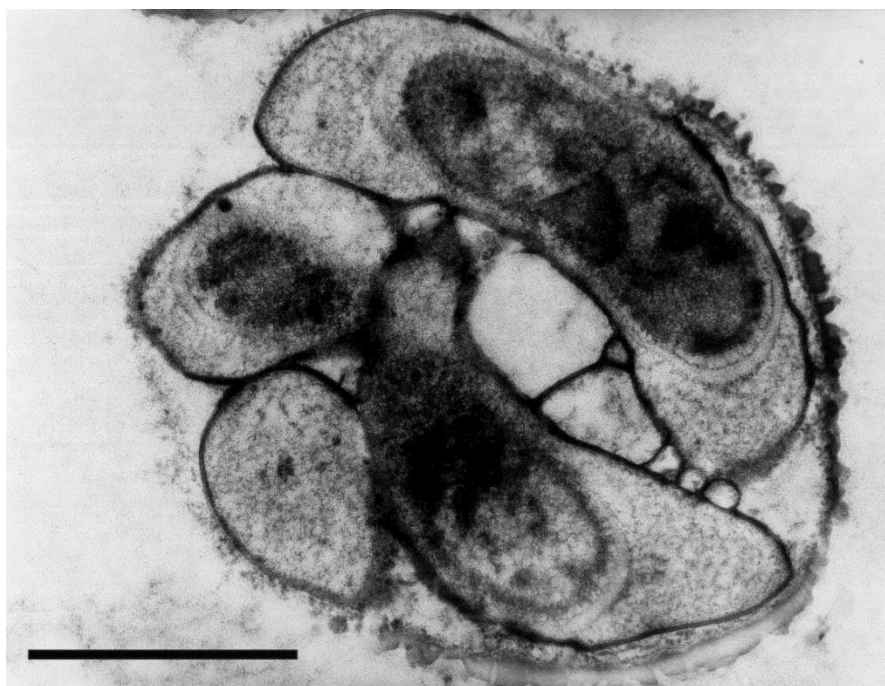
megbízhatósággal. Multigén-alapú vagy teljes genom szekvencia analízistől várhatjuk az *Ogataea*-klád fjai között fennálló rokonsági viszonyok statisztikailag megbízhatóbb feltárását. Az alábbiakban röviden bemutatom a korábban már tárgyalt fajokon (*O. histrianica*, *O. kolombanensis* és *O. deakii*) kívül azokat az *Ogataea*-kládba tartozó fajokat, amelyeket mi írtunk le, vagy amelyeknek a leírásában közreműködtünk.

Az *O. dorogensis*-t *Pichia dorogensis*-ként írtuk le két, korhadat vasúti talpfáról izolált törzs alapján (Péter és mtsai, 2003), majd Nagatsuka és mtsai (2008) átsorolták az *Ogataea* nemzetségbe. Az *O. dorogensis* elkülönítése néhány *Ogataea* fajtól (*O. pini*, *O. pilisensis*, *O. zsoldii*) fenotípusos tulajdonságai alapján nehézségbe ütközik tulajdonságaik nagymértékű hasonlósága miatt, de a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrendje alapján egyértelműen elkülöníthető valamennyi ismert élesztőgomba fajtól. Az általunk készített törzsfákon (13. ábra, Péter és mtsai, 2003) az *O. dorogensis* a nemzetség típusfajával (*O. minuta*) azonos csoportban (szubkládban) helyezkedik el, de számottevő statisztikai megbízhatóság nélkül. A Kurtzman és Robnett (2010) által nagy taxon merítésű, multigén filogenetikai elemzés alapján készített törzsfán viszont az *O. dorogensis*, néhány további fajjal együtt, 100%-os statisztikai megbízhatósággal alkot egy kis szubkládot az *O. minuta*-val. Érdeemes megjegyezni, hogy magának az *Ogataea*-kládnak sem a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzésén alapuló törzsfán (13. ábra), sem az előbb említett multigén törzsfán (Kurtzman és Robnett, 2010) nincs számottevő statisztikai megbízhatósága, ezért annak kisebb, jobban körülhatárolt nemzetségekre osztása várható a jövőben. A faj leírása óta néhány további *O. dorogensis* törzset izoláltunk növények leveléről és folyóvízből (Duna).

Az *O. allantospora*-t három törzs alapján írtuk le (Péter és mtsai, 2007a). Mindhárom törzset lombhullató fák, gyertyán (*Carpinus betulus*), tölgy (*Quercus* sp.) és kőris (*Fraxinus* sp.) leveléről izoláltuk, egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó tápközegben történt dúsítást követően. A különböző levélminták egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó táplevesben történő dúsítása során megfigyeltük, hogy a leveleket tartalmazó dúsító tápleves turbiditása számos esetben egyik napról a másikra hirtelen igen jelentősen lecsökkent. Fénymikroszkópos vizsgálataink felfedték, hogy a turbiditás hirtelen és váratlan csökkenésének az az oka, hogy a dúsító táplevesben, a levelekről származó, különböző protiszták bekebelezik az élesztőgombákat. Különösen a csillósok tűntek hatékonyak az élesztőgomba sejtek bekebelezésében. Az nem világos, hogy ez a folyamat a természetben, a levelek felszínén is lejátszódik-e. A protiszták aktivitását A. Botha (University of Stellenbosh,

Department of Microbiology) személyes közlésének megfelelően az első dúsító tápközeg 200 mg/L chloramphenicolal történt kiegészítésével szorítottuk vissza. A chloramphenicol alkalmazása jelentősen növelte a dúsításos módszer hatékonyságát. A sikeres (metilotróf élesztőgombát eredményező) dúsítások aránya egyharmadról 50% fölé emelkedett a chloramphenicol alkalmazásának köszönhetően (Péter és mtsai, 2007a). Közleményünk volt az első, amely Ascomycota törzsbe tartozó metilotróf élesztőgombák filloszférában való előfordulásáról számolt be. Az *O. allantospora* a D1/D2 nukleotid szekvenciák elemzésén alapuló filogenetikai törzsfákon az *O. dorogensis*-szel, és néhány további, az *O. allantospora*-t követően leírt fajjal alkot közös, bár statisztikailag nem megbízható csoportot (13. ábra, Péter és mtsai, 2007a). A Kurtzman és Robnett (2010) metanol-asszimiláló élesztőgombákat is vizsgáló multigén-alapú filogenetikai elemzése az *O. allantospora*-t nem foglalta magába. Az *O. allantospora* aszkuszonként 2-4 könnyen kiszabaduló spórát képez. Egyedülálló tulajdonsága a nemzetségben belül, hogy aszkospórái allantoid (enyhén hajlott, lekerekített végű) alakúak (27. ábra). A faj neve „*allantospora*” is erre utal. Az *O. allantospora* leírásakor ismert valamennyi *Ogataea* faj kalap (vagy félgömb) alakú aszkospórát képez, ezért leírásakor javasoltuk a nemzetség diagnózisának módosítását, hogy a DNS vonalkód szekvencia analízis alapján az *Ogataea*-kládba tartozó új fajt az *Ogataea* nemzetségbe sorolhassuk (Péter és mtsai, 2007a). Később Kurtzman és Robnett (2010) a *Williopsis salicorniae*-nak a multigén filogenetikai analízis alapján az *Ogataea* nemzetségbe történő átsorolásakor (Kurtzman és Robnett, 2010) tovább módosították a nemzetség diagnózisát, hogy gömb alakú, egyenlítői síkjukban lebenyt viselő (szaturnoid) aszkospórát képző fajokat is magába foglalhasson. Az *O. allantospora* leírását követően a faj további két törzsét izoláltuk, ugyancsak fák leveléről.

Az *O. trehaloabstinens*-t *P. trehaloabstinens*-ként írtuk le (Péter és mtsai, 2003), és Nagatsuka és mtsai (2008) sorolták át az *Ogataea* nemzetségbe. A filogenetikai törzsfákon statisztikailag megbízható csoportot alkot az *O. wickerhamii*-val (*P. finlandica*) és a *C. marisszal* (13. ábra; Péter és mtsai, 2003; Kurtzman és Robnett, 2010). A faj neve („*trehaloabstinens*”) azt jelzi, hogy az *Ogataea*-klád fajainak többségével ellentétben nem képes a trehalózt hasznosítani. Leírását három törzsre alapoztuk. Mindhárom törzset a Pilis hegységből származó fa-exudátumból [kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea*), tölgy (*Quercus* sp.), gyertyán (*Carpinus betulus*)] izoláltuk. Leírása óta további törzseket izoláltunk korhadt faanyagról és levélről.



27. ábra. Az *Ogataea allantospora* típustörzse (NCAIM Y.01822^T) aszkuszának keresztmetszete (kukoricaliszt agar, 25 °C, 21 nap). Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel. A méretvonal hossza 1 µm (Nagy Barbara felvétele; Péter és mtsai, 2007; a kiadó engedélyével).

Az *O. populialbae* leírásakor figyelembe vett 19 törzset fehér nyár (*Populus alba*) exudátumból izoláltuk (Péter és mtsai, 2009b). A 19 törzs azonos D1/D2 nukleotid szekvenciával jellemezhető, és a faj leírásakor a D1/D2 régió nukleotid bázissorrendjének páronkénti összehasonlítása alapján az *O. wickerhamii* volt a legközelebbi ismert élesztőgomba faj, de több mint 3% az eltérés a két faj megfelelő DNS bázissorrendjei között, és több fenotípusos tulajdonságban is különböznek. Jelenleg, az azóta egy mangó levélről (Thaiföld) izolált törzs alapján leírt *O. kanchanaburiensis* (Limtong és mtsai, 2013) az *O. populialbae*-hoz legközelebbi faj mind a páronkénti bázissorrend összehasonlítás, mind a D1/D2 törzsfán (13. ábra) elfoglalt pozíció alapján. Az új faj első hat törzsét az Alföldön (Fülöpháza, Izsák) gyűjtött fehér nyár exudátumokból izoláltuk. Mivel a több, mint 150, zömében a Pilis hegység térségéből származó más fafajokról gyűjtött exudátum mintából egyetlen esetben sem tenyésztett ki *O. populialbae*, felmerült a kérdés, hogy az új faj előfordulása a minták földrajzi eredetével van összefüggésben vagy a fehér nyárhoz kötődik. Ennek tisztázása céljából a Pilis keleti lábához közeli Szentendrei-szigeten mintáztunk meg számos fehér nyár exudátumot, körülbelül 100-110 km távolságra az alföldi mintavételi

helyektől, és 13 további *O. populialbae* törzset izoláltunk, ezáltal bebizonyosodott, hogy a faj a fehér nyárhoz kötődik, amit nevének megválasztásakor is figyelembe vettünk. Az *O. populialbae* gyakori előfordulása a fehér nyár exudátumokban és hiánya az azonos területen élő (szimpatrikus) egyéb fafajok exudátumaiban, azt sugallja, hogy a fehér nyár exudátum szelektív élőhelyet biztosít az azt benépesítő élesztőgombák számára. Costa ricai kutatásaik során, specifikus, a környező fafajokétól eltérő, élesztőgomba közösségei miatt szelektív hatás érvényesülését tételezték fel Lachance és mtsai (2001) a *Maclura tinctoria* nevű fafaj exudátumában is. Mint rámutattak a szelektív hatás érvényesülhet közvetlenül az élesztőgombák szaporodásának szintjén, de befolyásolhatja az exudátumokat látogató és az élesztőgombák vektoraiként szolgáló rovarokat is. Összességében 31, az alföldről és a Szentendrei-szigetről származó, fehér nyár exudátum mintát vizsgáltunk, és metanol tartalmú tápvelesben való dúsítást követően 24 mintából sikerült metilotróf élesztőgombát izolálnunk. A 19 *O. populialbae* törzsön kívül öt *C. boidinii* és két *K. pseudopastoris* törzset azonosítottunk. Amint korábban már említésre került a fehér nyár exudátum nemcsak azért speciális, mert eddig kizárólag innen sikerült *O. populialbae* törzseket izolálnunk, hanem azért is, mert ebből a szubsztrátumból (24 metilotróf élesztőre nézve pozitív minta) egy esetben sem sikerült *K. pastoris* törzset izolálnunk, amit rendkívül gyakran izoláltunk egyéb fa-exudátumokból; melyekben a törzsek több mint 60%-a *K. pastoris*-nak bizonyult. Izoláltuk viszont a fehér nyár exudátumokból az általunk vizsgált mintákból ritkán kitenyésző *K. pseudopastoris* két törzsét. Adataink szerint a fehér nyárfán és a tölgyfán kívül egyéb fafajok exudátumaiban többször együttesen fordult elő a *K. pastoris* és a *K. pseudopastoris*.

Az *O. zsoldii* (Péter és mtsai, 2003) és az *O. saltuana* (Péter és mtsai 2011b) egy nyolc fajt, köztük az *O. pini*-t magába foglaló 69%-os statisztikai megbízhatóságú csoport tagja a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán (13. ábra). A Zsolt János tiszteletére elnevezett *O. zsoldii*-t egyetlen, korhadts vasúti talpfáról izolált, törzs alapján írtuk le *Pichia zsoldii*-ként, ezt követően két további törzsét izoláltuk korhadts gyertyánról (*Carpinus betulus*) és hárs (*Tilia* sp.) levélről. A fajt Nagatsuka és mtsai (2008) sorolták át az *Ogataea* nemzetségbe. Az *O. zsoldii* gyakorlati alkalmazást nyerhet az élelmiszeriparban is használatos L-arabinóz előállítása során. Típus törzsének felhasználásával kukoricarost hidrolizátumból a teljes cukor tartalom 90%-át elérő tisztaságú L-arabinóz oldatot állítottak elő (Fehér, 2018; Pencz és mtsai, 2016).

Az *O. saltuana* leírásában szereplő négy magyarországi izolátuma közül hármat különböző fafajok korhadts faanyagáról, egyet pedig kocsánytalan tölgy leveléről izoláltunk. A

hazai izolátumok mellett a faj leírásakor figyelembe vettünk egy fenyőről gyűjtött rovarürülékből (USA) és egy azonosíthatatlan rovar bélcsatornájából (Bulgária) származó törzset is. A D1/D2 régióban 0-2 szubsztitúciót figyeltünk meg az *O. saltuana* törzsek között, míg az ITS régióban az európai izolátumok között csupán 1 szubsztitúciót detektáltunk, az észak-amerikai törzs 8-9 szubsztitúcióval különbözött az európai izolátumoktól. A D1/D2 domén szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján (7-9 szubsztitúció) az *O. saltuana* legközelebbi rokon faja az *O. zsoldii*. Mivel az ITS régióban az *O. saltuana* törzsek között tapasztalt eltérés meghaladja a szokásos intraspecifikus eltérés mértékét (Daniel és mtsai, 2009; Vu és mtsai, 2016), parszimónia (takarékoság) kapcsolatháló-elemzést (parsimony network analysis) is felhasználtunk a törzsek közötti rokonsági viszonyok vizsgálatára. A kapcsolatháló elemzés eredménye szerint valamennyi *O. saltuana* törzs tagja volt a hálózatnak a 95%-os kapcsolódási határérték alkalmazása mellett, míg az *O. zsoldii* típus törzse nem (Péter és mtsai 2011b). Ez Lachance és mtsai (2010, 2011a) irányelve szerint alátámasztja, hogy az *O. saltuana* törzsek azonos, az *O. zsoldii*-től eltérő fajhoz tartoznak. Ezt a hipotézist erősíti meg a két faj ITS régióinak nukleotid bázissorrend összehasonlítása is (17-18 bázis eltérés/14-15 szubsztitúció). A faj leírása óta egy további törzset izoláltuk gyertyán (*Carpinus betulus*) levélről.

Az *O. pilisensis* és az *O. nitratoaversa* a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán egy statisztikai alátámasztottsággal nem rendelkező csoport tagja (13. ábra). Az *O. pilisensis*-t *P. pilisensis* néven írtuk le egyetlen, a Pilis hegységből származó, korhadat tölgyfa (*Quercus* sp.) mintából izolált törzs alapján (Péter és mtsai, 2003), később Kurtzman és Robnett (2010) sorolták át az *Ogataea* nemzetségbe. A D1/D2 szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján az *O. pilisensis*-hez jelenleg legközelebbi faj az *O. cecidiorum*, amit Oroszországban fűzfáról gyűjtött gubacsról írtak le (Glushakova és mtsai, 2010). Az *O. pilisensis* leírása (2003) óta sem sikerült további törzset izolálnunk.

Az *O. nitratoaversa* leírásakor három törzset vettünk figyelembe (Péter és mtsai, 2008), ezek közül 1-1 törzs korhadat faanyagról származott [éger (*Alnus glutinosa*), Pilis hegység; bükk (*Fagus sylvatica*) Bükk hegység], egy pedig bükkfa levélről (Pilis hegység). A három törzs D1/D2 és ITS régióinak DNS bázissorrendje azonos volt. A D1/D2 szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján az *O. nitratoaversa* az *O. pilisensis*-hez és a *C. piceae*-hez áll a legközelebb, mindkét fajtól mindössze öt szubsztitúció választja el. Az ITS régió bázissorrendjében viszont mindkét említett fajtól 10%-ot meghaladó mértékben különbözik az

O. nitratoaversa, jelezve, hogy valóban azoktól eltérő fajról van szó. Leírása óta két további *O. nitratoaversa* törzset izoláltunk korhadtt faanyagról. Az *O. nitratoaversa*, ahogy erre neve is utal, nem képes a nitrátot egyedüli nitrogén forrásként hasznosítani. Az *Ogataea* nemzetség számos nitrát-asszimilációra képtelen élesztőgomba fajt foglalt magába már az *O. nitratoaversa* leírásakor is. Ilyenek például az *O. kodamae*, az *O. dorogensis* és az *O. falcaomorisii*. A nemzetséget (Yamada és mtsai, 1994) néhány kalap alakú aszkospórát képző nitrát-asszimiláló *Pichia* faj számára hozták létre a részleges 18S és 26S rRNS bázissorrendek elemzése alapján. Ennek ellenére, a nitrát-asszimilációra képtelen *Ogataea* fajok későbbi leírásakor a szerzők nem változtattak a nemzetség diagnózisán. További furcsaság, hogy maga a nemzetség Yamada és mtsai (1994) által kiválasztott típusfaja, az *O. minuta* is variábilis a nitrát-asszimiláció képességére nézve, és ennek Yamada és mtsai (1994) is tudatában voltak. Ennek az ellentmondásnak a kiküszöbölésére, a nitrát-asszimilációra képtelen *O. nitratoaversa* leírásakor javasoltuk a nemzetség diagnózisában a „Kálium-nitrátot asszimilálja.” kitételt a „Nitrát asszimiláció variábilis.”-ra változtatni. Ez a javaslat, amit Kurtzman (2011d) is elfogadott, akkor is helytálló marad, ha az *Ogataea* nemzetség előrelátható, kisebb nemzetségekre való felosztásakor az *O. nitratoaversa* egy másik nemzetségbe kerül átsorolásra, mivel maga a típusfaj (*O. minuta*) nitrát-asszimiláló képessége is változó, és több azzal közeli filogenetikai rokonságban álló faj is képtelen a nitrát hasznosítására.

A *C. suzukii* a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán egy 86%-os statisztikai megbízhatósággal rendelkező, hat fajt magába foglaló csoport része (13. ábra). Leírásakor (Péter és mtsai, 2003) egyetlen, Tajvanból származó azonosítatlan fakéreg mintáról izolált törzs állt a rendelkezésünkre és az azóta eltelt időben sem sikerült további *C. suzukii* törzset izolálnunk. A faj mind D1/D2 nukleotid bázissorrendjében, mind fenotípusos tulajdonságaiban jelentősen eltér a közeli rokon fajoktól. A *C. suzukii*-t magába foglaló klád tagja az *O. ramenticola*, a nemzetség egyetlen faja, amelyről bebizonyosodott, hogy heterotallikus. Az *O. ramenticola* nagy statisztikai megbízhatósággal (73%) a *C. nitratophila*-val szomszédos pozíciót foglal el a D1/D2 törzsfán. A *The Yeasts: A Taxonomic Study* legutóbbi kiadása (Kurtzman és mtsai, 2011a) a *C. nitratophila*-nak csupán egyetlen, Kaliforniában fenyőről (*Pinus ponderosa*) gyűjtött bogárról (*Dendroctonus monticolae*) izolált törzséről tesz említést. Mivel az egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó táplevesben való dúsítást követően sikerült két további *C. nitratophila* törzset izolálnunk lucfenyő (*Picea abies*) exudátumból és erdeifenyő (*Pinus*

sylvestris) korhadts faanyagáról, az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint megvizsgáltuk, hogy az általunk izolált *C. nitratothila* törzsek és a faj típustörzsének kevert tenyészetek képeznek-e askospórát. Azonban sem a három törzs kevert tenyészetében, sem az egyes törzsek tiszta tenyészetében nem sikerült askosporulációt megfigyelni.

Két általunk leírt új *Ogataea* faj, az *O. pignaliae* (Péter és mtsai, 2010) és az *O. thermophila* (Péter és mtsai, 2007b) esetében *C. pignaliae* és a *C. thermophila* törzsek tenyészetében sikerült askospóra képzést indukálni, és az akkor érvényes nevezéktani szabályoknak megfelelően az ivaros alakokat új fajokként írtuk le. Az *O. pignaliae* esetében az askosporulációt a módosított nitrát agar (Pincus és mtsai, 1988) felhasználásával sikerült indukálni. Ezt a táptalajt askospóra képzés vizsgálatára tudomásom szerint korábban senki nem alkalmazta.

Az *O. thermophila* nem szerepel a 13. ábrán, mivel idő közben kiderült, hogy az *O. polymorpha* egyik szinonimja (Kurtzman és Robnett, 2010; Suh és Zhou, 2010). Ezt az *O. thermophila* leírásakor nem ismertük fel, mert 2007-ben az *O. polymorpha* a *Pichia angusta* szinonimja volt és nem állt rendelkezésre D1/D2 vonalkód DNS szekvenciája a GenBank adatbázisában. Ezt követően Kurtzman és Robnett (2010) az ITS, a rRNS nagy alegységét kódoló gén és a transzlációs elongációs faktor 1- α (EF-1 α) gén bázissorrendjeinek összehasonlítása alapján tisztázták, hogy az *O. polymorpha* és a *P. angusta* egymással közeli rokonságban álló, de különböző fajok, míg az *O. thermophila* és az *O. polymorpha* azonos fajt képviselnek. Suh és Zhou (2010) ITS és D1/D2 nukleotid szekvencia analízis alapján megerősítették Kurtzman és Robnett eredményeit, a *Pichia angusta*-t új kombinációként áthelyezték az *Ogataea* nemzetségbe és az *O. thermophila*-t az *O. polymorpha* szinonimjai között sorolták fel. Az *O. (Candida) thermophila*-t húgyúti fertőzéshez kapcsolódó fungémiában szenvedő gyermek véréből is izolálták (Bar-Meir és mtsai, 2006), de akkor még a szerzők sem ismerhették fel, hogy egy *O. polymorpha* törzsről volt szó. Az *O. polymorpha* a legnagyobb hőmérsékleten szaporodni képes élesztőgombák közé tartozik. Törzsei közötti némi eltéréssel maximális szaporodási hőmérséklete 49 és 52°C közötti érték. (Shin és mtsai, 2001; Péter és mtsai, 2007b, Péter és mtsai, 2017b). Azok a mikroorganizmusok, ide értve az élesztőgombákat, amelyek olyan körülmények között képesek szaporodni, amelyek más mikroorganizmusok szaporodását nem teszik lehetővé, előnyösek lehetnek potenciális ipari alkalmazásuk során (Takashima és mtsai, 2009; Péter és mtsai, 2017b).

Két új obligát ozmofil élesztőgomba faj élelmiszerekről

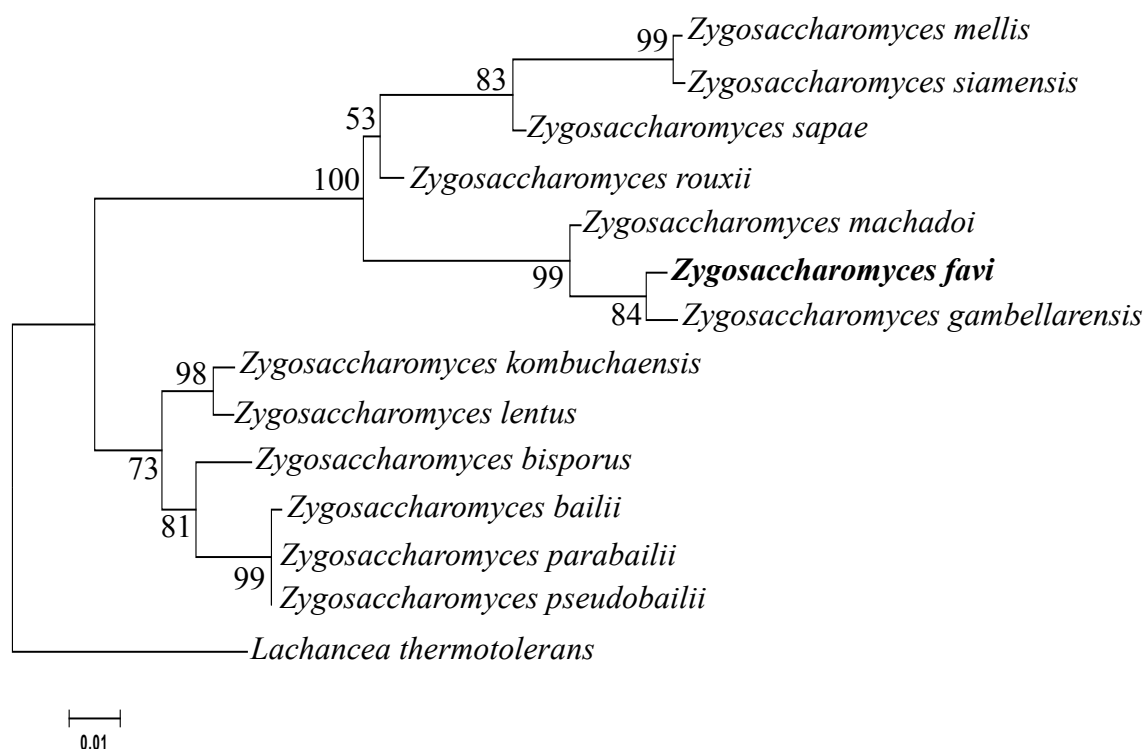
A legutóbbi időkig mindössze egyetlen obligát ozmofil élesztőgomba faj, a *C. glucosophila* volt ismert. Nemrégiben azonban két további ozmofil élesztőgomba fajt, *Zygosaccharomyces favi* (Čadež és mtsai, 2015) és *Schizosaccharomyces osmophilus* (Brysch-Herzberg és mtsai, 2019) írtunk le. Mindkét újonnan leírt faj egy-egy törzse élelmiszerből, sorrendben mézből és aszalt gyümölcs készítményből került izolálásra, míg a további törzsek mindkét esetben méhkenyérrel, ami megmagyarázza a törzsek eredetét is az élelmiszerekben.

Zygosaccharomyces favi – a második ismert obligát ozmofil élesztőgomba faj mézből és méhkenyérrel

A *Zygosaccharomyces* nemzetség számos élelmiszeripari jelentőségű élesztőgomba fajt foglal magába. A *The Yeasts: A Taxonomic Study* legutóbbi kiadása hat *Zygosaccharomyces* fajt tárgyal, és azokat fiziológiai sajátásaik alapján három csoportra osztja. A *Z. baillii*-t és a *Z. bisporus*-t az élelmiszerek tartósítására használt gyenge szerves savakkal szembeni extrém rezisztencia jellemzi. A *Z. lentus* és a *Z. kombuchaensis* a kis hőmérsékletet kedveli, lassan szaporodik 4 °C hőmérsékleten is. A harmadik csoportba két extrém ozmotoleráns faj, a *Z. rouxii* és a *Z. mellis* tartozik (James and Stratford, 2011). A monográfia megjelenése óta számos új *Zygosaccharomyces* faj került leírásra és a nemzetség fajainak száma 12-re bővült. Az újonnan leírt fajok zöme [*Z. machadoi* (Rosa és Lachance, 2005), *Z. gambellarensis* (Torriani és mtsai, 2011), *Z. siamensis* (Saksinchai és mtsai, 2012), *Z. sapae* (Solieri és mtsai, 2013)] a filogenetikai törzsfák az ozmotoleráns *Z. rouxii*-val és a *Z. mellis*-szel alkot közös csoportot. Bár a felsorolt fajok ozmotoleránsak, valamennyi képes nagy vízaktivitású tápközegben is szaporodni.

Magyarországról származó méhkenyérrel négy és vegyes propoliszos virágmézből egy olyan élesztőgomba törzset izoláltunk 50%-os (m/m) glükóz agaron, amelyek az élesztőgombák tenyésztésére és fenntartására rutinszerűen alkalmazott nagy vízaktivitású táptalajokon (például glükóz-pepton-élesztőkivonat agar, 5%-os maláta kivonat agar, burgonya-dextróz agar) nem képesek szaporodni, tehát a *The Yeasts: A Taxonomic Study* (Kurtzman és mtsai, 2011a) terminológiáját követve obligát ozmofil tulajdonsággal rendelkeznek. Az öt törzs alapján, *Z. favi* néven, leírtuk a második obligát ozmofil élesztőgomba fajt (Čadež és mtsai, 2015). A vizsgált törzsek közül három azonos D1/D2

bázissorrenddel rendelkezett és a másik két törzs is mindössze egy inszercióval/delécióval különbözött tőlük. A D1/D2 domén szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján a *Z. gambellarensis* bizonyult a legközelebbi leírt fajnak, amely típustörzsétől öt szubsztitúcióban tért el az általunk vizsgált öt törzs, ami azt valószínűsítette, hogy eltérő fajokról van szó (Kurtzman és Robnett, 1998; Vu és mtsai, 2016). Az ITS régiók felszaporításával nyert termékek DNS bázissorrendjének meghatározása először sikertelennek bizonyult, a kromatogramokon található dupla és többszörös csúcsok miatt, amelyek azt valószínűsítették, hogy az egyes törzsek több különböző ITS kópiát hordoznak. Ezt a hipotézist megerősítette a felszaporított ITS fragmentek DNS bázissorrendjeinek pGEM-T vektor rendszerbe inszertálás utáni meghatározása. Az egyes törzsekből 8-12 ITS klón DNS bázissorrendjét határoztuk meg és törzsenként 3-8 különböző kópiát detektáltunk (Čadež és mtsai, 2015). Egy adott törzsen belüli eltérő ITS kópiákat megfigyeltek már más élesztőgombák esetében is. A *Zygosaccharomyces* nemzetségben a *Z. rouxii* és a *Z. sapae* esetében 20%-ot is meghaladó intragenomikus ITS bázissorrend eltérésekről számoltak be (Solieri és mtsai, 2013; Gordon és Wolfe, 2008). A *Z. favi* esetében azonban az egy törzsből származó ITS kópiák között zömében csak néhány inszerció/delécio eltérést tapasztaltunk, és mindössze egy szubsztitúciót detektáltunk az egyik vizsgált törzs egyik ITS kópiájában. Az indelek elsősorban a homopolimer régiókban [poli(T) és poli(A)] helyezkedtek el. Szemben a *Z. favi* törzseken belüli és azok közötti kis ITS szekvencia különbségekkel, a *Z. favi* törzsek és a *Z. gambellarensis* típustörzse között körülbelül 90 nukleotid különbség figyelhető meg, amelyből több mint 20 szubsztitúció. A *Z. favi* törzsek transzlációs elongációs faktor-1 α gén bázissorrendje azonos volt és 13 szubsztitúcióban tért el a *Z. gambellarensis*-étől. A vizsgált törzsek D1/D2, ITS és EF-1 α gén bázissorrendjeinek a *Z. gambellarensis* homológ DNS régióival való összehasonlítása együttesen alátámasztotta, hogy azok a *Z. gambellarensis*-től eltérő fajt képviselnek. A *Z. favi*-nak a D1/D2 régió bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán elfoglalt helyét a 28. ábra szemlélteti. Az ábrán a *Z. mellis* és a *Z. gambellarensis* által határolt ozmofil élesztők csoportja, amely magában foglalja többek között a nemzetség típusfaját, a *Z. rouxii*-t valamint a *Z. favi*-t is, 100%-os statisztikai megbízhatósággal rendelkezik. A *Z. favi* 99%-os valószínűséggel alkot egy kisebb csoportot méhek (*Tetragonisca angustula*) fészkeiből Brazíliában izolált *Z. machadoi*-val és az Olaszországban édes fehérborból izolált *Z. gambellarensis*-szel.



28. ábra. A *Zygosaccharomyces favi* elhelyezkedése a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Kimura-2 paraméter modellre (Kimura, 1980) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciókat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 518 pozíciót tartalmazott. A *Lachancea thermotolerans* szolgált kijelölt külsőportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

Az élesztőgomba monográfia legutóbbi kiadásában (Kurtzman és mtsai, 2011a) tárgyalt 1265 faj közül mindössze egy obligát ozmofil, a Tokuoka és mtsai (1987) által leírt *C. glucosophila* (Lachance és mtsai, 2011b). Mivel az obligát ozmofil törzsek fenotípusos tulajdonságainak zömét az erre általánosan használt módszerekkel nem lehet vizsgálni, mert nem szaporodnak vizsgálatokhoz rutinszerűen használt táptalajokon, más módszereket kellett kidolgoznunk erre a célra. Különösen a szénforrás asszimiláció vizsgálata volt problematikus, mert a szénforrások egy részénél, például szerves savak, alkoholok, azok toxikus hatása miatt nem emelhető a koncentráció a vízaktivitás megfelelő szintre csökkentése céljából. A *C. glucosophila* szénforrás asszimilációjának vizsgálatakor 10% NaCl-dal kiegészített tápközeget használtak (Tokuoka és mtsai, 1987; Lachance és mtsai, 2011b). A *Z. favi* törzsek

a 10% NaCl-dal kiegészített Yeast Nitrogen Base (YNB) tápközegben gyakorlatilag nem szaporodtak még a pozitív kontrollként szolgáló glükóz jelenlétében sem. A *Z. favi* törzsek speciális szaporodási igényének kielégítésére végül az anyagok és módszerek fejezetben leírt metodikát dolgoztuk ki. Azoknál a tesztekénél, ahol ez lehetséges volt, az alkalmazott cukrok koncentrációját emeltük meg, a szénforrás asszimilációt pedig 50% (m/m) polietilén-glikol 200 (PEG 200) tartalmú tápközegben teszteltük. Az 50%-os PEG 200 koncentrációt, amely méréseink szerint körülbelül 0,94 a_w (vízaktivitás) értéknek felel meg, előkísérleteink alapján választottuk ki, melyek során azt tapasztaltuk, hogy 40% és 60% közötti PEG 200 koncentráció eredményezte a *Z. favi* törzsek leggyorsabb szaporodását.

Ugyan a *Z. favi* csupán a második leírt obligát ozmofil élesztőgomba, több évtizeddel ezelőtt is beszámoltak már olyan élesztőgomba törzsről, amely megnövelt (10-20%) glükóz koncentrációt igényelt a szaporodásához (Munitis és mtsai, 1976). A törzs mézből származott, és morfológiai bélyegek alapján *S. bisporus* var. *mellis*-ként (jelenleg *Z. mellis*) azonosították. Sajnos a szerzők nem tesznek említést arról, hogy a törzset törzsgyűjteményben deponálták volna, ezért nem állt rendelkezésünkre, rendszertani azonosításának nukleinsav bázissorrend alapú ellenőrzésére nem nyílt lehetőség. Koh (1975) arról számolt be, hogy *S. (Zygosaccharomyces) rouxii* mutagén kezelését követően obligát ozmofil törzseket izolált, amelyek nem voltak képesek szaporodni 2% (m/v) glükóz tartalmú tápközegben. A mutáns törzsek egy része azonban reverzió ment keresztül vagy adaptálható volt a 2% (m/v) glükóz tartalmú tápközeghez. Koh eredményei azt jelzik, hogy az ozmofília és az obligát ozmofília között nem feltétlenül húzódik éles határ. Nem zárható ki, hogy a *Z. favi* törzsek is adaptálódhatnak a nagy vízaktivitású tápközegekhez, ahogyan az sem, hogy előfordulhatnak a természetben a fajnak olyan törzsei, amelyek képesek nagy vízaktivitású táptalajokon is szaporodni.

A *Z. favi* vizsgált törzsei 10 - 60% (m/m) glükózt tartalmazó tápközegekben egyaránt képesek voltak szaporodni. A faj típustörzse lassan és gyengén szaporodott 80% (m/m) PEG 200 tartalmú tápközegben is, amelynek vízaktivitás értéke méréseink szerint 0,72-nek adódott. Az általunk vizsgált *Z. favi* törzsek ozmofil tulajdonsága összhangban áll izolálási forrásukkal (méhkenyér, méz). A méhkenyér a háziméh (*Apis mellifera*) dolgozói által a lép sejtjeibe gyűjtött és kis mennyiségű mézzel befedett, erjedésen keresztülment virágpor (Gillam, 1979), melynek vízaktivitása függ a kaptárban fennálló nedvességtartalomtól. Conklin (2012) páratartalom méréseire alapozott becslése alapján arra a következtetésre jutott, hogy az általa vizsgált kaptárban a méhkenyér vízaktivitása soha nem emelkedett 0,7 fölé. A méz

vízaktivitása 0,6 vagy annál kisebb (Deák, 2008b). Ozmofil sajátja miatt a *Z. favi* feltételezhetően *Z. rouxii* jól ismert romlást okozó képességéhez (például Pitt és Hocking, 2009) hasonló potenciállal rendelkezik nagy cukortartalmú élelmiszerek esetében.

***Schizosaccharomyces osmophilus* – egy hasadó obligát ozmofil élesztőgomba**

Az aszkuszos gombák legősibb, Taprinomycotina, altörzsébe sorolt, *Schizosaccharomyces* nemzetség ivartalanul hasadással szaporodó, élesztőgombákat foglal magába. A *The Yeasts: A Taxonomic Study* legutóbbi kiadása három fajt (*Sch. japonicus*, *Sch. octosporus* és *Sch. pombe*) tárgyal (Vaughan-Martini és Martini, 2011b). A három faj mind fenotípusos, mind genotípusos tulajdonságaiban nagymértékben különbözik egymástól, ezért egyes szerzők javasolták külön nemzetségekbe sorolásukat is (Vaughan-Martini és Martini, 2011b). Egy további *Schizosaccharomyces* faj, a *Sch. cryophilus* (Helston és mtsai, 2010) a monográfia szerkesztésének lezárása után került leírásra. A monográfiában tárgyalt három faj (*Sch. japonicus*, *Sch. octosporus* és *Sch. pombe*) törzseit gyakran izolálják nagy cukortartalmú szubsztrátumokból, ezen belül számos *Sch. octosporus* törzs származik mézből és aszalt gyümölcsökről (Vaughan-Martini és Martini, 2011b). A *Sch. cryophilus* egyetlen ismert törzse szintén nagy cukortartalmú szubsztrátumról, méhkenyérről származik (Helston és mtsai, 2010). Bár a felsorolt fajok ismert törzseinek zömét nagy cukortartalmú szubsztrátumról izolálták, valamennyi képes nagy vízaktivitású, kis cukortartalmú tápközegben is szaporodni.

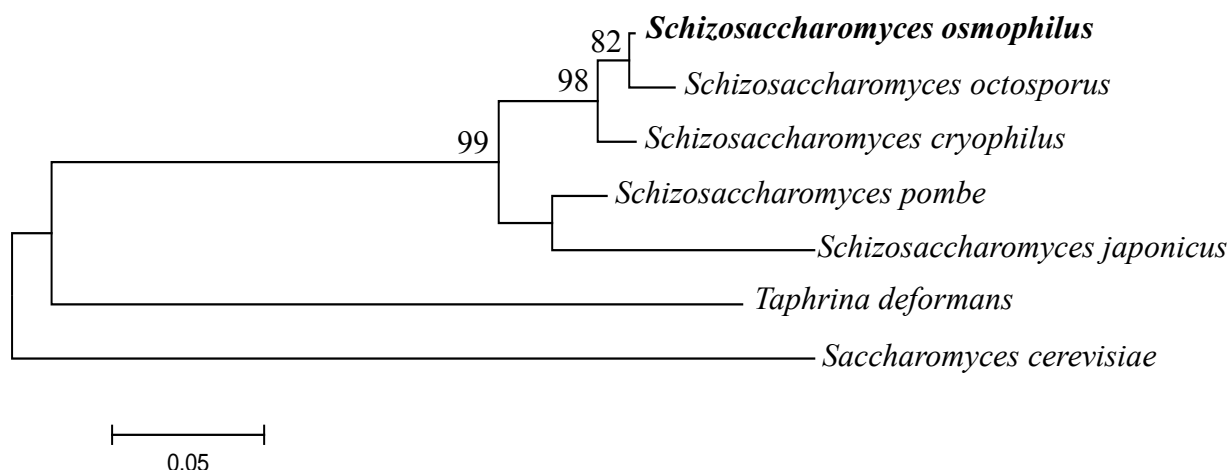
Spanyolországból származó aszalt füge készítményből, 30%-os (m/m) glükóz agaron, egy mikromorfológiai tulajdonságai alapján a *Sch. octosporus*-hoz hasonló, de nagy vízaktivitású tápközegben szaporodni képtelen élesztőgomba törzset izoláltunk. A törzs D1/D2 szekvenciája alapján egy, a *Sch. octosporus*-szal közeli rokonságban álló, de leíratlan faj képviselőjének bizonyult. Később külföldi kollégák számos további törzset izoláltak Németországban, magányosan élő méhek (*Osmia rufa* és *Osmia florissomnis*) által készített méhkenyérről, amelyeknek a D1/D2 szekvenciája azonos volt az általunk aszalt füge készítményből izolált törzs DNS bázissorrendjével és 11 szubsztitúcióval (3,5%) tért el a *Sch. octosporus* típustörzsének D1/D2 bázissorrendjétől. A *Z. favi* esetében tapasztaltakhoz hasonlóan, az általunk vizsgált *Sch. osmophilus* törzsekről is kiderült, hogy különböző ITS kópiákat tartalmaznak, amelyekből klónozást követően kilenc különböző variánst detektáltunk. A kópiák között a fajon belül megszokottnál nagyobb, maximálisan 1,8%-os

bázissorrend különbséget figyeltünk meg. A maximális eltérésnek azonban kb. a fele inszerció/delécio volt, továbbá a *Sch. osmophilus* ITS kópiának szekvenciái minimum 30%-ban tértek el a legközelebbi leírt *Schizosaccharomyces* faj, a *Sch. octosporus*, típustörzsének ITS bázissorrendjétől. Az RNA-z P gén egy kb. 230 bázispár hosszúságú fragmentjének bázissorrendjeinek összehasonlítása szintén alátámasztotta, hogy egy a *Sch. octosporus*-szal közeli rokonságban álló, de attól eltérő fajt képviselnek a spanyol aszalt füge készítményből és a németországi méhkenyérből izolált törzsek. A spanyol törzs és a német törzsek között mindössze 2 (szomszédos) indelt figyeltünk meg, míg az új faj és a *Sch. octosporus* típustörzsei között 8 szubsztitúció és két indel eltérést tapasztaltunk.

A *Sch. osmophilus*-nak a D1/D2 régió bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán elfoglalt helyét a 29. ábra szemlélteti. A *Sch. osmophilus* a *Sch. octosporus*-szal és a *Sch. cryophilus*-szal alkot egy nagy statisztikai megbízhatóságú (98%) csoportot. A *Schizosaccharomyces* nemzetség is 99%-os statisztikai megbízhatósággal rendelkezik.

A harmadik obligát ozmofil élesztőgomba fajt, a *Schizosaccharomyces osmophilus*-t, kilenc törzs vizsgálata alapján írtuk le (Brysch-Herzberg és mtsai, 2019). A kilenc vizsgált törzsre egyaránt jellemző, hogy nem képesek az élesztőgombák tenyésztésére rutinszerűen alkalmazott nagy vízaktivitású táptalajokon szaporodni. Mivel az erjesztés és a szénforrás asszimiláció vizsgálatára általánosan használt tesztek (Kurtzman és mtsai, 2011c) nem voltak alkalmasak az obligát ozmofil törzsek jellemzésére, az erjesztés vizsgálatára használt tápleveseket 30, az asszimilációs vizsgálatokhoz alkalmazott tápközegeket pedig 50% (m/m) szorbittal egészítettük ki, a tápközegek vízaktivitásának csökkentése céljából. Azért a szorbitra esett a választás, mert előkísérleteink során kiderült, hogy a *Sch. osmophilus* törzsek nem képesek ezt a szénforrást asszimilálni.

Ozmofil tulajdonsága és természetes előfordulása miatt a *Sch. osmophilus* nagy cukortartalmú élelmiszerek, élelmiszer alapanyagok, mint pl. méz vagy gyümölcsle sűrítmények szennyező vagy romlást okozó élesztőgombájaként jöhet szóba. Várható, hogy megfelelő izolálási és rendszertani azonosítási technikákat alkalmazva további törzsei kerülnek izolálásra nagy cukortartalmú élelmiszerekből.



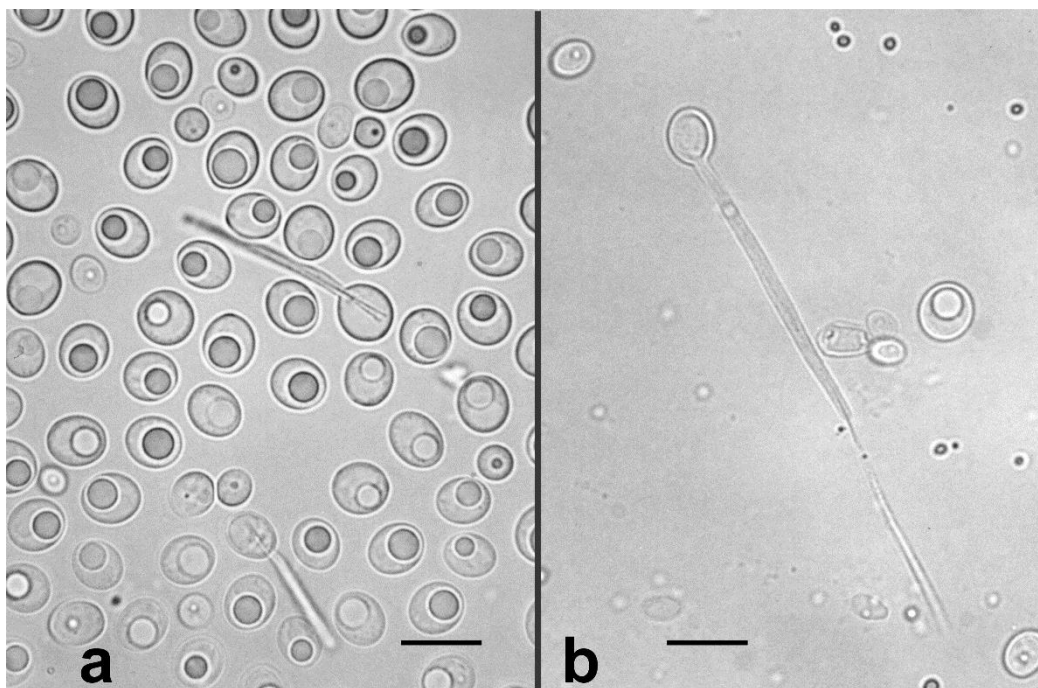
29. ábra. A *Schizosaccharomyces osmophilus* elhelyezkedése a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura-Nei modellre (Tamura és Nei, 1993) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfák kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/delécioákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 559 pozíciót tartalmazott. A *Saccharomyces cerevisiae* szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

***Metschnikowia viticola* – egy új élesztőgomba faj szőlőről**

A *Metschnikowia* nemzetség ismert fajainak száma, a DNS bázissorrend alapú rendszertani azonosítás széleskörű alkalmazásának köszönhetően gyorsan nő. Míg a The Yeasts, a Taxonomy Study 4. kiadása csupán 10 fajt (Miller és Phaff, 1998), addig az 5. kiadás már 39 fajt tárgyal (Lachance, 2011), Lachance (2016) pedig már 81 fajról tesz említést a *Metschnikowia*-kládban, igaz ez a szám magában foglalja a *Metschnikowia* fajokkal filogenetikai rokonságban álló *Candida* fajokat és néhány még leírásra váró *Metschnikowia* fajt is. A nemzetség leírt fajai számának gyarapodása továbbra is töretlen. Kurtzman és Matsai (2018) például négy további *Metschnikowia* fajt írtak le és hat *Metschnikowia*-kládba tartozó *Candida* fajt soroltak át a nemzetségbe. A *Metschnikowia* fajokra jellemző, hogy túlnyomórészt aszkospórát képeznek, és az fajoknak csupán egy kis részében sikerült eddig megfigyelni az aszkospórák kiszabadulását az aszkuszból (Lachance, 2011).

Egy Egri borvidéken (Noszvaj) gyűjtött szőlő (*Vitis vinifera*) mintáról izolált két élesztőgomba törzs vizsgálatakor megfigyeltük, hogy a két törzsből felszaporított, a rRNS kis alegységét kódoló gént és a szomszédos ITS-1 régiót magában foglaló DNS szakasz öt

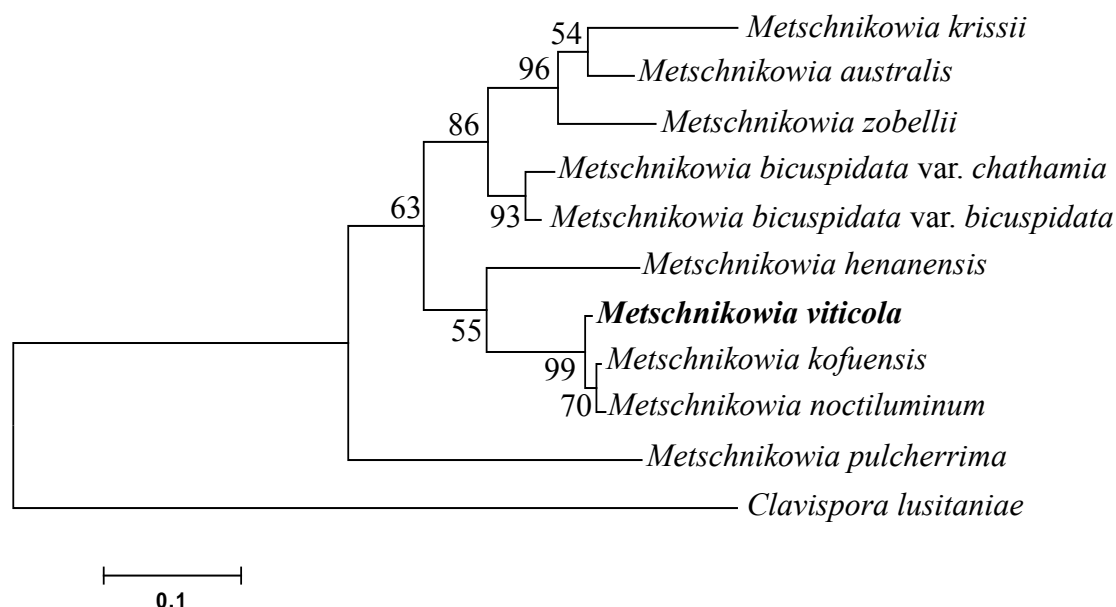
különböző restriktációs enzimmel történő emésztése minden esetben a *C. kofuensis* típustörzsével és egy további törzsével azonos mintázatot adott. A részletesebb vizsgálatra kiválasztott törzs D1/D2 domén bázissorrendje pedig mindössze egy szubsztitúcióval és egy indellel tért el *C. kofuensis* típustörzsének megfelelő DNS szekvenciájától. A két magyarországi izolátum és a *C. kofuensis* törzsek fenotípusos tulajdonságai is nagyon közel álltak egymáshoz, de a hazai izolátumok a *C. kofuensis*-szel ellentétben, bár gyengén, asszimilálták a hexadekánt. Az Egri borvidékről származó két törzs, hígított (1:9) táptalajokon (burgonya-dextróz agar és V8 agar) 10 °C vagy 18 °C hőmérsékleten történő 14 napos inkubálás után a *Metschnikowia* fajok egy részére jellemző módon a gömb alakú klamidospóra és az abból kitüremkedő hosszú, henger alakú nyúlvány által alkotott aszkuszban 1-2 tű alakú aszkospórát képzett. A törzsek izolálását követően néhány esetben sikerült megfigyelnünk az aszkospórák aszkuszból történő kiszabadulását is (30. ábra). Az aszkospóra képzés intenzitása a két törzs esetén nagyon eltérő volt, jelezve, hogy a törzsek nem egymás klónjai annak ellenére, hogy azonos mintából származnak. A *C. kofuensis* törzsek, bár klamidospórát képeznek, esetükben a fent leírt körölmények között aszkospóra képzést nem sikerült előidézelnünk. Bár a magyarországi izolátumok és a *C. kofuensis* törzsek 18S rRNS-ITS-1 DNS fragmentjének restriktációs enzimmekkel történő emésztésével nyert mintázatok azonossága és a D1/D2 régió bázissorrendjei között detektált minimális különbség valószínűsíti, hogy a magyarországi izolátumok a *C. kofuensis* teleomorf alakját képviselik, ennek igazolására további, a hipotézist megerősítő, adatokra van szükség. A fentiek miatt a két noszvaji izolátum *M. viticola* néven történő leírásakor (Péter és mtsai, 2005b) annak megállapítására szorítkoztunk, hogy a *C. kofuensis* és a *M. viticola* egymással közeli rokonságban álló fajok, amelyek anamorf-teleomorf párt alkothatnak. A jelenleg ismert *Metschnikowia*-k között ugyanis vannak olyan közeli rokon faj párok, amelyeknek D1/D2 bázissorrendje akár teljesen azonos is lehet (Kurtzman és mtsai, 2018). A fiziológiai tulajdonságok nagymértékű hasonlósága sem jelenti a *C. kofuensis* és a *M. viticola* azonos fajhoz tartozásának egyértelmű megerősítését, mivel a *Metschnikowia* nemzetség fajainak fenotípusos variabilitása meglehetősen csekély. Sokszor a DNS szekvencia összehasonlítások alapján egyértelműen különböző fajok sem különíthetők el egymástól fenotípus bélyegek alapján (Lachance, 2011).



30. ábra. A *Metschnikowia viticola* típus törzsének (NCAIM Y.01705^T) sporuláló tenyészetének [hígított (1:9) burgonya-dextróz agar, 10 °C, 14 nap]. A méretvonal hossza 10 μm. Baloldali panel (a) olajcseppeket tartalmazó klamidospórák és tű alakú aszkospórákat tartalmazó aszkuszkok. Jobboldali panel (b) aszkuszból kiszabaduló spóra (Péter és mtsai, 2005b; a kiadó engedélyével).

Jelenleg már rendelkezésre áll a *M. viticola* és a *C. kofuensis* típus törzsei ITS régióinak nukleotid bázissorrendje a GenBank adatbázisában. Ezek 11 szubsztitúcióban és két indelben térnek el egymástól a 383 bázispár hosszúságú összerendezett szakaszon, azaz a korábban többször hivatkozott útmutatások figyelembevételével, az ITS szekvenciák összehasonlítása nem támasztja alá, hogy a *C. kofuensis* és a *M. viticola* anamorf-teleomorf párt alkotnak. A *C. kofuensis*-t a Melbourne Code koncepcióját követve Kurtzman és mtsai (2018) nemrégiben a *Metschnikowia* nemzetségbe sorolták, annak ellenére, hogy aszkospóra képzésről ők sem számoltak be. A *M. viticola* elhelyezkedését az ITS és D1/D2 szekvenciák elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán a 31. ábra szemlélteti. Az elemzésbe vont fajokat a Kurtzman és mtsai (2018) által közölt D1/D2 és transzlációs elongációs faktor 1- α (EF-1 α) gén szekvenciák elemzéséből levezetett törzsfá alapján választottam ki. A kiválasztás alapjául szolgáló kládban szerepelt még a *M. bicuspidata* var. *californica* is, amelyet nem tudtam figyelembe venni a filogenetikai elemzés során, mert típus törzsének ITS bázissorrendje a GenBank adatbázisában nem szerepel, az ATCC adatbázisban megtalálható szekvencia pedig nyilvánvalóan hibás, mert amennyiben az elemzésbe vontam, a *M.*

bicuspidata var. *californica* a külcsoponton (*Clavispora lusitaniae*) kívüli pozíciót foglalt el a törzsfán (nem kerül bemutatásra). A *M. viticola* a *M. kofuensis*-szel és a rovar (*Ceraeochrysa lineaticornis*) bélcsatornájából ismert *M. noctiluminum*-mal (Nguyen és mtsai, 2006) alkot 99%-os statisztikai megbízhatóságú csoportot, amely egy nagyobb, a nemzetség típusfaját, a *M. bicuspidata*-t is magában foglaló csoport része (31. ábra).

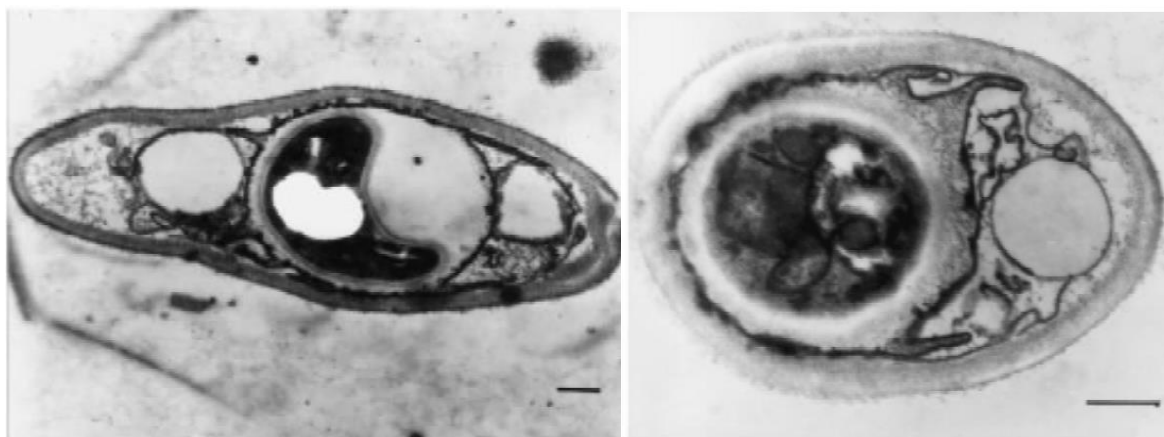


31. ábra. A *Metschnikowia viticola* elhelyezkedése az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a General Time Reversible modellre (Nei és Kumar, 2000) alapozva. A legnagyobb logaritmusos valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 762 pozíciót tartalmazott. A *Clavispora lusitaniae* szolgált külcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

A *M. viticola* két ismert törzsét szőlő (*Vitis vinifera*) bogyóról izoláltuk, míg a *C. (Metschnikowia) kofuensis* leírásában szereplő törzsei Japánban gyűjtött vadszőlő (*Vitis coignetiae*) bogyókról származtak (Mikata és mtsai, 1999). A *M. viticola*-nak, bár ismert törzseit szőlőről izoláltuk, nem biztos, hogy a szőlő bogyó az elsődleges élőhelye, mivel a vizsgált 18 szőlő minta közül mindössze egy mintából sikerült izolálnunk, míg a *M. pulcherrima*-t a minták harmadában megtaláltuk. Amennyiben a bor készítésében bármilyen szerepet játszik, az valószínűleg elsősorban az erjesztés beindításában és, β -glükozidáz aktivitása miatt, aromaanyagok felszabadításában nyilvánulhat meg. Mivel *pulcherrima*-t nem termel, erre alapuló antagonistá hatást nem fejthet ki.

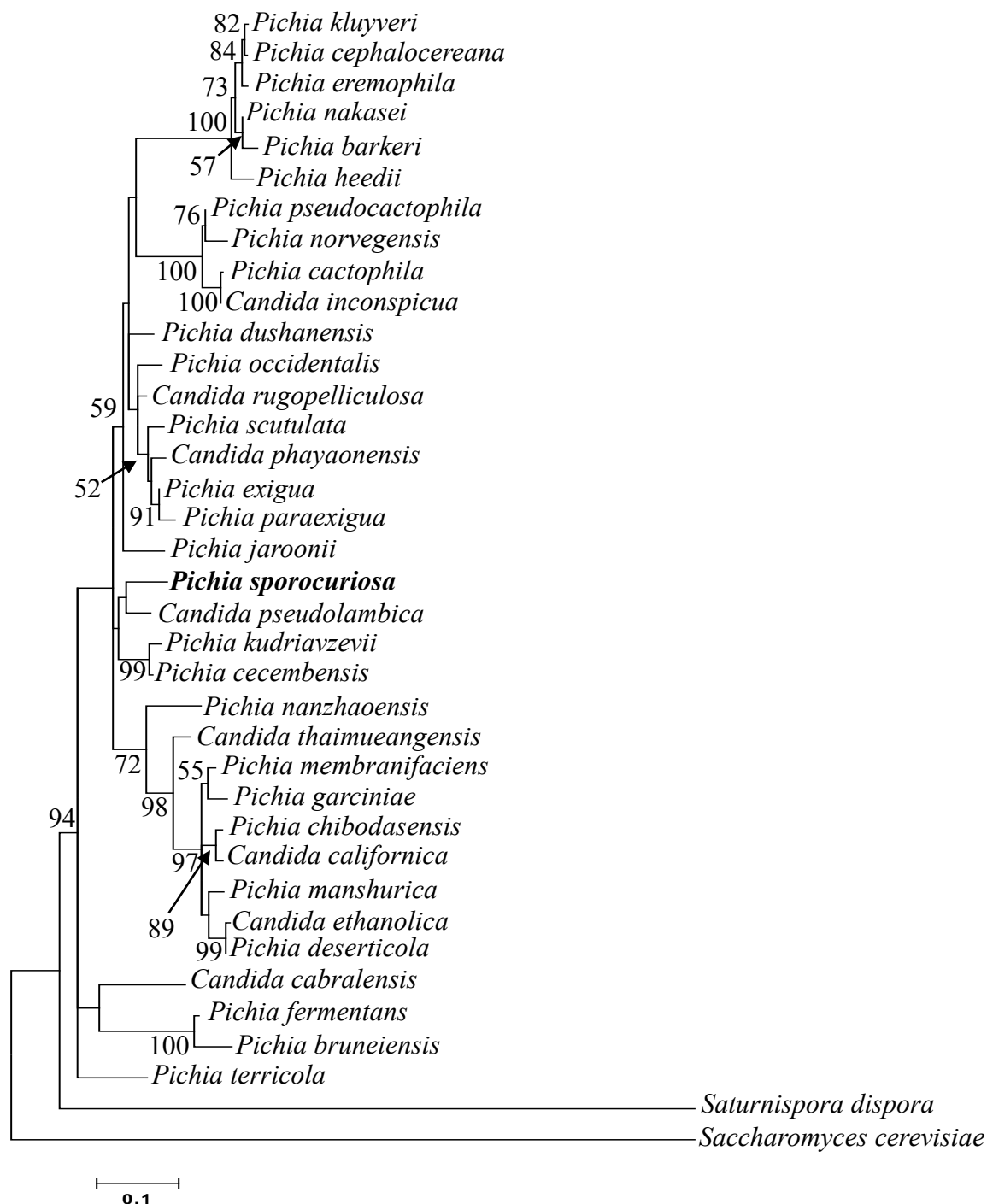
***Pichia sporocuriosa* – egy egyedülálló aszkospóra morfológiával rendelkező új élesztőgomba faj rambutánról**

Malajziából származó rothadó, erjedő rambutánról (*Nephelium lappaceum*) egy, a 18S rRNS gén részleges szekvenciája alapján a *Pichia* nemzetségbe tartozó, de valamennyi ismert fajtól eltérő élesztőgomba törzset izoláltunk. A 18S rRNS gén bázissorrendjének páronkénti összehasonlítása alapján az új faj leírásakor (Péter és mtsai, 2000) a *Pichia* nemzetség típusfaja, a *P. membranifaciens* volt a hozzá legközelebbi ismert élesztőgomba faj, amelytől 10 szubsztitúcióval és 4 indellel tért el a vizsgált 515 bázispár hosszúságú DNS fragment mentén. Az új faj leírásakor ismert egyetlen törzsének érdekessége, hogy minden eddig ismert élesztőgomba aszkospórájától eltérő aszkospórát képez (32. ábra), ezért a *P. sporocuriosa* nevet adtuk a fajnak. Az aszkospórák gömb alakúak, érdes felületűek és elágazó lebenyek helyezkednek el rajtuk. A faj leírásakor, a 32. ábrán bemutatott transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek alapján úgy gondoltuk, hogy a spórák felszínén található lebenyek egy része nem teljesen futja körbe a spórák felszínét. Mikata (2001) kiváló minőségű pásztázó (scanning) elektronmikroszkópos felvételei alapján azonban úgy tűnik, hogy a *P. sporocuriosa* spóráit, korábbi feltételezésünkkel ellentétben, valószínűleg csupán egyetlen, de egyes spórák esetében elágazó lebeny futja körbe olykor többször is, gyakran s-alakú elrendeződést mutatva. Mikata (2001) is megerősítette, hogy az összes ismert élesztőgombával ellentétben a *P. sporocuriosa* spóráit övező lebenyek nem záródnak gyűrűvé, hanem szabad végekkel rendelkeznek. A *Pichia* nemzetségbe 2000-ben és jelenleg besorolt fajok zöme is kalap alkú aszkospórát képez, bár voltak és jelenleg is vannak gömb alakú spórát képző *Pichia* fajok is. A nemzetség jelenleg elfogadott fajai közül például a volt *Issathenkia* fajok, a *P. exigua*, a *P. kudriavzevii*, a *P. occidentalis*, a *P. scutulata* és a *P. terricola* képeznek gömb alakú aszkospórát, azonban ezeknek a fajoknak az aszkospóráin nem találhatóak lebenyek. A nemzetség típusfaja (*P. membranifaciens*) is képezhet gömb alakú aszkospórát egyenlítői síkban elhelyezkedő lebennyel vagy a nélkül. A gömb alakú érdes aszkospóra, amelyet többszörösen körbefutó, olykor elágazó, de önmagába nem visszazáródó lebeny ölel körbe, a mai napig kizárólag a *P. sporocuriosa* esetében került megfigyelésre.



32. ábra. Az *Pichia sporocuriosa* típustörzse (NCAIM Y.01708^T) aszkuszainak metszete (burgonya-dextróz agar, 25 °C, 14 nap). Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel. A méretvonal hossza 0,5 µm. Csillag Ferencné és Nagy Barbara felvétele. (Péter és mtsai, 2000; a kiadó engedélyével).

Mivel a *P. sporocuriosa* leírásakor még nem volt nyilvánvaló, hogy az élesztőgombák elsődleges vonalkód szekvenciája a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiója lesz, a faj rendszertani helyét a rRNS kis alegységét kódoló gén részleges bázissorrendje alapján határoztuk meg. A *P. sporocuriosa* rendszertani helyét a D1/D2 szekvenciák elemzése (33. ábra) és a multigén filogenetikai elemzések (például Kurtzman és mtsai, 2008; Kurtzman, 2011e) is a *Pichia* nemzetségben, annak típusfajához közel jelölik ki. Az, hogy a *P. sporocuriosa* leírásakor nem határoztuk meg a típustörzs D1/D2 szekvenciáját, azzal a sajnálatos következménnyel járt, hogy a D1/D2 szekvencia hiánya miatt Thanh és mtsai (2003) licsi (*Litchi chinensis*) gyümölcsöt károsító moly (*Conopomorpha cramerella*) ürülékéből izolált törzsek alapján *Issatchenkia hanoiensis* néven újra leírták a fajt. Az *Issatchenkia hanoiensis*-ről később Kurtzman és mtsai (2008) mutatták ki a *P. sporocuriosa*-val megegyező D1/D2, ITS és a mitokondriális rRNS kis alegységét kódoló gén bázissorrendjei alapján, hogy a *P. sporocuriosa*-val azonos faj, és annak szinonimjává sorolták be. Ez az eset is alátámasztja a vonalkód szekvencia adatbázisok folyamatos karbantartásának fontosságát. Thahn és mtsai (2003) az *Issatchenkia hanoiensis* leírásakor fénymikroszkópos megfigyeléseik alapján gömb alakú érdekes aszkospórákról számoltak be, a spórák felszínén található lebenyről nem tettek említést, igaz a *P. sporocuriosa* esetében is elektronmikroszkópos felvételek tanulmányozására volt szükség a spórákat övező lebenyek részletes megfigyelésére (Péter és mtsai, 2000).



33. ábra. A *Pichia sporocuriosa* elhelyezkedése a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura-Nei modellre (Tamura és Nei, 1993) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. A végső adatbázis 478 pozíciót tartalmazott. Az inszerciákat/deléciákat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A

Saccharomyces cerevisiae szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

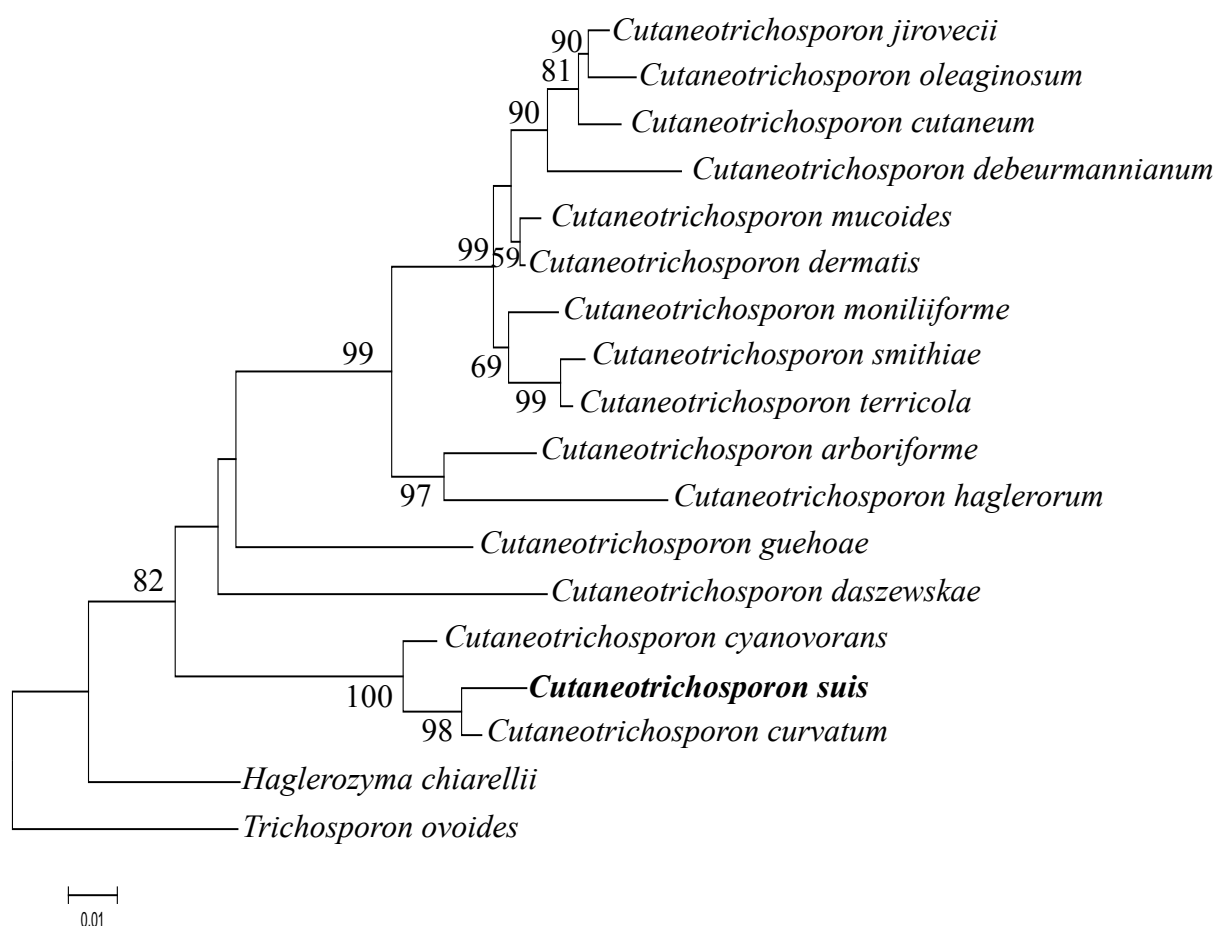
A *P. sporocuriosa* valamennyi ismert törzse romlott gyümölcsről (Péter és mtsai, 2000) vagy rovar által károsított gyümölcshöz kötődő szubsztrátumról (Thanh és mtsai, 2003) került izolálásra. A *P. sporocuriosa* fiziológiai tulajdonságai hasonlóak a *P. membranifaciens* tulajdonságaihoz, csakúgy, mint néhány további *Pichia* fajéhoz. A hasznosított szénforrások kis száma miatt fenotípusos tulajdonságaik alapján történő elkülönítésük nehézkes. A nagymértékű fenotípusos hasonlóság miatt a *P. sporocuriosa* feltételezhetően a *P. membranifaciens*-hez hasonló szerepet tölthet be gyümölcsökön. A *P. membranifaciens*, ugyan nem túl gyakran, de előfordul különböző gyümölcsök felszínén, és azok romlását is okozhatja (Deák, 2008).

***Cutaneotrichosporon suis* – egy lipolitikus aktivitással rendelkező új bazídiumos élesztőgomba faj**

A nemrégiben bevezetett *Cutaneotrichosporon* nemzetség (Liu és mtsai, 2015a) a bazídiumos gombák Agaricomycotina altörzsének Trichosporonaceae családjába tartozik. A *Cutaneotrichosporon* nemzetség az egykor *Trichosporon cutaneum*-ként ismert és az azzal közeli rokonságban álló fajokon kívül több, korábban a *Cryptococcus* nemzetségbe sorolt fajt (*Cr. arboriforme*, *Cr. curvatum*, *Cr. cyanovorans*, *Cr. daszewskae*, *Cr. haglerorum*) is magába foglal. Míg a korábbi *Trichosporon* fajok valódi hifát és artrokonídiumot képeznek, a korábban a *Cryptococcus* nemzetségbe sorolt fajok nem képeznek artrokonídiumot, kettő közülük (*Cut. curvatum*, *Cut. cyanovorans*) még valódi hifát sem.

Lejárt szavatossági idejű darált sertéshúsról egy a D1/D2 szekvenciák összehasonlítása alapján a *Cutaneotrichosporon* nemzetségbe tartozó leíratlan fajt képviselő élesztőgomba törzset izoláltunk. A GenBank adatbázisával való összevetés eredményeként egy további, az általunk izolált törzssel azonos D1/D2 szekvenciával rendelkező élesztőgomba törzset találtunk. Ezt a törzset egy franciaországi tejüzem levegőjéből izolálták, és az ITS szekvenciája is megegyezett a Magyarországon darált sertéshúsból izolált törzs megfelelő bázissorrendjével. A DNS szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján a két törzs az ismert fajok közül a *Cut. curvatum*-mal áll a legközelebbi rokonsági kapcsolatban, attól a D1/D2 és az ITS régiókban, sorrendben hat szubsztitúcióval, illetve 11 szubsztitúcióval és három indellel tér el. Ezek az eltérések a széles körben elfogadott útmutatók (Fell és mtsai,

2000; Daniel és mtsai, 2009; Vu és mtsai, 2016) alapján jelzik, hogy a két törzs a *Cut. curvatum*-mal közeli rokonságban álló, de attól eltérő fajt képvisel. Az új fajt típustörzsének eredetére (sertéshús) utalva *Cutaneotrichosporon suis*-ként írtuk le (Péter és mtsai, 2019b). A *Cut. suis*-nak az ITS és D1/D2 régiók bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán elfoglalt helyét a 34. ábra szemlélteti.



34. ábra. A *Cutaneotrichosporon suis* elhelyezkedése az ITS és a rRNS nagy alegységét kódoló gén D1/D2 régiójának bázissorrend elemzése alapján készített filogenetikai törzsfán. A törzsfá a maximális valószínűség (Maximum Likelihood) módszerével készült a Tamura 3-paraméter modellre (Tamura 1992) alapozva. A legnagyobb logaritmikus valószínűségű (log likelihood) törzsfá kerül bemutatásra. Azon törzsfák százalékban kifejezett arányát, amelyeken a társult taxonok egymás mellett helyezkednek el, az ágak mellett feltüntetett értékek jelzik, amennyiben ez az érték 50%-nál nagyobb. Az inszerciókat/deléciókat és hiányzó adatokat tartalmazó pozíciók eltávolításra kerültek. A végső adatbázis 1012 pozíciót tartalmazott. A *Trichosporon ovoides* szolgált kulcsoportként (outgroup). A méretvonal az egy nukleotid pozícióra eső szubsztitúciók számát jelöli.

A *Cut. suis* a *Cut. curvatum*-mal és a *Cut. cyanovorans*-szal képez egy 100%-os statisztikai megbízhatóságú csoportot. Mindhárom fajra jellemző, hogy a nemzetség legtöbb

fajától eltérően, nem képeznek valódi hifát. A *Cut. suis*-szal legközelebbi rokonságban álló *Cut. curvatum* változatos izolálási forrásai közé tartoznak a melegvérű állatokhoz és az emberhez köthető szubsztrátumok, és a faj élelmiszerekkel és élelmiszerromlással is összefüggésbe hozható (Fonseca és mtsai, 2011). A *Cut. suis* két ismert törzse közül az egyik sertéshúsról származik, a másik pedig tejüzem levegőjéből. A tejüzemben is melegvérű állati terméket dolgoznak fel szintén melegvérű emberek, ezért bár csupán két törzse ismert az új fajnak, a melegvérű állatokkal való kapcsolat valószínűsíthető. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a GenBank adatbázisában egy az új fajéval azonos ITS bázissorrenddel rendelkező eukarióta DNS klón szekvenciája is megtalálható, amelynek eredete „egészséges emberi széklet” (Nash és mtsai, 2017), bár a szekvenciák közötti átfedés mindössze 64%. A *Cut. suis* esetleges patogenitására eddig semmi nem utal, és mindkét ismert törzse képtelen szaporodni 35°C hőmérsékleten. Állati eredetű élelmiszereken való előfordulása prognosztizálható, amelyeken zsírbontó képességénél fogva esetleg romlást okozhat.

Új tudományos eredmények

1. **Hatékony, a korábbiaktól eltérő elvi alapon nyugvó, módszert dolgoztunk ki *Saccharomyces* törzsek izolálására szőlőbogyóról (Péter és mtsai, 2011a).** Míg a korábban leírt eljárások szerint a szőlő laboratóriumi körülmények között végzett préselését és az így nyert must spontán erjesztését vagy nagy etanol tartalmú tápközegben történő dúsítását követően izolálják a *Saccharomyces* törzseket, az általunk kidolgozott módszer lényege, hogy 10% (v/v) metanollal kiegészített táplevest alkalmazunk a szőlő dúsítására. A módszer elméleti alapjául az a megfigyelés szolgál, hogy a *Saccharomyces* törzsek az etanolhoz hasonlóan a metanolt is nagyobb koncentrációban tolerálják, mint a szőlőn fellelhető egyéb élesztőgombák többsége. Mivel az ismert *Saccharomyces* fajok, szemben az etanollal, nem képesek a metanolt hasznosítani, nincs elvi lehetőség a metanol koncentráció csökkenésére a dúsító tápközegben a dúsítás során. Az általunk kidolgozott módszer az irodalmi adatokkal való összevetés alapján hatékonyabb a must laboratóriumi körülmények között végrehajtott spontán erjesztésére alapozott módszerekénél.
2. **Új, az élesztőgomba sejteknek vizes fázisba juttatásán alapuló, módszert dolgoztunk ki, és alkalmaztunk eredményesen élesztőgombák olívaolajból történő izolálására, amely az olaj mikrobiológiai minőségének ellenőrzésre is alkalmas lehet (Péter és mtsai, 2017a).** Mivel az olívaolaj minták feldolgozása nehézkes, különösen akkor, ha a kis élesztőgomba szám miatt a minta szűrése válik szükségessé, az olívaolaj azonos mennyiségű steril desztillált vízzel történő kiegészítése és alapos összerázása után centrifugálás segítségével a vizes fázisba juttattuk az élesztőgomba sejteket. A felülúszó eltávolítása és az üledék vizes fázisban történő szuszpendálása után az élesztőgomba sejtek koncentrációjának függvényében hígítást és felületi szélesztést vagy membránszűrést követően tenyésztettük ki az élesztőgombákat az olívaolaj mintákból.
3. **Elsőként alkalmaztunk sikeresen egyedüli szénforrásként hexadekánt tartalmazó, kis (3,5 – 3,6) pH-jú tápközegben történő többlépcsős dúsítást a *Yarrowia* nemzetségbe tartozó élesztőgomba törzsek izolálására (Nagy és mtsai, 2013, Péter és mtsai, 2019a).** Mivel az eddig leírt *Yarrowia* fajok kivétel nélkül asszimilálják a hexadekánt, azon ismert élesztőgombáknak viszont, amelyeknél a hexadekán asszimilációra vonatkozó adat rendelkezésre áll, csak körülbelül 10%-a

rendelkezik ezzel a tulajdonsággal, a *Yarrowia* törzsek izolálásának esélye jelentősen megnő egyedüli szénforrásként hexadekánt tartalmazó tápközegben történő dúsítást követően.

4. **A levelekről származó metilotróf élesztőgombák metanol-tartalmú tápközegben való dúsítása során megfigyeltük, hogy különböző protiszták, elsősorban csillósok, bekebelezik az élesztőgombákat, ezáltal a nagymértékben csökkentik a dúsító tápleves turbiditását (Péter és mtsai, 2007a). A protiszták aktivitását A. Botha (University of Stellenbosh, Department of Microbiology) javaslatát követve, a dúsító tápközeg 200 mg/L chloramphenicolal való kiegészítése segítségével sikeresen szorítottuk vissza a dúsító táplevesben (Péter és mtsai, 2007a), aminek eredményeként levelek esetében 33%-ról 50% fölé emelkedett a sikeres (metanol-asszimiláló élesztőgombát eredményező) dúsítások részaránya.**
5. **Aszkospóra képzés vizsgálatára korábban nem használt tápközégek alkalmazásával néhány esetben (*Yarrowia porcina*/YES agar, *Ogataea pignaliae*/módosított nitrát agar) aszkospóra képzést indukáltunk olyan fajok esetében is, amelyek más táptalajokon nem képeztek aszkospórát (Nagy és mtsai, 2014; Péter és mtsai, 2010).**
6. **A The Yeasts: A Taxonomic Study aktuális (5.) kiadásában leírt módszereket sikeresen módosítottuk az obligát ozmofil élesztőgombák fenotípusos tulajdonságainak vizsgálatára (Čadež és mtsai, 2015). Azoknál a teszteknel, ahol ez lehetséges volt, az alkalmazott cukrok koncentrációját emeltük meg, a szénforrás asszimilációt pedig 50% (m/m) polietilén-glikol 200 (PEG 200) tartalmú tápközegben teszteltük (Čadež és mtsai, 2015).**
7. **Kilenc, a tudomány számára ismeretlen élesztőgombafaj jelenlétét mutattuk ki olívaolajban és olívaolaj üledékben, amelyek közül hatot már új fajként írtunk le. Ezek a következők: *Candida molendinolei*, *C. adriatica* (Čadež és mtsai, 2012), *Ogataea histrianica*, *O. kolombanensis* (Čadež és mtsai, 2013), *Kuraishia mediterranea* (Čadež és mtsai, 2017), *Brettanomyces acidodurans* (Péter és mtsai, 2017a). Fenotípusos tulajdonságaik alapján, előrejelzést adtunk az egyes fajoknak az olívaolaj minőségére gyakorolt hatásáról.**
8. **Elsőként izoláltuk az olajfák korai elhalásában szerepet játszó *Pseudopheomoniella oleae* törzseit a típustörzs eredetétől (hervadó olajfa ág feketére színeződött farésze,**

Olaszország) eltérő szubsztrátumról és földrajzi helyről, Spanyolországból származó olívaolajból (Péter és mtsai, 2017a) és Szlovéniából származó olívaolaj üledékből.

9. Zömében melegvérű állatokból készült élelmiszerekből izolált törzsek alapján négy új, a *Yarrowia*-kládba tartozó élesztőgomba fajt (*C. galli*, *Y. divulgata*, *Y. porcina*, *Y. bubula*) írtunk le (Péter és mtsai, 2004; Nagy és mtsai, 2013, 2014), köztük az első, és eddig egyetlen olyan *Yarrowia* fajt (*Y. porcina*), amelynek aszkospórái tokanyagba ágyazódnak. Kimutattuk, hogy az általunk leírt négy új élesztőgomba faj, a *Y. lipolytica*-hoz hasonlóan, erős lipolitikus és proteolitikus aktivitással rendelkezik, és tirozin tartalmú tápközegben barna pigmentet termel, ezért az élelmiszerek minőségére várhatóan legalább részben hasonló hatást gyakorol, mint a *Y. lipolytica*.
10. Egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó tápközegben való kétlépcsős dúsítást követően nagy hatékonysággal izoláltunk metanol-asszimiláló élesztőgombákat különböző természetes szubsztrátumokból és élelmiszerekből. Az izolátumok között számos korábban ismeretlen faj is szerepelt, amelyek közül 20-at már új fajként írtunk le (Čadež és mtsai, 2013, 2017; Dlauchy és mtsai, 2003; Péter és mtsai 2003, 2005a, 2006, 2007a, 2007b, 2008, 2009a, 2009b, 2010, 2011b).
11. Az egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó tápközegben való kétlépcsős dúsítási eljárás alkalmazásának eredményeként elsőként izoláltunk filloszférából Ascomycota törzsbe tartozó metanol-asszimiláló élesztőgombákat (Péter és mtsai, 2007a).
12. Leírtuk a *Komagataella*-klád második faját, a kiemelkedő biotechnológiai jelentőségű *Komagataella pastoris*-szal közeli rokonságban álló *Pichia* (*Komagataella*) *pseudopastoris*-t. Megfigyeltük, hogy a csersavra érzékeny *Komagataella pseudopastoris*, ellentétben a *K. pastoris*-szal, nem fordul elő a nagy csersavtartalmú tölgyfák (*Quercus* spp.) exudátumában, korhadékában és levelén (Dlauchy és mtsai, 2003).
13. További specifikus összefüggéseket tártunk fel a fa-exudátumokban előforduló metanol-asszimiláló élesztőgombák és a gazdanövények között; az *Ogataea populialbae*-t kizárólag fehér nyár (*Populus alba*) exudátumból izoláltuk, ahol ez a faj volt a leggyakoribb metilotróf élesztőgomba, ugyanakkor a *K. pastoris* egyetlen törzsét sem sikerült fehér nyár exudátumból izolálnunk (Péter és mtsai, 2009b).

14. **Öt új, a *Kuraishia*-kládba tartozó élesztőgomba fajt** (*K. hungarica*, *K. molischiana*, *K. floccosa*, *K. ogatae*, *K. mediterranea*) **írtunk le**, részben külföldi társszerzőkkel, a korábbi nevezéktani szabályoknak megfelelően egy részüket *Candida*-ként (Čadež és mtsai, 2017; Péter és mtsai 2003, 2005a, 2006, 2009a).
15. **Tizennégy új, az *Ogataea*-kládba tartozó fajt** (*C. suzukii*, *O. trehaloabstinens*, *O. pilisensis*, *O. dorogensis*, *O. zsoltii*, *O. thermophila*, *O. allantospora*, *O. nitratoaversa*, *O. populialbae*, *O. pignaliae*, *O. saltuana*, *O. kolombanensis*, *O. histrianica*, *O. deakii*) **írtunk le**, részben külföldi társszerzőkkel, egy részüket a leírás időpontjában általánosan elfogadott nemzetségekhez igazodva, *Pichia*-ként, egy fajt pedig *Candida*-ként (Čadež és mtsai, 2017; Péter és mtsai 2003, 2007a, 2007b, 2008, 2009b, 2010, 2011b).
16. Az *Ogataea allantospora* leírásakor ismert valamennyi *Ogataea* faj kalap (vagy félgömb) alakú aszkospórát képez, amit az akkor érvényes diagnózis is tükrözött. Ezért **javasoltuk az *Ogataea* nemzetség diagnózisának módosítását, hogy a filogenetikai elemzések alapján a nemzetséghez tartozó, allantoid (enyhén hajlott, lekerekített végű) aszkospórát képző *O. allantospora*-t is a nemzetségbe sorolhassuk** (Péter és mtsai, 2007a).
17. Annak ellenére, hogy az *Ogataea* nemzetség számos nitrát-asszimilációra képtelen élesztőgombát tartalmaz, korábbi diagnózisa (Yamada és mtsai, 1994) szerint a „Kálium-nitrátot asszimilálja.” Ezért **javasoltuk az *Ogataea* nemzetség diagnózisának módosítását, hogy a filogenetikai elemzések alapján a nemzetséghez tartozó *O. nitratoaversa*-t is a nemzetségbe sorolhassuk, valamint feloldjuk az ellentmondást a nemzetség diagnózisa és egyes, a nemzetségbe sorolt fajok nitrát-asszimiláló képességének hiánya között** (Péter és mtsai, 2009a).
18. Vegyes virágmézből és méhkenyérből izolált törzsek alapján, *Zygosaccharomyces favi* néven, leírtuk a második (Čadež és mtsai, 2015); aszalt füge készítményből és magányosan élő méhek által készített méhkenyérből izolált törzsek alapján, *Schizosaccharomyces osmophilus* néven, a harmadik ismert obligát ozmofil élesztőgomba fajt (Brysch-Herzberg és mtsai, 2019).
19. Egy új *Metschnikowia* fajt (*M. viticola*) **írtunk le** szőlő bogyóról és dokumentáltuk spórájának kiszabadulását az aszkuszból (Péter és mtsai, 2005b).
20. Rothadó, erjedő rambutánról, *Pichia sporocuriosa* néven, leírtuk az első és eddig egyetlen élesztőgomba fajt, amely gömb alakú, érdes aszkospórát képez,

amelynek felszínén néhol elágazó az askospórákat többszörösen körbefutó, de gyűrűvé nem záródó lebeny található. A *P. membranifaciens*-hez való nagymértékű fenotípusos hasonlósága miatt, a *P. sporocuriosa* gyümölcsökön betöltött szerepe hasonló lehet a *P. membranifaciens*-éhez (Péter és mtsai, 2000).

21. A nemrégiben felállított *Cutaneotrichosporon* nemzetség egy új fajtát, *Cut. suis*, írtuk le egy darált sertéshúsból és egy franciaországi tejüzem levegőjéből származó törzs alapján. A *Cut. suis* mindkét ismert törzse lipolitikus aktivitással rendelkezik, ami hatással lehet az előfordulási forrásukként szolgáló élelmiszerek minőségére (Péter és mtsai, 2019b).

Összefoglalás

A Biológiai Sokféleség Egyezmény 9. Cikkelye értelmében Minden Szerződő Fél „intézkedéseket hoz a biológiai sokféleség komponenseinek *ex-situ* védelmére, lehetőleg azok származási országában;” továbbá „megteremti és fenntartja a növények, állatok és mikroorganizmusok *ex-situ* megőrzésének, valamint kutatásának feltételeit”. A mikroorganizmusok *ex-situ* megőrzésére a mikrobiológiai törzsgyűjtemények hivatottak. A Biológiai Sokféleség Egyezmény célkitűzései közé tartozik a biológiai sokféleség megőrzésén kívül, komponenseinek fenntartható használatának biztosítása is, ami szintén nem képzelhető el a hagyományos, tenyésztési technikákat is alkalmazó törzsgyűjteményi munka nélkül.

Az élesztőgombák a legkorábban házasított szervezetek közé tartoznak. Az emberiség mintegy 5000 éve használja kenyér, sör, bor és egyéb élelmiszerek és italok előállítására ezeket a mikroorganizmusokat. Az élelmiszerek előállítása során betöltött nélkülözhetetlen pozitív szerepük (erjesztett élelmiszerek és italok, élelmiszer-összetevők és adalékok előállítása, biológiai védekezés a romlást okozó mikroorganizmusok ellen, probiotikus és bioterápiás hatás) mellett az élesztőgombák negatív hatást is gyakorolhatnak az élelmiszerekre és azok fogyasztóira (élelmiszerek és italok romlásának előidézése, élesztőgombák mint élelmiszer allergének, és az élelmiszerek élesztőgomba biótája opportunistá patogén élesztőgombák forrása is lehet).

Az ismert élesztőgombák száma jelenleg közel 2 000-re becsülhető, ami feltételezhetően az összes létező élesztőgomba fajnak csak néhány százalékát teszi ki, tehát a fajok túlnyomó többsége meg leírásra vár. A második évezred végére jöttek létre a korábban elképzelhetetlen megbízhatóságú és gyorsaságú, DNS bázissorrendek összehasonlításán alapuló, élesztőgomba rendszertani azonosítás feltételei. A DNS bázissorrend alapú azonosítási technika igen gyorsan elterjedt, és széles körű alkalmazásra talált, elősegítve az élesztőgombák diverzitásának feltárását és az új fajok felismerését.

A Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (MIMNG) évtizedek óta jelentős szerepet játszik a hazai mikrobiális génállomány megőrzésében. A MIMNG kutatási tevékenységében kiemelt helyet tölt be az élesztőgombák biodiverzitásának és rendszertanának vizsgálata. Kutatásainknak nagy lökést adott a DNS alapú rendszertani azonosítás elérhetővé válása. Ennek a munkának az élelmiszerekkel kapcsolatos fontosabb eredményeit mutatom be az értekezésben.

Az általánosan alkalmazott izolálási eljárások mellett, különböző szelektív, gyakran a megcélzott élesztőgomba csoport fiziológiai tulajdonságai alapján megválasztott dúsításos lépést is magába foglaló, izolálási módszereket is alkalmaztunk. A dúsításos eljárások lehetővé tették az egyes élesztőgomba közösségek kis számarányú komponenseinek az izolálását is, amelyek egyszerű tenyésztési módszerek alkalmazása esetén általában észrevétlenek maradnak.

Szelektív, dúsításos eljárásokat alkalmaztunk *Saccharomyces*-ek izolálására szőlőről, *Yarrowia* törzsek izolálására húsról, tejből és tejtermékekből, valamint metanol-asszimilációra képes élesztőgombák izolálására különböző szubsztrátumokból. Új eljárást dolgoztunk ki az élesztőgombák olívaolajból történő izolálására. A fenti módszerek részben a korábban alkalmazott eljárásoktól eltérő elvi megfontolásokra épülnek. A célirányos izolálási módszereknek és az élesztőgomba törzsek DNS alapú rendszertani azonosításának alkalmazása számos érdekes eredményt hozott. A fenti módszereket alkalmazva az egyes élőhelyek élesztőgomba közösségeinek olyan összetevőit is izoláltuk, amelyek pusztán hagyományos módszerek alkalmazásával rejtve maradtak volna.

A *Saccharomyces* törzsek szőlőről történő kitenyésztéséhez 10% metanollal kiegészített táplevesben dúsítottuk a mintákat, mivel az ismert *Saccharomyces* fajok nem képesek a metanolt hasznosítani, és nagyobb metanol tartalmú tápközegben képesek szaporodni, mint a szőlőn előforduló élesztőgombák többsége. A módszer, bár nem teljesen szelektív a *Saccharomyces*-ekre nézve, hatékonynak bizonyult, mivel a vizsgált 18 minta közül 16 mintából sikerült egy vagy több *Saccharomyces* törzset izolálni. Az esetek zömében mintánként több eltérő fenotípussal rendelkező törzset izoláltunk. A két minta, amelyekről nem sikerült *Saccharomyces*-t izolálni, több mint három héttel a szüret időpontja előtt került begyűjtésre.

A *Yarrowia* törzsek izolálásának a hatékonyságát egyedüli szénforrásként hexadekánt tartalmazó tápközegben való többlépcsős dúsítás alkalmazásával növeltük, mivel valamennyi eddig leírt *Yarrowia* faj képes hasznosítani a hexadekánt, viszont az ismert élesztőgomba fajoknak csak mintegy 10%-a képes asszimilálni ezt a szénforrást. A dúsításos módszer alkalmazását követően számos új, a tudomány számára ismeretlen *Yarrowia* faj jelenlétét is feltártuk, még olyan viszonylag behatóan vizsgált élelmiszereken is, mint pl. a hús. Összességében eddig négy új, a *Yarrowia*-kládba tartozó élesztőgomba fajt (*C. galli*, *Y. divulgata*, *Y. porcina*, *Y. bubula*) írtunk le.

Az évezredek óta fogyasztott olívaolajról csak nemrégiben derült ki, hogy mikroorganizmusok, köztük élesztőgombák élőhelye. Részben az általunk kidolgozott új izolálási módszernek köszönhetően jelentős mértékben hozzájárultunk az olívaolajban található élesztőgomba közösségek faji összetételének feltárásához. Az élesztőgombák olívaolajból történő izolálásának megkönnyítésére centrifugálás segítségével az élesztőgomba sejteket az olajból a vizes fázisba juttattuk, majd az olaj eltávolítása után a vizes fázisban szuszpendált élesztőgombákat tenyésztettük ki a sejtkoncentráció függvényében megválasztott módszer segítségével. Többek között kilenc korábban ismeretlen élesztőgomba faj törzseit is izoláltunk olívaolajból, ill. olívaolaj üledékből, melyek közül hatot (*Candida molendinolei*, *C. adriatica*, *Ogataea histrianica*, *O. kolombanensis*, *Kuraishia mediterranea*, *Brettanomyces acidodurans*) már új fajként írtunk le.

Az egyedüli szénforrásként metanolt tartalmazó tápközeg felhasználásán alapuló szelektív dúsítási eljárásnak köszönhetően nagyszámú metanol-asszimiláló élesztőgombát, köztük több leíratlan faj törzseit izoláltuk különböző szubsztrátumokról. Számos fa exudátum, korhadt fa és levél mintán vizsgáltuk a metanol-asszimiláló élesztőgombák jelenlétét. Összességében 560 mintáról 376 metilotróf élesztőgombát izoláltunk. Elsőként számoltunk be Ascomycota törzsbe tartozó metilotróf élesztőgombák filloszférában való előfordulásáról. A dúsítási módszer hatékonyságának köszönhetően, a jelenleg ismert 92 metilotróf élesztőgomba közül kutatócsoportunk 20 leírásában vett részt. A vonalkód DNS szekvenciák filogenetikai elemzéseinek eredményeire támaszkodva két ízben javasoltuk a metanol-asszimiláló élesztőgombák többségét jelenleg magába foglaló *Ogataea* nemzetség diagnózisának módosítását, hogy a nitrát asszimilációra képtelen és az allantoid alakú aszkospórát képző élesztőgombák is a nemzetségbe sorolhatók legyenek.

Új élelmiszer eredetű vagy részben élelmiszer eredetű élesztőgomba fajokat írtunk le a *Zygosaccharomyces*, a *Schizosaccharomyces*, a *Metschnikowia*, a *Pichia* és a *Cutaneotrichosporon* nemzetségekben. A *Z. favi* és a *Sch. osmophilus* a második és harmadik ismert obligát ozmofil élesztőgomba faj, a *P. sporocuriosa* pedig egyedülálló spóra ornamentációjával tűnik ki az élesztőgombák közül. A két obligát ozmofil élesztőgomba faj fenotípusos tulajdonságainak vizsgálata céljából módosítottuk az élesztőgombák fenotípusos vizsgálatára használatos módszereket.

Amennyiben lehetséges volt, fenotípusos tulajdonságaik valamint a szakirodalomban publikált adatok alapján előrejelzést adtunk az általunk leírt új élesztőgomba fajok

élelmiszerek minőségére gyakorolt lehetséges hatásairól, ill. potenciális élelmiszeripari alkalmazási lehetőségeiről.

A munkánk során felhalmozódott élesztőgomba törzsek kiválasztott képviselőit a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményének nyilvános részében (<http://ncaim.hu/>) helyeztük el, ezzel biztosítva, hogy további kutatások céljára hozzáférhetőek legyenek.

Summary

According to Article 9 of the Convention on Biological Diversity each contracting party shall “adopt measures for the *ex-situ* conservation of components of biological diversity, preferably in the country of origin of such components;” furthermore „establish and maintain facilities for *ex-situ* conservation of and research on plants, animals and microorganisms.” The *ex-situ* conservation of the microorganisms is the task of microbial culture collections. In addition to the conservation of biological diversity, the objectives of the Convention on Biological Diversity include the sustainable use of the components of biological diversity, which is not feasible without the support of culture collections applying also traditional cultivation techniques.

Yeasts are among the earliest domesticated organisms. The utilisation of these microorganisms by the humans for the production of bread, beer, wine and other foods and drinks started some 5 000 years ago. In addition to their indispensable positive role (production of fermented foods and beverages, ingredients and additives for food processing, biocontrol of spoilage microorganisms, probiotic and biotherapeutic effect) in food production, yeasts may also exert adverse effects (they may spoil foods and beverages, act as food allergens or serve as a source of opportunistic pathogenic yeasts) on foods and their consumers.

The number of known yeast species can be estimated to be about 2 000, which probably represents only a few percentage of all existing yeast species; and this means that the majority of yeast species are still waiting for description. The conditions necessary for the unprecedentedly reliable and rapid, DNA sequence-based yeast identification have been created by the end of the second millennium. Yeast identification based on DNA sequence comparisons has spread very quickly and has gained widespread application, facilitating the exploration of yeast diversity and revealing novel yeast species.

The National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) has taken a significant role in the preservation of the Hungarian microbial gene pool for several decades. The investigation of yeast biodiversity and systematics accounts for an important part in the research activity of NCAIM. Our research has been boosted by the availability of the DNA-based identification technique. Some important results related to foods are presented in the dissertation.

In addition to the generally applied isolation procedures, different selective isolation methods were applied, which often included an enrichment step developed on the basis of the physiological characteristics of the targeted group of yeasts. The application of the enrichment methods allowed the isolation of minor components of each yeast community, which generally remained undetected if simple culture techniques were applied.

Selective enrichment procedures were used for the isolation of *Saccharomyces* from grapes, *Yarrowia* from meat, milk and dairy products, and methanol-assimilating yeasts from different substrates. A new procedure was developed for the isolation of yeasts from olive oil. The above-noted methods are partly based on theoretical considerations differing from the theory behind the earlier applied methods. The application of targeted isolation methods and DNA-based identification led to several significant results. With the application of the above-noted methods, components of yeast communities populating those habitats were isolated which otherwise would have remained unnoticed by the application of traditional methods.

For the isolation of *Saccharomyces* from grapes, grape samples were processed by enrichment in a nutritive basal medium supplemented with 10% (v/v) methanol, as known *Saccharomyces* species are unable to utilise this compound as a carbon source and are able to grow with higher concentration of methanol than the majority of yeasts occurring on grapes. Although not fully selective, the method proved to be effective for the isolation of *Saccharomyces* from grapes, as its application resulted in the isolation of one or several *Saccharomyces* strains in 16 cases of the investigated 18 grape samples. In most cases several strains with different phenotypes were recovered per sample. The two samples which yielded no *Saccharomyces* strains were collected more than three weeks before vintage.

The efficiency of the isolation of *Yarrowia* strains was improved by the application of a two- or three-step enrichment procedure in a medium containing hexadecane as the sole carbon source. The rationale of using hexadecane in the enrichment medium was that while all known *Yarrowia* species are able to utilise hexadecane, only about 10% of the known yeast species are able to grow with this compound as a sole carbon source. Following the application of this enrichment procedure strains of several undescribed *Yarrowia* species were recovered even from well-studied sources like e.g. meat. Taken together, until now, we described four novel species (*C. galli*, *Y. divulgata*, *Y. porcina*, *Y. bubula*) in the *Yarrowia*-clade.

It has been revealed just recently that olive oil, consumed for millennia, may also serve as a habitat of microorganisms, including yeasts. Partly as a result of the application of a

new method developed for the isolation of yeasts from olive oil, we made significant contribution to the exploration of olive oil as a yeast habitat. In order to facilitate the isolation of yeasts from olive oil, after adding sterile water to the sample and vigorous shaking, the yeast cells were transferred to the water phase by centrifugation. Following the removal of the oil and vortexing, the remaining water phase was serially diluted and surface plated or filtrated depending the concentration of the yeast cells. Among other yeasts, yeast strains representing nine undescribed yeast species were recovered from olive oil and from olive oil sediment. Six of the revealed novel species (*Candida molendinolei*, *C. adriatica*, *Ogataea histrianica*, *O. kolombanensis*, *Kuraishia mediterranea*, *Brettanomyces acidodurans*) were already described.

Following the application of a selective enrichment in a medium containing methanol as a sole carbon source we isolated numerous methanol-assimilating yeasts, including strains of several undescribed species, from diverse substrates. Tree exudates, rotten wood and leaves were the most frequently investigated substrates. Altogether 376 methylotrophic yeast strains were isolated from 560 tree exudate, rotten wood and leaf samples. We published the first report on the occurrence of ascomycetous methylotrophic yeasts in the phyllosphere. Due to the effectiveness of the above-noted enrichment method, we contributed to the description of 20 of the currently known 92 methylotrophic yeast species. Considering the phylogenetic placements of two novel species, based on the analyses of the barcoding DNA sequences we proposed the emendation of the diagnosis of *Ogataea* which is currently the biggest genus of methanol-assimilating yeasts. The emendations allowed us to assign to the genus the phylogenetically related *O. nitratoaversa* and *O. allantospora*, which are unable to assimilate nitrate and form allantoid ascospores, respectively.

We described some new food-borne or partly food-borne yeast species assigned to the following genera: *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* and *Cutaneotrichosporon*. *Zygosaccharomyces favi* and *Sch. osmophilus* represent the second and the third obligate osmophilic yeast species, while *Pichia sporocuriosa* is distinguished from all known yeast species by its unique ascospore ornamentation. In order to carry out the phenotypic characterization of the two obligate osmophilic yeast species some of the commonly used methods for the phenotypic characterization of yeast species were modified.

Whenever it was possible based on the phenotypic characters of the newly described yeast species and the data found in the literature an estimation was provided on their possible effect on the quality of foods and their potential application in the food industry.

Selected representatives of the yeast strains accumulated during our studies have been deposited in the public collection of the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (<http://ncaim.hu/>), ensuring their availability for further research.

Irodalomjegyzék

- Abbas CA (2006) Production of antioxidants, aromas, colours, flavours and vitamins by yeasts. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) Yeasts in Food and Beverages. Springer-Verlag. Berlin. pp: 285-334
- Abdel-Sater MA, Moubasher AAH, Soliman Z (2016) Identification of three yeast species using the conventional and internal transcribed spacer region sequencing methods as first or second global record from human superficial infections. *Mycoses* 59: 652-661
- Airola K, Petman L, Mäkinen-Kiljunen S (2006) Clustered sensitivity to fungi: anaphylactic reactions caused by ingestive allergy to yeasts. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 97: 294–297
- Aldhous P (1990) Genetic engineering. Modified yeast fine for food. *Nature* 344: 186
- Anand JC, Brown AD (1968) Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* 52: 205–212
- Angerosa F, d'Alessandro N, Konstantinou P, Di Giacinto L (1995) GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1802-1807
- Angerosa F, Lanza B, Marsilio V (1996) Biogenesis of „fusty” defect in virgin olive oils. *Grasas Aceites* 47: 142–150
- Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F (2011) *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. *Curr. Microbiol.* 62: 990–998
- Bagheri B, Bauer FF, Setati ME (2017) The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.01988
- Banani H, Spadaro D, Zhang D, Matic S, Garibaldi A, Gullino ML (2015) Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. *Int. J. Food Microbiol.* 199: 54–61
- Bar-Meir M, Sutton DA, Wickes B, Kurtzman CP, Goldman S, Zheng X (2006) Catheter-related fungemia due to *Candida thermophila*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3035–3036
- Barnett JA (2004) A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* 21: 1141-1193
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1990) Yeasts, characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge
- Batra LR (1973) Nematosporaceae (Hemiascomycetidae): taxonomy, pathogenicity, distribution and vector relations. Tech. Bull. No. 1469, ARS, US Department of Agriculture, Washington, DC, pp 71.
- Belda I, Ruiz J, Esteban-Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A, Moreno-Arribas MV (2017) Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules* 22: doi:10.3390
- Bernhardt H, Knoke M (1997) Mycological aspects of gastrointestinal microflora. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222: 102-106.
- Biológiai Sokféleség Egyezmény (1992) Rio de Janeiro magyar nyelvű szövege. 1995. évi LXXXI. Törvény a Biológiai Sokféleség Egyezmény kihirdetéséről
- Bigey F, Tuery K, Bougard D, Nicaud JM, Moulin G (2003) Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. *Yeast* 20: 233–248
- Blackwell M (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98: 426-438

- Booth JL, Vishniac HS (1987) Urease testing and yeast taxonomy. *Can. J. Microbiol.* 33:396-404
- Boundy-Mills KL, Glantschnig E, Roberts IN, Yurkov A, Casaregola S, Daniel HM, Groenewald M, Turchetti B (2016) Yeast culture collections in the twenty-first century: new opportunities and challenges. *Yeast* 33: 243-260
- Brysch-Herzberg M, Tóbiás A, Seidel M, Wittmann R, Wohlmann E, Fischer R, Dlačhy D, Péter G (2019) *Schizosaccharomyces osmophilus* sp. nov., an osmophilic fission yeast occurring in bee bread of different solitary bee species. *FEMS Yeast Res.* 19: doi: 10.1093/femsyr/foz038
- Buckland G, Gonzalez CA (2010) Trends in olive oil production, supply and consumption in Mediterranean countries from 1961 to the present day. In: Preedy VR, Watson RR (szerk.) *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Elsevier. pp: 689–698
- Čadež N, Raspor P, Turchetti B, Cardinali G, Ciafardini G, Veneziani G, Péter G (2012) *Candida adriatica* sp. nov. and *Candida molendinolei* sp. nov., two yeast species isolated from olive oil and its by-products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2296-302
- Čadež N, Dlačhy D, Raspor P, Péter G (2013) *Ogataea kolombanensis* sp. nov., *Ogataea histrianica* sp. nov. and *Ogataea deakii* sp. nov., three novel yeast species from plant sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3115–3123
- Čadež N, Fülöp L, Dlačhy D, Péter G (2015) *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *A. van Leeuw. J. Microb.* 107: 645–654
- Čadež N, Dlačhy D, Tóbiás A, Péter G (2017) *Kuraishia mediterranea* sp. nov., a methanol-assimilating yeast species from olive oil and its sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 4846-4850
- Carreira A, Loureiro V (1998): A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* within 24 hours. *J. Food Mycol.* 1: 3-12
- Carreira A, Ferreira LM, Loureiro V (2001) Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3463–3468
- Cavaliere D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R & Polsinelli M (2003): Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* 57: S226–S232
- Cayuela JA, Gómez-Coca RB, Moreda W, Pérez-Camino MC (2015) Sensory defects of virgin olive oil from a microbiological perspective. *Trends Food Sci. Tech.* 43: 227–235
- Chang CF, Liu YR, Chen SF, Naumov GI, Naumova ES, Lee CF (2012) Five novel species of the anamorphic genus *Candida* in the *Cyberlindnera* clade isolated from natural substrates in Taiwan. *A. van Leeuw. J. Microb.* 102: 9–21
- Chang CF, Chen CC, Lee CF, Liu SM (2013) Identifying and characterizing *Yarrowia keelungensis* sp. nov., an oildegrading yeast isolated from the sea surface microlayer. *A. van Leeuw. J. Microb.* 104: 1117-1123
- Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A (2008) Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145: 5-26
- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT (2000) Identification of medically important yeasts using PCR based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2302–2310

- Christensen WB (1946) Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bacteriol. 52: 461-466
- Ciafardini G, Zullo BA (1998) Inhibitory activity of the oil-mill waste water on *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium hedysarii* in the soil. Advances in Food Sciences 20: 89-93
- Ciafardini G, Zullo BA (2002a) Microbiological activity in stored olive oil. Int. J. Food. Microbiol. 75: 111–118
- Ciafardini G, Zullo BA (2002b) Survival of micro-organisms in extra virgin olive oil during storage. Food Microbiol. 19: 105-109
- Ciafardini G, Zullo BA (2015) Effect of lipolytic activity of *Candida adriatica*, *Candida diddensiae* and *Yamadazyma terventina* on the acidity of extra-virgin olive oil with a different polyphenol and water content. Food. Microbiol. 47: 12-20
- Ciafardini G, Zullo BA (2018) Virgin olive oil yeasts: A review. Food. Microbiol. 70: 245-253
- Ciafardini G, Marsilio V, Lanza B, Pozzi N (1994). Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. Appl. Env. Microbiol. 60: 4142-4147
- Ciafardini G, Zullo BA, Iride A (2006a) Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. Food. Microbiol. 23: 60–67
- Ciafardini G, Zullo BA, Cioccia G, Iride A (2006b) Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. Int. J. Food. Microbiol. 107: 27–32
- Ciafardini G, Zullo BA, Antonielli L, Corte L, Roscini L, Cardinali G (2013) *Yamadazyma terventina* sp. nov., a yeast species of the *Yamadazyma* clade from Italian olive oils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 372–376
- Ciafardini G, Cioccia G, Zullo BA (2017) Taggiasca extra virgin olive oil colonization by yeasts during the extraction process. Food. Microbiol. 62: 58-61
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol. 9: 1657–1660
- Coelho MAZ, Amaral PFF, Belo I (2010) *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: Méndez-Vilas A (szerk.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex Research Center, Spain. pp: 930–944
- Conklin TM (2012) Investigations of small hive beetle-yeast associations. Ph.D. thesis, The Pennsylvania State University, The Graduate School College of Agricultural Sciences
- Cook PE (1995) Fungal ripened meats and meat products. In: Campbell-Platt G, Cook PE (szerk.) Fermented Meats. Springer. Boston. MA. pp: 110-129
- Cooper CR, Jr. (2011) Yeasts pathogenic to humans. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 9-19
- Corpe WA, Rheem S (1989) Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. FEMS Microbiol. Ecol. 62: 243-250
- Crous PW, Wingfield MJ, Guarro, J *et al.* (2015) Fungal Planet description sheets: 320-370. Persoonia 34: 167 – 266
- Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI *et al.* (2017) Fungal Planet description sheets: 625–715. Persoonia 39: 270 – 467
- Daniel HM, Vrancken G, Takrama JF, Camu N, De Vos P, De Vuyst L (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. FEMS Yeast Res. 9: 774–783

- Daniel HM, Lachance MA, Kurtzman CP (2014) On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *A. van Leeuw. J. Microb.* 106: 67–84
- Davenport RR (1996) Forensic microbiology for soft drinks business. *Soft Drinks Int.* April: 34–35
- Davenport RR (1997) Forensic microbiology II. Case book investigations. *Soft Drinks Int.* April: 26–30
- Deák T (1998) Élesztőgombák. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- Deák T (2008a) Handbook of Food Spoilage Yeasts, 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Deák T (2008b) Detection and enumeration. Handbook of Food Spoilage Yeasts, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. pp: 203–220
- Deák T, Beuchat LR (1996) Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton.
- de Koning W, Harder W (1992) Methanol-utilizing yeasts. In: Murell JC, Dalton H (szerk.) Methane and Methanol Utilizers. Plenum Press. New York. pp. 207–244
- Dequin S (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 577–588
- Dlauchy D, Tornai-Lehoczki J, Péter G (1999): Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 445–453
- Dlauchy D, Tornai-Lehoczki J, Fülöp L, Péter G (2003): *Pichia (Komagataella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. *A. van Leeuw. J. Microb.* 83: 327–332
- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Tec.* 52: 137–145
- Duan X, Gao J, Zhou YJ (2018) Advances in engineering methylotrophic yeast for biosynthesis of valuable chemicals from methanol. *Chin. Chem. Lett.* 29:681–686
- Dufour J, Verstrepen K, Derdelinckx G (2003) Brewing yeasts. In: Boekhout T, Robert V (szerk.) Yeasts in Food. Woodhead Publishing. Cambridge. pp: 347–388
- Encinas JP, López-Díaz TM, García-López ML, Otero A, Moreno B (2000) Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54: 203–208
- Englezos V, Rantsiou K, Torchio F, Rolle L, Gerbi V, Cocolin L (2015) Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* 199: 33–40
- Fakas S, Kefalogianni I, Makri A, Tsoumpeli G, Rouni G, Gardeli C, Papanikolaou S, Aggelis G (2010) Characterization of olive fruit microflora and its effect on olive oil volatile compounds biogenesis. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 112: 1024–1032
- Fall R, Benson AA (1996) Leaf methanol – the simplest natural product from plants. *Trends Plant Sci.* 1: 296–301
- Fehér C (2018) Novel approaches for biotechnological production and application of L-arabinose. *J. Carbohydr. Chem.* doi: 10.1080/07328303.2018.1491049
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca Á, Scorzetti G, Statzell-Tallman A (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1351–1372
- Fernández-Espinar MT, López V, Ramón D, Bartra E, Querol A (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 1–10

- Fiori S, Fadda A, Giobbe S, Berardi E, Migheli Q (2008) *Pichia angusta* is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola*. FEMS Yeast Res. 8: 961-963
- Flannigan B, Campbell I (1977) Pre-harvest mould and yeast floras on the flag leaf, bracts and caryopsis of wheat. Trans. Br. Mycol. Soc. 69: 485-494
- Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. Int. J. Food Microbiol. 86: 11-22
- Fleet GH (2006) The commercial and community significans of yeasts in food and beverage production. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) Yeasts in Food and Beverages. Springer-Verlag. Berlin. pp: 1-12
- Fleet GH (2008) Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res. 8: 979-995
- Fleet GH & Heard GM (1993) Yeasts - growth during fermentation. In: Fleet GH (szerk.) Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Switzerland pp: 27-54
- Fleet GH and Balia R (2006) The public health and probiotic significans of yeasts in foods and beverages. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) Yeasts in Food and Beverages. Springer-Verlag. Berlin. pp: 381-397
- Fleet GH, Prakitchaiwattana C, Beh AL & Heard G (2002) The yeast ecology of wine grapes. - In: Ciani M (szerk.) Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts. Research Signpost. Kerala. pp: 1-17
- Fonseca Á, Scorzetti G, Fell JW (2000) Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. Can. J. Microbiol. 46: 7-27
- Fonseca Á, Boekhout T, Fell JW (2011) *Cryptococcus* Vuillemin (1901) In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 1661-1737
- Frega N, Mozzon M, Lercker G (1999) Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 76: 325-329
- Fleming HP, Walter WM, Jr., Etchells J L (1973) Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. Appl. Microbiol. 26: 777-782
- Gaensly F, Picheth G, Brand D, Bonfim TMB (2014) The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Braz. J. Microbiol. 45: 491-494
- Galán-Sánchez F, García-Agudo L, García-Martos P, Rodríguez-Iglesias M (2014) *Candida galli* as a cause of tinea unguium—molecular characterization of a rare clinical fungal entity. Mycopathologia 178: 303-306
- Gasser B, Mattanovich D (2018) A yeast for all seasons - Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? FEMS Microbiol. Lett. 365 (17). doi: 10.1093/femsle/fny181
- Gaillardin C, Neuvéglise C, Kerscher S, Nicaud JM (2012) Mitochondrial genomes of yeasts of the *Yarrowia* clade. FEMS Yeast Res. 12: 317-331
- Geier M, Fauland P, Voglb T, Glieder A (2015) Compact multi-enzyme pathways in *P. pastoris*. Chem. Commun. 51: 1643-1646
- Gillam M (1979) Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. Apidologie 10: 43-53
- Giobbe S, Marceddu S, Scherm B, Zara G, Mazzarello VL, Budroni M, Migheli Q (2007) The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. FEMS Yeast Res. 7: 1389-1398
- Globe Newswire (2017. Szept. 05) <https://globenewswire.com/news-release/2017/09/05/1107544/0/en/Global-Yeasts-Yeast-Extracts-Autolysates-and-Related-Products-Market-2016-2022.html>

- Gardini F, Suzzi G, Lombardi A, Galgano F, Crudele MA, Andrighetto C, Schirone M, Tofalo R (2001) A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res.* 1: 161-167
- Glushakova AM, Maximova IA, Kachalkin AV, Yurkov AM (2010) *Ogataea cecidiorum* sp. nov., a methanol-assimilating yeast isolated from galls on willow leaves. *A. van Leeuw. J. Microb.* 98: 93-101
- Gordon JL, Wolfe KH (2008) Recent allopolyploid origin of *Zygosaccharomyces rouxii* strain ATCC 42981. *Yeast* 25:449–456
- Gourama H, Letutour B, Tantaoui-Elaraki A, Benbya M, Bullerman LB (1989) Effects of oleuropein, tyrosol and caffeic acid on the growth of mould isolated from olives. *J. Food Prot.* 52: 264-266
- Groenewald M, Smith MTh (2013) The teleomorph state of *Candida deformans* Langeron & Guerra and description of *Yarrowia yakushimensis* comb. nov. *A. van Leeuw. J. Microb.* 103: 1023–1028
- Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijck PWM & Wyss M (2013). *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* 40: 187-206
- Guillamón JM, Barrio E (2017) Genetic polymorphism in wine yeasts: mechanisms and methods for its detection. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.00806
- Halász A, Lásztity R (1991) *Use of Yeast Biomass in Food Production*. CRC Press; Boca Raton, FL.
- Halász A, Baráth Á, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Tech.* 5: 42-49
- Hansen J and Piskur J (2003) Fungi in brewing: biodiversity and biotechnology perspectives. In: DK Arora (szerk.) *Handbook of Fungal Biotechnology*. Dekker. New York. pp. 233–248
- Harrington TC and Rizzo DM (1999) Defining species in the fungi. In: Worrall JJ, (szerk.) *Structure and Dynamics of Fungal Populations*, Kluwer Academic, Dordrecht. pp: 43–70
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. (1985) Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174
- Hathway DE (1958) Oak-bark tannins. *Biochem. J.* 70: 34–42
- Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432
- Hawksworth DL (2011) A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *MycKeys* 1: 7–20
- Hawksworth DL, Lücking R (2017) Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum* 5: FUNK-0052-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA *et al.* (2011) The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. *IMA Fungus* 2: 105–112
- Helston RM, Box JA, Tang W, Baumann P (2010) *Schizosaccharomyces cryophilus* sp.nov., a new species of fission yeast. *FEMS Yeast Res.* 10: 779–786
- Hernández A, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, Serradilla MJ, Villalobos MC, Martín A, Córdoba MG (2018) Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *Int. J. Food Microbiol.* 286: 98-110

- Hittinger CT, Rokas A, Bai FY, Boekhout T, Gonçalves P, Jeffries TW, Kominek J, Lachance MA, Libkind D, Rosa CA, Sampaio JP, Kurtzman CP (2015) Genomics and the making of yeast biodiversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35:100-109
- Hittinger CT, Steele JL, Ryder DS (2018) Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49: 199-206
- Iacumin L, Manzano M, Andyanto D, Comi G (2017) Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production. *Food Microbiol.* 62: 188-195
- Ismail SAS, Deák T, Abd El-Rahman HA, Yassien MAM, Beuchat LR (2000) Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 113–121
- Jakobsen M és Narvhus J (1996) Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.* 6: 755-768
- James SA, Stratford M (2011) *Zygosaccharomyces* Barker (1901) In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 937-947
- Janisiewicz WJ, Korsten L (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 411-441
- Jayawardena RS, Purahong W, Zhang W, Wubet T, Li XH, Liu M, Zhao W, Hyde KD, Liu JH, Yan J (2018) Biodiversity of fungi on *Vitis vinifera* L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches. *Fungal Divers.* 90:1–84
- Jiménez A, Guillén R, Fernández-Bolaños J, Heredia A. (1994) Cell wall composition of olives. *J. Food Sci.* 59: 1192–1196
- Johnson EA (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts - the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 503-517
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 36: 5–9
- Juven B, Henis Y (1970) Studies on the antimicrobial activity of olive phenolic compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 721-732
- Kabisch J, Erl-Höning C, Wenning M, Böhnlein C, Gareis M, Pichner R (2016) Spoilage of vacuum-packed beef by the yeast *Kazachstania psychrophila*. *Food Microbiol.* 53: 15-23
- Kaewwichian R, Limtong S (2014) *Nakazawaea siamensis* f.a., sp. nov., a yeast species isolated from phylloplane. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 266–270
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. CABI, Wallingford, UK. pp: 784
- Kelesidis T, Pothoulakis C (2012) Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther. Adv. Gastroenter.* 5: 111–125
- Koh TY (1975) The isolation of obligate osmophilic mutants of the yeast *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 88: 184–188
- Koidis A, Triantafyllou E, Boskou D (2008) Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 110: 164–171
- Koowadjanakul N, Jindamorakot S, Yongmanitchai W, Limtong S (2011) *Ogataea phyllophila* sp. nov., *Candida chumphonensis* sp. nov. and *Candida matranensis* sp.

- nov., three methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand. A. van Leeuw. J. Microb. 100: 207–217
- Kortekangas-Savolainen O, Savolainen J, Einarsson R (1993) Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study. Clin. Exp. Allergy, 23: 587–590
- Knutsen AK, Robert V, Poot GA, Epping W, Figge M, Holst-Jensen, A, Skaar I, Smith MTh (2007). Polyphasic reexamination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2426–2435
- Kreger-van Rij NJW (1984) (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 3rd ed. Elsevier. Amsterdam.
- Kurtzman CP (2000) Three new ascomycetous yeasts from insect associated arboreal habitats. Can. J. Microbiol. 46: 50–58
- Kurtzman CP (2005a) New species and a new combination in the *Hyphopichia* and *Yarrowia* yeast clades. A. van Leeuw. J. Microb. 88: 121–130
- Kurtzman CP (2005b) Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 973–976
- Kurtzman CP (2009) Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 1435–1438
- Kurtzman CP (2010) Description of new yeast species – is one strain enough? The Bulletin of BISMIS 1: 17–24
- Kurtzman CP (2011a) *Nakazawaea* Y. Yamada, Maeda & Mikata (1994). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 637–639
- Kurtzman CP (2011b) *Lindnera* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 521–543
- Kurtzman CP (2011c) *Yarrowia* van der Walt & von Arx (1980). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 927–929
- Kurtzman CP (2011d) *Ogataea* Y. Yamada, K. Maeda & Mikata (1994). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 645–671
- Kurtzman CP (2011e) *Pichia* E.C. Hansen (1904). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 685–707
- Kurtzman CP, Boekhout T (2017) Yeasts as Distinct Life Forms of Fungi. In: Buzzini P, Lachance MA, Yurkov A. (szerk.) Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Springer, Cham. pp: 1–37
- Kurtzman CP, de Hoog GS (2011) *Eremothecium* Borzi emend. Kurtzman (1995). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 405–412
- Kurtzman CP, Droby S (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. Syst. Appl. Microbiol. 24: 395–399
- Kurtzman CP and Fell JW (szerk.) (1998) The Yeasts: A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier Science, B.V. Amsterdam.
- Kurtzman CP and Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. A. van Leeuw. J. Microb. 73: 331–371

- Kurtzman CP and Robnett CJ (2010) Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the Saccharomycetales. FEMS Yeast Res. 10: 353-361
- Kurtzman CP and Robnett CJ (2013) Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species. FEMS Yeast Res. 13: 23–33
- Kurtzman CP and Robnett CJ (2014a) Three new anascosporic genera of the Saccharomycotina: *Danielozyma* gen. nov., *Deakozyma* gen. nov. and *Middelhovenomyces* gen. nov. A. van Leeuw. J. Microb. 105: 933-942
- Kurtzman CP, Robnett CJ (2014b) Description of *Kuraishia piskuri* f.a., sp. nov., a new methanol assimilating yeast and transfer of phylogenetically related *Candida* species to the genera *Kuraishia* and *Nakazawaea* as new combinations. FEMS Yeast Res. 14:1028-1036
- Kurtzman CP, Suzuki M (2010) Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. Mycoscience 51: 2-14
- Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E (2008) Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. FEMS Yeast Res. 8: 939–954
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) (2011a) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam.
- Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T. (2011b) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 3-5
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T and Robert V (2011c) Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 87-110
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T and Robert V (2011d) Preface. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. p: xiii
- Kurtzman CP, Mateo RQ, Kolecka A, Theelen B, Robert V, Boekhout T (2015) Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. FEMS Yeast Research doi: 10.1093/femsyr/fov050
- Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar E, Ward TJ (2018) Four new species of *Metschnikowia* and the transfer of seven *Candida* species to *Metschnikowia* and *Clavispora* as new combinations. A. van Leeuw. J. Microb. 111: 2017–2035
- Lachance MA (2011) *Metschnikowia* Kamienski (1899). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 575-620
- Lachance MA (2012) In defense of yeast sexual life cycles: the *forma asexualis* – an informal proposal. Yeast Newsletter 61: 24–25
- Lachance MA (2016) *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. Yeast 33: 563–574
- Lachance MA, Klemens JA, Bowles JM, Janzen DH (2001) The yeast community of sap fluxes of Costa Rican *Maclura* (*Chlorophora*) *tinctoria* and description of two new yeast species, *Candida galis* and *Candida ortonii*. FEMS Yeast Res. 1: 87-92
- Lachance MA, Dobson J, Wijayanayaka DN, Smith AM (2010) The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida*

- apicola*, *Candida azyma*, and *Candida parazyza* sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. A. van Leeuw. J. Microb. 97:155–170
- Lachance MA, Wijayanayaka TM, Bundus JD, Wijayanayaka DN (2011a) Ribosomal DNA sequence polymorphism and the delineation of two ascospore yeast species: *Metschnikowia agaves* and *Starmerella bombicola*. FEMS Yeast Res. 11:324–333
- Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW and Kurtzman CP (2011b) *Candida* Berkhout (1923). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 987-1278
- Lawrence E (szerk.) (2000) Henderson's Dictionary of Biological Terms. 12th ed., Prentice Hall, Harlow, England.
- Lee JD, Komagata K (1983) Further taxonomic study of methanol-assimilating yeasts with special reference to electrophoretic comparison of enzymes. J. Gen. Appl. Microbiol. 29: 395–416
- Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio JP (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. P. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 14539–14544
- Limtong S, Youngmanitchai W, Kawasaki H, Seki T. (2008) *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove forests in Phang-Nga Province, Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 515–519
- Limtong S, Kaewwichian R, Groenewald M (2013) *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov. and *Ogataea wangdongensis* sp. nov., two novel methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand. A. van Leeuw. J. Microb. 103: 551-558
- Liti G, Schacherer J: The rise of yeast population genomics. C. R. Biol. 334: 612-619
- Liu Y, Leigh JW, Brinkmann H, Cushion MT, Rodriguez-Ezpeleta N, Philippe H, Lang BF (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Taphrinomycotina, including *Schizosaccharomyces* fission yeasts. Mol. Biol. Evol. 26: 27-34
- Liu X-Z, Wang Q-M, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, Millanes AM, Wedin M, Yurkov AM, Boekhout T and Bai F-Y (2015a) Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. Studies in Mycology 81: 85–147
- Liu X-Z, Wang Q-M, Theelen B, Groenewald M, Bai F-Y and Boekhout T (2015b) Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. Studies in Mycology 81: 1-26
- Liu K-F, Li X-H, Hui F-L (2018) *Yarrowia brassicae* f.a., sp. nov., a new yeast species from traditional Chinese sauerkraut. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68: 2024-2027
- Lodder J and Kreger-van Rij NJW (1952) The Yeasts: A Taxonomic Study. North-Holland, Amsterdam.
- Lodder J (szerk.) (1970) The Yeasts: A Taxonomic Study, 2nd ed. North-Holland, Amsterdam.
- Lurton L, Snackers G, Roulland C, Galy B, Versavaud A (1995): Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. J. Sci. Food Agr. 67: 485–491
- Lücke FK (1985) Fermented sausages. In: Wood BJB (szerk.) Microbiology of Fermented Foods, vol 2. Blackie. London. pp: 41-81
- Magyar I, Tóth T (2011) Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28: 94-100
- Martini A (1993) Origin and domestication of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Wine Res. 4: 165-176

- Martini A, Ciani M & Scorzetti G (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 435-440
- Marquina D, Peres C, Caldas FV, Marques JF, Peinado JM, Spencer- Martins I (1992) Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 279-283
- Márialigeti K (2008) A nemtenyésztéses diverzitáselemző molekuláris eljárások haszna a környezeti bakteriológiában. MTA Doktori értekezés
- Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (szerk.) *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London. pp: 381-424
- McIlvaine TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49: 183-186
- McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, Demoulin V, Hawksworth DL, Marhold K, Nicolson DH, Prado J, Silva PC, Skog JE, Wiersema JH, Turland NJ (2006) *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) Regnum Vegetabile 146*. A.R.G. Gantner Verlag KG. <http://ibot.sav.sk/icbn/no%20frames/0001Viennatitle.htm>
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme Van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ (2012) *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code)*. Koeltz scientific books. <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>
- Medeiros AO, Kohler LM, Hamdan JS, Missagia BS, Barbosa FAR, Rosa CA (2008) Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Res.* 42: 3921-3929
- Menkis A, Marčiulynas A, Gedminas A, Lynikienė J, Povilaitienė A (2015) High-throughput sequencing reveals drastic changes in fungal communities in the phyllosphere of norway spruce (*Picea abies*) following invasion of the spruce bud scale (*Physokermes piceae*). *Microb. Ecol.* 70:904-911
- Michely S, Gaillardin C, Nicaud JM, Neuveglise C (2013) Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade. *PLOS ONE* 8: e63356
- Mikata K (2001): Unique shape of the ascospores of *Pichia sporocuriosa*. *IFO Res. Comm.* 20: 97-100
- Mikata K, Ueda-Nishimura K, Goto S, Kurtzman CP, Suzuki M, Yarrow D, Nakase T (1999) Reidentification of yeast strains deposited as *Candida agrestis*, with a description of *Candida kofuensis* sp. nov.. *Microbiol. Cult. Coll.* 15: 49-57
- Miller MW, Phaff HJ (1998) *Metschnikowia* Kamienski. In: Kurtzman CP. and Fell JW (szerk.) *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 256-267
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Miniati E, Macchioni A (1993) Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2228-2234
- Mortimer R & Polsinelli M (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204
- Munitis MT, Cabrera E, Rodriguez-Navarro A (1976) An obligate osmophilic yeast from honey. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 320-323
- Nagatsuka Y, Saito S, Sugiyama J (2008) *Ogataea neopini* sp. nov. and *O. corticis* sp. nov., with the emendation of the ascomycete yeast genus *Ogataea*, and transfer of *Pichia zsoltsii*, *P. dorogensis*, and *P. trehaloabstinens* to it. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 353-365

- Nagy E (2015) Élelmiszerromlást okozó *Yarrowia* csoport biodiverzitása különböző élelmiszerekben. PhD Értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem
- Nagy E, Niss M, Dlačhy D, Arneborg N, Nielsen DS, Péter G (2013) *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal related and marine sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 4818-4823
- Nagy E, Dlačhy D, Medeiros AO, Péter G, Rosa CA (2014) *Yarrowia porcina* sp. nov. and *Yarrowia bubula* f.a. sp. nov., two yeast species from meat and river sediment. *A. van Leeuw. J. Microb.* 105: 697-707
- Nagy LG, Ohm RA, Kovács MG *et al.* (2014) Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nat. Commun.* 5: 4471, doi: 10.1038/ncomms5471
- Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR *et al.* (2017) The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome* 5:153. DOI 10.1186/s40168-017-0373-4
- Naumov GI, Naumova ES, Boundy-Mills KL (2018) Description of *Komagataella mondaviorum* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris*. *A. van Leeuw. J. Microb.* 111: 1197-1207
- Nei M, Kumar S (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nemecek-Marshall M, MacDonald RC, Franzen JJ, Wojciechowski CL, Fall R (1995) Methanol emission from leaves. Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiol.* 108: 1359-1368
- Nguyen NH, Suh SO, Erbil CK, Blackwell M (2006) *Metschnikowia noctiluminum* sp. nov., *Metschnikowia corniflorae* sp. nov., and *Candida chrysomelidarum* sp. nov., isolated from green lacewings and beetles. *Mycol. Res.* 110:3 46–356
- Novák EK and Zsolt J (1961) A new system proposed for yeasts. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 7: 93–145
- Oberman H, Libudzisz Z (1998) Fermented milk. In: Wood BJB (szerk.) *Microbiology of Fermented Foods*, vol 1. Blackie. London. pp: 308-350
- Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M (1969) A yeast capable of utilizing methanol. *Agr. Biol. Chem.* 33: 1519-1520
- Ordóñez JA, Hierro EM, Bruna JM, de la Hoz L (1999) Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 329-367
- Orlić S, Očić N, Jeromel A, Huić K & Redžepović S (2005) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale. *Agricult. Consp. Sci.* 70: 93-97
- Oro L, Ciani M, Comitini F (2014) Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116: 1209–1217
- Padilla B, Gil JV, Manzanares P (2016) Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00411
- Palla M, Digiacoio M, Cristani C, Bertini S, Giovannetti M, Macchia M, Manera C, Agnolucci M (2018) Composition of health-promoting phenolic compounds in two extra virgin olive oils and diversity of associated yeasts. *J. Food Compos. Anal.* 74: 27-33
- Pencz K, Gál B, Fehér C, Barta, Z (2016) Arabinose biopurification by *Ogataea zsolzii* yeast. In: *Chemical Engineering Conference*. University of Pannonia: Veszprém, Hungary, 2016, pp. 82–86

- Pérez-Torrado R, Querol A (2016) Opportunistic strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential risk sold in food products. *Front. Microbiol.* 6: 1522. doi:10.3389/fmicb.2015.01522
- Péter G, Deák T (1991): On the false positive urease activity of *Yarrowia lipolytica*. *A. van Leeuw. J. Microb.* 60: 55-59.
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D, Vitányi G (2000) *Pichia sporocuriosa* sp. nov., a new yeast isolated from rambutan. *A. van Leeuw. J. Microb.* 77: 37–42
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Fülöp L, Dlačhy D (2003) Six new methanol assimilating yeast species from wood material. *A. van Leeuw. J. Microb.* 84: 147-159
- Péter G, Dlačhy D, Vasdinyei R, Tornai-Lehoczki J, Deák, T (2004) *Candida galli* sp. nov., a new yeast from poultry. *A. van Leeuw. J. Microb.* 86: 105–110
- Péter G, Dlačhy D, Tornai-Lehoczki J, Kurtzman CP (2005a) *Kuraishia molischiana* sp. nov., the teleomorph of *Candida molischiana*. *A. van Leeuw. J. Microb.* 88: 241–247
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Suzuki M, Dlačhy D (2005b): *Metschnikowia viticola* sp. nov., a new yeast species from grape. *A. van Leeuw. J. Microb.* 87: 155-160
- Péter G, Dlačhy D, Tornai-Lehoczki J (2006) *Candida floccosa* sp. nov., a novel methanol-assimilating yeast species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2015-2018
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D (2007a) *Ogataea allantospora* sp. nov., an ascomycetous yeast species from phylloplane. *A. van Leeuw. J. Microb.* 92: 443-448
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Shin KS, Dlačhy D (2007b) *Ogataea thermophila* sp. nov., the teleomorph of *Candida thermophila*. *FEMS Yeast Res.* 7: 494-496
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D (2008) *Ogataea nitratoaversa* sp. nov., a methylotrophic yeast species from temperate forest habitats. *A. van Leeuw. J. Microb.* 94: 217-222
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D (2009a) *Candida ogatae* sp. nov., an anamorphic member of the *Kuraishia* clade. *FEMS Yeast Res.* 9: 328-333
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D (2009b) *Ogataea populialbae* sp. nov., a yeast species from white poplar. *FEMS Yeast Res.* 9: 936–941
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačhy D (2010) *Ogataea pignaliae* sp. nov., the teleomorph of *Candida pignaliae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2496–2500
- Péter G, Dlačhy D, Szűcs E, Tornai-Lehoczki J (2011a) Enrichment in methanol-containing broth – a simple method for the isolation of *Saccharomyces* from grapes. *Acta Aliment. Hung.* 40: 376–384
- Péter G, Dlačhy D, Tornai-Lehoczki J, Gouliamova D, Kurtzman CP (2011b) *Ogataea saltuana* sp. nov., a novel methanol-assimilating yeast species. *A. van Leeuw. J. Microb.* 100: 375-83
- Péter G, Dlačhy D, Tóbiás A, Fülöp L, Podgoršek M, Čadež N (2017a) *Brettanomyces acidodurans* sp. nov., a new acetic acid producing yeast species from olive oil. *A. van Leeuw. J. Microb.* 110: 657–664
- Péter G, Takashima M, Čadež N (2017b) Yeast Habitats: Different but Global. In: Buzzini P, Lachance MA, Yurkov A (szerk.) *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Springer, Cham. pp: 39-71
- Péter G, Nagy ES, Dlačhy D (2019a) Systematics, Diversity and Ecology of the Genus *Yarrowia* and the Methanol-Assimilating Yeasts. In: Sibirny A. (szerk.) *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Springer, Cham. pp: 297-339. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_9
- Péter G, Mounier J, Garnier L, Soós D, Dlačhy D (2019b) *Cutaneotrichosporon suis* sp. nov., a lipolytic yeast species from food and food-related environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003485>

- Phaff HJ, Miller MW, Mrak EM (1978) *The Life of Yeasts*. 2nd ed. Harvard University Press, Cambridge, Ma
- Phaff HJ, Blue J, Hagler AN, Kurtzman CP (1997) *Dipodascus starmeri* sp. nov., a new species of yeast occurring in cactus necroses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 307–312
- Pimenta RS, Silva FL, Corrêa A Jr, Rosa CA (2004) Biological control of *Penicillium italicum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis javanensis* on oranges. In: *Yeast in Science and Biotechnology The Quest for Sustainable Development. Book of Abstracts of the Eleventh International Congress on Yeasts*. 15-20th August 2004, Ri de Janeiro, Brazil. p. 77
- Pincus DH, Salkin IF, Hurd NJ, Levy IL, Kemna MA (1988) Modification of potassium nitrate assimilation test for identification of clinically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 26: 366–368
- Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and food spoilage*, 3rd ed. Springer, Dordrecht
- Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.* 6: doi: 10.3389/fmicb.2015.01177
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeasts for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-679
- Pretorius IS, van der Westhuizen TJ (1991): The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 12: 3–31
- Punja ZK and Utkhede RS (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* 21: 400-407
- Quarterman J, Slininger PJ, Kurtzman CP, Thompson SR, Dien BS (2017) A survey of yeast from the *Yarrowia* clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 3319-3334
- Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953
- Querol A, Barrio E, Ramón D (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 315-323
- Rakicka M, Kieron A, Hapeta P, Neuveglise C, Lazar Z (2016) Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass Bioenerg.* 92: 48-54
- Rakowska R, Sadowska A, Dybkowska E, Świdorski F (2017) Spent yeasts as natural source of functional food additives. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 68:115-121
- Riley R, Haridas S, Wolfe KH et al. (2016) Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113: 9882-9887
- Roberts GD, Horstmeier CD, Land GA, Foxworth JH (1978) Rapid urea broth test for yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 7: 584-588
- Rokas A, Williams BL, King N, Carroll SB (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425:798–804
- Romano P, Capece A, Jespersen L (2006) Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin. pp: 13-53
- Romano P, Capece A, Serafino V, Romaniello R, Poeta C (2008) Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1797-1802
- Rose AH, Harrison JS (1969) Introduction. In: Rose AH, Harrison JS (szerk.) *The Yeasts*, vol 1. *Biology of Yeasts*. Academic Press, London pp: 1-4
- Rosa CA, Lachance MA (2005) *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana* 6 (suppl): 27–29

- Roscini L, Tristezza M, Corte L, Colabella C, Perrotta C, Rampino P, Robert V, Vu D, Cardinali G, Grieco F (2018) Early ongoing speciation of *Ogataea uvarum* sp. nov. within the grape ecosystem revealed by the internal variability among the rDNA operon repeats. *Front. Microbiol.* 9: 1687. doi: 10.3389/fmicb.2018.01687
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425
- Saksinchai S, Suzuki M, Chantawannakul P, Ohkuma M, Lumyong S (2012) A novel ascosporeogenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Divers.* 52: 123–139
- Salminen JP, Roslin T, Karonen M, Sinkkonen J, Pihlaja K, Pulkkinen P (2004) Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides and proanthocyanidins in oak leaves. *J. Chem. Ecol.* 30: 1693–1711
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (eds) (2004) Introduction to food- and airborne fungi, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
- Santos AR, Faria ES, Lachance MA, Rosa CA (2015) *Ogataea mangiferae* sp. nov., a methylotrophic yeast isolated from mango leaves. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 1855-1859
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, and Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6241–6246
- Schütz M & Gafner J (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. appl. Bacteriol.* 75: 551–558
- Shen XX, Zhou X, Kominek J, Kurtzman CP, Hittinger CT, Rokas A (2016) Reconstructing the backbone of the Saccharomycotina yeast phylogeny using genome-scale data. *G3* 6: 3927–3939
- Shen XX, Oplente DA, Kominek J *et al* (2018) Tempo and mode of genome evolution in the budding yeast subphylum. *Cell* 175: 1–13
- Shin KS, Shin YK, Yoon JH, Park YH (2001) *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2167- 2170
- Singh G (2010) Plant systematics. An integrated approach., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Sipiczki M (2003) *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 2079–2083
- 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 (2012) *Candida borneonana* sp. nov., a methanol-assimilating anamorphic yeast isolated from decaying fruit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2303–2306
- Smith MTh, Kurtzman CP (2011) *Lipomyces* Lodder & Kreger-van Rij (1952). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 545-560
- Sniegowski PD, Dombrowski PG & Fingerman E (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1: 299–306
- Solieri L, Chand Dakal T, Giudici P (2013) *Zygosaccharomyces sapae* sp. nov., isolated from Italian traditional balsamic vinegar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 364–371

- Spitaels F, Wieme AD, Janssens M, Aerts M, Daniel HM, van Landschoot A, de Vuyst L, Vandamme P (2014) The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLOS ONE* 9: e95384
- Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P (2015) Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 202:118-134
- Steensels J, Daenen L, Malcorps P, Derdelinckx G, Verachtert H, Verstrepen KJ (2015) *Brettanomyces* yeasts—from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206: 24–38
- Stewart GG, Murray CR, Panchal CJ, Russell I, Sills AM (1984) The selection and modification of brewer's yeast strains. *Food Microbiol.* 1: 289-302
- Stratford M (2006) Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag. Berlin. pp: 335-379
- Stuart CA, van Stratum E, Rustigian R (1945) Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms. *J. Bacteriol.* 49: 437-444
- Suh SO, Zhou JJ (2010) Methylophilic yeasts near *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha*: A proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. *FEMS Yeast Res.* 10: 631-638
- Suzuki M, Nakase T (1999) A phylogenetic study of ubiquinone Q8 species of the genera *Candida*, *Pichia*, and *Citeromyces* based on 18S ribosomal DNA sequence divergence. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45: 239–246
- Takashima M, Sugita T, Toriumi Y, Nakase T (2009) *Cryptococcus tepidarius* sp. nov., a thermotolerant yeast species isolated from a stream from a hot-spring area in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 181-185
- Tamang JP, Kailasapathy K (2010) *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH (2016) Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* 7:377. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377
- Tamura K (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687
- Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31: 21-32
- Tedersoo L, Bahram M, Pöhlme S *et al.* (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1078-1089
- Thanh VN, Hai DA, Lachance MA (2003) *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. *FEMS Yeast Res.* 4: 113–117
- The Y1000+ Project (<https://y1000plus.wei.wisc.edu/>), hozzáférés 2018. november 25.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876–4882
- Tokuoka K, Ishitani T, Goto S, Komagata K (1987) Four new yeast species belonging to genus *Candida*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33: 1–10

- Tornai-Lehoczki and Dlauchy (1996) An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces* sensu stricto by electrophoretic separation of the larger chromosomes. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 227–230
- Torriani S, Lorenzini M, Salvetti E, Felis GE (2011) *Zygosaccharomyces gambellarensis* sp. nov., an ascosporeogenous yeast isolated from an Italian ‘passito’ style wine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 3084–3088
- Török T, Mortimer RK, Romano P, Suzzi G & Polsinelli M (1996) Quest for wine yeasts - an old story revisited. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17: 303–313
- Turland NJ, Wiersema JH, Barrie FR, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Kusber WH, Li DZ, Marhold K, May TW, McNeill J, Monro AM, Prado J, Price MJ, Smith GF (2018) International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Shenzhen Code). *Regnum Vegetabile*, 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. doi <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- Valero E, Cambon B, Schuller D, Casal M & Dequin S (2007) Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* 7: 317–329
- Vaughan-Martini A, Martini A (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* 14: 514–522
- Vaughan-Martini A, Martini A (2011a) *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 733–746
- Vaughan-Martini A, Martini A (2011b) *Schizosaccharomyces* Lindner (1893). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (szerk.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier. Amsterdam. pp: 779–784
- van Dijken JP, Harder W (1974) Optimal conditions for the enrichment and isolation of methanol-assimilating yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 84: 409–411
- van der Walt JP, von Arx JA (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. A. van Leeuw. *J. Microb.* 46: 517–521
- Verstrepen KJ, Chambers PJ, Pretorius IS (2006) The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: Challenges, opportunities and potential benefits. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag. Berlin. pp: 399–444
- Viljoen BC (2006) Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In: Querol A, Fleet GH (szerk.) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag. Berlin. pp: 83–110
- Vu D, Groenewald M, Szöke S, Cardinali G, Eberhardt U, Stielow B, de Vries M, Verkleij GJM, Crous PW, Boekhout T, Robert V (2016) DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Studies in Mycology* 85: 91–105
- Wang Q-M, Begerow D, Groenewald M, Liu X-Z, Theelen B, Bai F-Y and Boekhout T (2015a) Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *Studies in Mycology* 81: 55–83
- Wang Q-M, Groenewald M, Takashima M, Theelen B, Han P-J, Liu X-Z, Boekhout T and Bai F-Y (2015b) Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology* 81: 27–53
- Wang Q-M, Yurkov AM, Göker M, Lumbsch HT, Leavitt SD, Groenewald M, Theelen B, Liu X-Z, Boekhout T and Bai F-Y (2015c) Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies in Mycology* 81: 149–189

- Wickerham LJ (1970) *Hansenula* H. et P. Sydow. In: Lodder J. (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study, 2nd ed. North-Holland, Amsterdam, pp. 227–315
- Wiley EO (1978) The evolutionary species concept reconsidered. Syst. Zool. 27: 17–26
- Yamada Y, Maeda K, Mikata K (1994) The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 1245-1257
- Yamada Y, Matsuda M, Maeda K & Mikata K (1995) The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: The proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae) Biosci. Biotech. Biochem. 59: 439-444
- Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (szerk.) The Yeasts: A Taxonomic Study 4th ed. Elsevier. Amsterdam. 77-100
- Younis G, Awad A, Dawod RE, Yousef NE (2017) Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. Vet World 10: 979-983
- Zheng L, Zheng P, Sun Z, Bai Y, Wang J, Guo X (2007) Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. Bioresour Technol 98:1115–1119
- Zullo BA, Ciafardini G (2019) Evaluation of physiological properties of yeast strains isolated from olive oil and their *in vitro* probiotic trait. Food Microbiol. 78: 179–187
- Zullo BA, Cioccia G, Ciafardini G (2010) Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. Food Microbiol. 27: 1035-1042
- Zullo BA, Cioccia G, Ciafardini G (2013) Effects of some oil-born yeasts on the sensory characteristics of Italian virgin olive oil during its storage. Food Microbiol. 36: 70-78

Függelék

Az értekezésben bemutatott filogenetikai elemzésekhez felhasznált mikroorganizmus törzsek DNS szekvenciáinak GenBank-i azonosító számai

Fajnév	Törzs*	ITS	LSU D1/D2
<i>Allodekкера sacchari</i>	CBS 14167		AB698502
<i>Ambrosiozyma monospora</i>	CBS 2554		EU011590
<i>Archaeorhizomyces borealis</i>	NS99-600		KF993708
<i>Archaeorhizomyces finlayi</i>	Ny10		JF836022
<i>Barnettozyma vustinii</i>	CBS 11554	NR_137724	KY106191
<i>Brettanomyces acidodurans</i>	NCAIM Y.02178 (CBS 14519)		KX753353
<i>Brettanomyces custersianus</i>	CBS 4805		EF550261
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	CBS 6042		EF550260
<i>Brettanomyces nanus</i>	CBS 1945		EF550259
<i>Candida adriatica</i>	CBS 12504	HE574654	HE574661
<i>Candida anatomiae</i>	CBS 5547	KM065947	EU011645
<i>Candida arabinofermentans</i>	CBS 8468		AF017248
<i>Candida blankii</i>	CBS 1898	NR_077136	U45704
<i>Candida boidinii</i>	CBS 2428		U70242
<i>Candida cabralensis</i>	CBS 11679		NG_055163
<i>Candida californica</i>	CBS 989		NG_055093
<i>Candida chumphonensis</i>	CBS 12096		AB604652
<i>Candida easanensis</i>	JCM 12476	HM461688	AY634571
<i>Candida ernobii</i>	CBS 1737	KM065945	EU011648
<i>Candida ethanolica</i>	CBS 8041		EF550225
<i>Candida hispaniensis</i>	CBS 9996	AM279259	AY789654
<i>Candida hungchunana</i>	CBS 12243	HQ623543	HM461702
<i>Candida incommunis</i>	CBS 5604	NR_077184	U62303
<i>Candida inconspicua</i>	CBS 180		NG_055114
<i>Candida ishiwadae</i>	CBS 6022	NR_155480	EU011650
<i>Candida krabiensis</i>	JCM 12266		AB120219
<i>Candida laoshanensis</i>	CBS 11389	NR_155481	KM065901
<i>Candida maesa</i>	CBS 12240	HM461661	FJ527053
<i>Candida maris</i>	CBS 5151		U70181
<i>Candida maritima</i>	CBS 5107	NR_152474	U69877
<i>Candida matranensis</i>	CBS 12097		AB604653
<i>Candida methanosorbosa</i>	CBS 7029		U70186
<i>Candida mycetangii</i>	CBS 8675	NR_152475	AF017241
<i>Candida nakhonratchasimensis</i>	CBS 11706	NR_152476	AY634567
<i>Candida nanaspora</i>	CBS 7200		U70187
<i>Candida nemodendra</i>	CBS 6280		U70246
<i>Candida nitratorphila</i>	CBS 2027		U70180
<i>Candida ortonii</i>	CBS 8843		AF313350

<i>Candida ovalis</i>	CBS 7298		U70248
<i>Candida pattaniensis</i>	JCM 12475	HM461657	AY634568
<i>Candida peltata</i>	CBS 5576	NR_155482	EU011651
<i>Candida phayaonensis</i>	CBS 12319T		AB557865
<i>Candida piceae</i>	CBS 8701		AF153672
<i>Candida pini</i>	CBS 970		U70252
<i>Candida pomicola</i>	CBS 4242	NR_138216	AF245400
<i>Candida populi</i>	CBS 7351	NR_138241	EU011646
<i>Candida pseudolambica</i>	CBS 2063		NG_060822
<i>Candida rishirensis</i>	CBS 11662		AB462338
<i>Candida rugopelliculosa</i>	CBS 6377		U71069
<i>Candida sithepensis</i>	JCM 12265		AB120220
<i>Candida sonorensis</i>	CBS 6792		U70185
<i>Candida stauntonica</i>	CBS 12241	HM461658	FJ527095
<i>Candida succiphila</i>	CBS 8003		U70189
<i>Candida suzukii</i>	NCAIM Y.01500 (CBS 9253)		AY028434
<i>Candida takata</i>	CBS 12244	FJ873431	FJ527238
<i>Candida taoyuanica</i>	CBS 12242	FJ873419	FJ527145
<i>Candida thaimueangensis</i>	CBS 10360		NG_042471
<i>Candida vartiovaarae</i>	CBS 4289	NR_152478	U69875
<i>Candida wickerhamii</i>	CBS 2928	NR_155483	EU011647
<i>Candida wyomingensis</i>	CBS 8703	NR_155484	AF153673
<i>Candida xylosterini</i>	CBS 11547		FJ381703
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	NRRL 13496		U94917
<i>Citeromyces matritensis</i>	CBS 2764	JN016712	JQ689054
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 6936	KY102562	U44817
<i>Cutaneotrichosporon arboriforme</i>	CBS 10441	NR_154831	NG_058996
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	CBS 570	NR_130657	AF189834
<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i>	CBS 2466	NR_073216	NG_056270
<i>Cutaneotrichosporon cyanovorans</i>	CBS 11948	NR_073357	NG_058819
<i>Cutaneotrichosporon daszewskae</i>	CBS 5123	NR_144763	NG_058997
<i>Cutaneotrichosporon debeurmannianum</i>	CBS 1896	NR_154752	NG_058998
<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	CBS 2043	NR_130667	NG_055715
<i>Cutaneotrichosporon guehoae</i>	CBS 8521	NR_136957	NG_058724
<i>Cutaneotrichosporon haglerorum</i>	CBS 8902	NR_077086	NG_058999
<i>Cutaneotrichosporon jirovecii</i>	CBS 6864	NR_073252	NG_056272
<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	CBS 2467	NR_073240	AF105392
<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>	CBS 7625	NR_073246	KY107339
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosum</i>	ATCC 20509	NR_154774	HM802135
<i>Cutaneotrichosporon smithiae</i>	CBS 8370	NR_073230	KY107342
<i>Cutaneotrichosporon suis</i>	NCAIM Y.02224 (CBS 15749)	MH886393	MH886396
<i>Cutaneotrichosporon terricola</i>	CBS 9546	AB086382	AB086382
<i>Cyberlindnera rhizosphaerae</i>	CBS 11400	NR_152490	GQ891688
<i>Cyberlindnera americana</i>	CBS 5644	NR_152479	EF550328
<i>Cyberlindnera bimundalis</i>	CBS 5642	NR_152481	EF550329
<i>Cyberlindnera culbertsonii</i>	CBS 13898		KM408121

<i>Cyberlindnera euphorbiae</i>	CBS 8033	NR_152482	EF550326
<i>Cyberlindnera euphorbiiphila</i>	CBS 8083		EF550312
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	CBS 5640	NR_149345	EF550321
<i>Cyberlindnera galapagoensis</i>	CBS 13997	KJ020281	KJ020281
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	CBS 1600	NR_111211	EF550309
<i>Cyberlindnera japonica</i>	CBS 7209	NR_152483	EF550323
<i>Cyberlindnera lachancei</i>	CBS 8557	NR_152484	EF550313
<i>Cyberlindnera macluræ</i>	CBS 8671	NR_152485	EF550310
<i>Cyberlindnera mengyuniae</i>	CBS 10845	EU043159	EU043158
<i>Cyberlindnera meyeræ</i>	CBS 7076	NR_152486	EF550327
<i>Cyberlindnera misumaiensis</i>	CBS 8062	NR_152488	EF550306
<i>Cyberlindnera mrakii</i>	CBS 1707	EU307973	EF550317
<i>Cyberlindnera petersonii</i>	CBS 5555	NR_152489	EF550311
<i>Cyberlindnera rhodanensis</i>	CBS 5518		EF550325
<i>Cyberlindnera samutprakarnensis</i>	CBS 12528	AB695388	AB598079
<i>Cyberlindnera sargentensis</i>	CBS 6342	EU307980	EF550316
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	CBS 254	EU307970	EF550316
<i>Cyberlindnera suaveolens</i>	CBS 255	EU307977	EU307993
<i>Cyberlindnera subsufficiens</i>	CBS 5763	EU307975	EF550318
<i>Cyberlindnera tropicalis</i>	CBS 14558	KY010353	KY010353
<i>Cyberlindnera veronae</i>	CBS 6591	NR_152491	EF550322
<i>Cyberlindnera wuzhiensis</i>	CBS 10698	FJ606824	FJ606825
<i>Cyberlindnera xishuangbannaensis</i>	CBS 14692	KY213821	KY213813
<i>Cyberlindnera xylebori</i>	CBS 12187	KY103116	AB534167
<i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	NRRL YB-2097	KP232976	EF550324
<i>Cyberlindnera amylophila</i>	CBS 7020	NR_152480	EF550319
<i>Cyberlindnera mississippiensis</i>	CBS 7023	NR_152487	EF550320
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 767	AB053101	U45808
<i>Dekkera anomala</i>	CBS 8139		EF550258
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CBS 74		EF550257
<i>Emericella nidulans</i>	NRRL A-24926		U40122
<i>Eremascus fertilis</i>	NRRL Y-1463		U94940
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CBS 6885		U94941
<i>Haglerozyma chiarellii</i>	CBS 11177	NR_137042	NG_058301
<i>Komagataella kurtzmanii</i>	CBS 12817	KC771256	KC715720
<i>Komagataella pastoris</i>	CBS 704	JQ398742	U75963
<i>Komagataella phaffii</i>	CBS 2612	JQ398743	AF017407
<i>Komagataella populi</i>	CBS 12362	JQ398744	JN234404
<i>Komagataella pseudopastoris</i>	NCAIM Y.01243 (CBS 704)	JQ398745	AF403149
<i>Komagataella ulmi</i>	CBS 12361	JQ398746	JN234403
<i>Komagataella mondaviorum</i>	CBS 15017	MF276791	MF276795
<i>Kregervanrija fluxuum</i>	CBS 2287		EF550268
<i>Kuraishia borneana</i>	CBS 12507	JQ038035	JQ001938
<i>Kuraishia capsulata</i>	CBS 1993	EF568066	EF550270
<i>Kuraishia cidri</i>	CBS 4241	KY103912	AF245402
<i>Kuraishia floccosa</i>	NCAIM Y.01581 (CBS 10307)	KY103913	KM065899

<i>Kuraishia hungarica</i>	NCAIM Y.01507 (CBS 9254)	EU722410	EU011587
<i>Kuraishia mediterranea</i>	CBS 15107	HE799687	HE799687
<i>Kuraishia molischiana</i>	NCAIM Y.01725 (CBS 9993)	KY103920	AY937235
<i>Kuraishia ogatae</i>	NCAIM Y.01845 (CBS 10924)	KM384064	KM065903
<i>Kuraishia piskuri</i>	CBS 13714	KM065941	KM065907
<i>Lachancea thermotolerans</i>	CBS 6340		U69581
<i>Martiniozyma abiesophila</i>	CBS 5366		EF550212
<i>Metschnikowia australis</i>	CBS 5847	KP027652	U76526
<i>Metschnikowia bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i>	CBS 5575	KY104192	U44822
<i>Metschnikowia bicuspidata</i> var. <i>chathamia</i>	CBS 5980	NR_138245	U84238
<i>Metschnikowia henanensis</i>	CBS 12677	NR_158796	JQ941874
<i>Metschnikowia kofuensis</i>	CBS 8058	NR_156313	AF158019
<i>Metschnikowia krissii</i>	CBS 4823	KP027654	U45735
<i>Metschnikowia noctiluminum</i>	CBS 9907	NR_155362	AY611609
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CBS 5833	JX188179	U45736
<i>Metschnikowia viticola</i>	NCAIM Y.01705 (CBS 9950)	KY104213	AY626892
<i>Metschnikowia zobellii</i>	CBS 4821	NR_138246	U44823
<i>Nakazawaea holstii</i>	CBS 4140	KM065944	JQ689055
<i>Nakazawaea molendinolei</i>	NCAIM Y.02000 (CBS 12508)	JN688668	JN688665
<i>Nakazawaea siamensis</i>	CBS 12569	AB793784	AB772177
<i>Neoelecta irregularis</i>	ZW-Geo79-Clark		AY789380
<i>Neoelecta vitellina</i>	NSW 6359		U42695
<i>Neournula pouchetii</i>	MO-205345		KT968655
<i>Neurospora crassa</i>	NRRL 13141		U40124
<i>Ogataea allantospora</i>	NCAIM Y.01822 (CBS 10576)		EF471446
<i>Ogataea angusta</i>	CBS 7073		EF550269
<i>Ogataea cecidiorum</i>	CBS 11522		FJ897742
<i>Ogataea chonburiensis</i>	CBS 10363		AB307721
<i>Ogataea corticis</i>	NBRC 1794		AB440278
<i>Ogataea deakii</i>	NCAIM Y.01896 (CBS 12735)		GQ265921
<i>Ogataea degrootiae</i>	CBS 15033		MG986494
<i>Ogataea dorogensis</i>	NCAIM Y-01539 (CBS 9260)		EU011620
<i>Ogataea falcaomoraisii</i>	CBS 9814		AY561260
<i>Ogataea ganodermae</i>	CBS 10646		EU117201
<i>Ogataea glucozyma</i>	CBS 5766		EU011626
<i>Ogataea haglerorum</i>	CBS 14645		KY492605
<i>Ogataea henricii</i>	CBS 5765		EU011625

<i>Ogataea histrianica</i>	CBS 12779		HE799677
<i>Ogataea kanchanaburiensis</i>	CBS 12673		AB734090
<i>Ogataea kodamae</i>	CBS 7081		EU011616
<i>Ogataea kolombanensis</i>	CBS 12778		FR690079
<i>Ogataea mangiferae</i>	CBS 13492		KF585022
<i>Ogataea methanolica</i>	CBS 6515		EU011638
<i>Ogataea methylivora</i>	CBS 7300		EU011611
<i>Ogataea minuta</i>	CBS 1708		EU011618
<i>Ogataea naganishii</i>	CBS 6429		EU011601
<i>Ogataea nakhonphanomensis</i>	CBS 10362		AB307722
<i>Ogataea neixiangensis</i>	CBS 14695		KY213811
<i>Ogataea neopini</i>	ATCC 28781		AB440274
<i>Ogataea nitratoaversa</i>	NCAIM Y.01837 (CBS 10796)		EU327032
<i>Ogataea nonfermentans</i>	CBS 5764		EU011619
<i>Ogataea paradorogensis</i>	CBS 10978		AB437093
<i>Ogataea paraovalis</i>	CBS 14697		KY213806
<i>Ogataea parapolyomorpha</i>	CBS 12304		EU011621
<i>Ogataea philodendri</i>	CBS 6075		EU011617
<i>Ogataea phyllophila</i>	CBS 12095		AB600532
<i>Ogataea pignaliae</i>	CBS 6071		U70183
<i>Ogataea pilisensis</i>	NCAIM Y.01509 (CBS 9259)		EU011630
<i>Ogataea pini</i>	CBS 744		EU011623
<i>Ogataea polymorpha</i>	CBS 4732		GU397333
<i>Ogataea populialbae</i>	NCAIM Y.01853 (CBS 11363)		EU872172
<i>Ogataea ramenticola</i>	CBS 8699		EU011608
<i>Ogataea salicorniae</i>	CBS 8071		EU011637
<i>Ogataea saltuana</i>	NCAIM Y.01833 (CBS 10795)		EU327033
<i>Ogataea siamensis</i>	JCM 12264		AB120216
<i>Ogataea thermomethanolica</i>	CBS 10098		AB200285
<i>Ogataea trehaloabstinens</i>	NCAIM Y.01537 (CBS 9256)		EU011614
<i>Ogataea trehalophila</i>	CBS 5361		EU011636
<i>Ogataea uvarum</i>	CBS 12829		LN849460
<i>Ogataea wangdongensis</i>	CBS 12674		AB734091
<i>Ogataea wickerhamii</i>	CBS 4307		EU011612
<i>Ogataea zsoltii</i>	NCAIM Y.01540		EU011628

	(CBS 9262)		
<i>Oosporidium margaritiferum</i>	NRRL Y-1519		U40090
<i>Pachysolen tannophilus</i>	CBS 4044	NR_154355	JQ689056
<i>Peterozyma toletana</i>	CBS 2504		JQ689057
<i>Pichia barkeri</i>	CBS 7256		EF550247
<i>Pichia bruneiensis</i>	CBS 12611		JQ692181
<i>Pichia cactophila</i>	CBS 6926		NG_055115
<i>Pichia cecembensis</i>	CBS 10445		AM159112
<i>Pichia cephalocereana</i>	CBS 7273		EF550250
<i>Pichia chibodasensis</i>	NBRC 111569		NG_055170
<i>Pichia deserticola</i>	CBS 7119		EF550226
<i>Pichia dushanensis</i>	CBS 13912		KM272244
<i>Pichia eremophila</i>	CBS 7272		EF550249
<i>Pichia exigua</i>	CBS 6836		EF550237
<i>Pichia fermentans</i>	CBS 187		NG_055109
<i>Pichia garciniae</i>	CBS 10758		NG_058374
<i>Pichia heedii</i>	CBS 6930		EF550252
<i>Pichia jaroonii</i>	CBS 10930		AB436766
<i>Pichia kluyveri</i>	CBS 188		EF550251
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CBS 5147		U76347
<i>Pichia manshurica</i>	CBS 209		NG_055078
<i>Pichia membranifaciens</i>	CBS 107		EF550227
<i>Pichia nakasei</i>	CBS 5141		EF550248
<i>Pichia nanzhaoensis</i>	CBS 15346		MG255700
<i>Pichia norvegensis</i>	CBS 6564		EF550239
<i>Pichia occidentalis</i>	CBS 5459		U76348
<i>Pichia paraexigua</i>	CBS 15237		MG255712
<i>Pichia pseudocactophila</i>	CBS 6929		NG_055116
<i>Pichia scutulata</i>	CBS 6670		EF550243
<i>Pichia sporocuriosa</i>	Y.01078 (CBS 8806)		EF550232
<i>Pichia terricola</i>	CBS 2617		NG_055108
<i>Pneumocystis carinii**</i>			M86760
<i>Protomyces gravidus</i>	NRRL Y-17093		U84342
<i>Protomyces pachydermus</i>	NRRL YB-4355		U84345
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1171		AY048154
<i>Saitoella coloradoensis</i>	CBS 12360		JN161157
<i>Saitoella complicata</i>	CBS 7301		JQ689076
<i>Saturnispora dispersa</i>	CBS 794		JQ689027
<i>Schizosaccharomyces cryophilus</i>	CBS 11777		GU470882
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	CBS 354		U94943
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	CBS 371		U76525
<i>Schizosaccharomyces osmophilus</i>	CBS 15793		MK253005
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CBS 356		U40085
<i>Taphrina deformans</i>	CBS 356.35		MH867217
<i>Taphrinomycotina</i> sp. nov.	NCAIM Y.02187		MG250349
<i>Trichosporon ovoides</i>	CBS 7556	NR_073254	KY109960

<i>Yarrowia alimentaria</i>	CBS 10151	AM279269	AM268481
<i>Yarrowia brassicae</i>	CBS 15225	MF136067	MF136065
<i>Yarrowia bubula</i>	NCAIM Y.01998 (CBS 12934)	KF649301	JN256212
<i>Yarrowia deformans</i>	CBS 2071	AM279254	EF405984
<i>Yarrowia divulgata</i>	CBS 11013	KF425323	EU194451
<i>Yarrowia galli</i>	NCAIM Y.01482 (CBS 9722)	AM279257	AY116080
<i>Yarrowia hollandica</i>	CBS 4855	AM279270	AM268482
<i>Yarrowia keelungensis</i>	CBS 11062	EF621566	EF621561
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6124	AM279233	AM268450
<i>Yarrowia osloensis</i>	CBS 10146	AM279265	AM268477
<i>Yarrowia parophoni</i>	CBS 12427	JQ026371	JQ026370
<i>Yarrowia phangngensis</i>	ATCC MYA-4467	FJ196782	AB304772
<i>Yarrowia porcina</i>	NCAIM Y.02100 (CBS 12935)	KF649296	KF649289
<i>Yarrowia</i> sp.	NCAIM Y.02139	KM659880	KM659879
<i>Yarrowia yakushimensis</i>	CBS 10254	AM279262	AM268474
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS 680		JX458117
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	CBS 702		U72162
<i>Zygosaccharomyces favi</i>	NCAIM Y.01994 (CBS 13653)		JF830782
<i>Zygosaccharomyces gambellarensis</i>	ATCC MYA-4776		JN874489
<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	CBS 8849		AF339904
<i>Zygosaccharomyces lentus</i>	CBS 8574		AF339888
<i>Zygosaccharomyces machadoi</i>	CBS 10264		AF432228
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	CBS 736		U72164
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	CBS 12809		JX458113
<i>Zygosaccharomyces pseudobailii</i>	CBS 2856		JX458128
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS 732		JQ689016
<i>Zygosaccharomyces sapae</i>	CBS 12067		AJ966342
<i>Zygosaccharomyces siamensis</i>	JCM 16825		AB565756

NCAIM: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms), Budapest

CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (korábban: Centraalbureau voor Schimmelcultures) Utrecht, The Netherlands

NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

JCM: Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, Ibaraki 305-0074, Japan

*a leírt élesztőgomba fajok esetében valamennyi törzs típus, izotípus vagy autentikus törzs

dc_1731_20

****nem tenyésztető**