

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai tanszék



DEBRECENI
EGYETEM

BSc Szakdolgozat

Schizosaccharomyces pombe és *Schizosaccharomyces japonicus*
élesztőgomba borászati alkalmasságának vizsgálata

Készítette: Melcher Máté
Biomérnök BSc. szakos hallgató

Témavezető:
Gálné Dr. Miklós Ida
egyetemi docens

Egyetemi konzulens:
Lajtosné Takács Szonja
PhD hallgató

2023, Debrecen

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés, célkitűzés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A három vizsgált gombafaj általános jellemzése	5
2.2. A cider fermentálás	10
2.3. A Jonagold almalé általános jellemzése	11
3. A kísérlethez használt anyagok és módszerek	13
3.1. Táptalaj előkészítése	13
3.2. Gombák felszaporítása	13
3.3. Fermentációs vizsgálat előkészítése	14
3.4. A <i>Schizosaccharomyces</i> élesztőtörzsek fermentációkinetikai vizsgálata az almalében	14
3.5. A fermentlevek analitikai vizsgálata	14
4. Eredmények és megbeszélésük	15
4.1. Erjesztés-kinetikai vizsgálatok az almalében	15
4.2. A ciderek analitikai-kémiai összetételének összehasonlítása	17
4.3. A ciderek aromaprofiljainak analitikai összehasonlítása	21
5. Összefoglalás	25
6. Köszönetnyilvánítás	27
7. Forrásjegyzék	28

1. Bevezetés, célkitűzés

A szőlőtermesztés és a bortermelés alapjai már az ős- és ókorban is ismertek lehettek. A Kaukázus vidékén már az időszámításunk előtti 5.-6. században is folytattak szőlőtermelést. A szőlészeti és a borászat kultúrája a görög társadalommal együtt fejlődött. Homérosz és Hésziodosz feljegyzéseiben már találunk szőlészeti és borászati praktikákat. A szőlőt a Görögök honosították meg a mai Olaszország illetve Franciaország területén. Magyarországra a római hódítások idején jutott el. Amerikába a borkultúra a nagy földrajzi felfedezések idején az 1400-1500-as évek végén került [1,2].

A borkészítés során az élesztőgombák játsszák a legfontosabb szerepet, hiszen segítségükkel a cukor átalakul alkohollá, így jön létre a bor. Az élesztők azonban nem csak az alkoholos erjedésben vesznek részt, hanem a bor ízének és aromájának kialakításában is. A borászat és az élesztők kapcsolata tehát igen szorosan összefonódik.

A borkészítés első lépéseként a szőlőbogyókat leszüreteljük, majd azokból a levüket kiperéseljük. Az így kapott szőlőlevet (mustot) tartályokba helyezzük, és hozzáadjuk az élesztőket. Az élesztőknek két fajtája létezik: vadélesztő és ipari élesztő. A vadélesztők természetes módon jelennek meg a mustban, míg az ipari élesztőket laboratóriumban tenyésztik ki a későbbi felhasználáshoz. Az ipari élesztők alkalmazása a borkészítés során előnyös lehet, mert biztosítják a pontosabb és megbízhatóbb erjedést [3].

Az élesztőgombák képesek különböző vegyületeket előállítani, amelyek a bor ízének és aromájának alakításában fognak fontos szerepet játszani. Az általuk előállított vegyületek között találhatóak a szőlőfajtától függően különböző észterek, fenolok, szerves savak és más aromás vegyületek.

Az almabor (cider) és a szőlőbor két különböző ital, amelyeknek eltérő az íze és az összetétele. Az almabor különleges ízvilága és sajátosságai miatt kiváló alternatívája lehet a szőlőboroknak. A cider fő összetevője az almálé, amelyet szintén a legtöbb esetben préseléssel nyernek ki. Az almában lévő cukor az erjedés során az élesztők hatására alkohollá alakul át, amelynek következtében az almaborban is alkohol tartalom képződik. A cider íze, illata és textúrája nagyban függ az almáléhez használt almafajtától, a préselés módjától és az érlelési időtől. Az almaborban általában kevesebb alkohol található, mint a szőlőborokban, azonban magasabb sav- és cukortartalommal jellemzi őket. A szőlőbor általában szárazabb, savasabb és kevésbé édes, mint az almabor, míg ezutóbbi ízletes és kellemesen édes lehet [4].

Manapság az almabor egyre nagyobb népszerűségnek örvend. Az egyre növekvő igény kielégítésére az élelmiszeriparban egyre több cider márka jelenik meg. Minden márka igyekszik egyre különlegesebb szín és ízvilágot kialakítani a saját cidereiben. Ezeket sok esetben különböző szintetikus színezékanyagokkal illetve ízfokozókkal érik el.

Felmerül a kérdés, hogy lehetséges volna-e természetes úton, más élesztőgombát használva a fermentáláshoz új cidert alkotni, vagy meglévő, szintetikus anyagokkal előállított ízű és illatú cidert organikus úton előállítani? Vizsgálatunk során az iparban is használt sörélesztő, a *Saccharomyces bayanus* (kontroll) mellett a *Schizosaccharomyces* nemzetség 2 tagjával a *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans* és a *Schizosaccharomyces japonicus* élesztőgombákkal végeztünk fermentációt. Az *S. bayanus*-ról tudjuk, hogy jó fermentációs képességekkel rendelkezik. Kiindulási almaléként a jonagold alma levét használtuk. Az eddig történt kutatások egyelőre az *S. pombe* szőlőlével végzett fermentációjával foglalkoztak, ezért kísérletünkben olyan kérdésekre keressük a választ, amelyekről eddig a tudomány világa kevés válasszal tud szolgálni:

- Vizsgáltuk, hogy az *Sch. pombe* és az *Sch. japonicus* képes-e almalé fermentálására?
- Milyen az egyes törzsek fermentációkinetikai tulajdonsága?
- Az almalében található szacharózt illetve almasavat milyen mértékben tudják hasznosítani?
- Milyen aromaprofílt mutatnak az egyes törzsekkel készített ciderek?

Eredményként szerettünk volna két olyan almabort kapni, amely fogyasztásra alkalmas, új, vagy már létező, de organikus úton előállított ízt ad, a sav- és alkoholtartalma hasonló a hagyományos, sörélesztővel készült cideréhez.

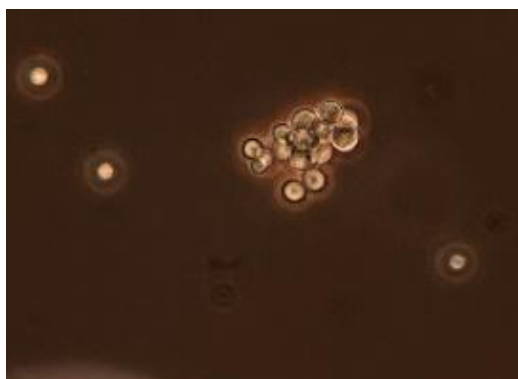
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A három vizsgált gombafaj általános jellemzése

2.1.1. A *Saccharomyces bayanus* általános jellemzése

Az élesztőgombákat fizikai és kémiai hatásokra mutatott tág tűréshatáruk miatt már régóta alkalmazzuk a biotechnológiai iparban. Sokféle fizikai és kémiai stresszhatásra toleranciát mutatnak, ami szintén növeli felhasználásuk jelentőségüket. A modern biotechnológiában a *Saccharomyces cerevisiae* faj a legelterjedtebb [5,6,7,8,9]. Legkiemelkedőbb alkalmazási területei a szeszes ital és bioetanol gyártás, illetve a kovászos kenyér gyártás. Emellett használják még állati takarmánykiegészítők gyártása céljából is [7,10]. Az *S. cerevisiae* részt vehet az emberi mikrobiom kialakításában, egyes változatait (*Saccharomyces boulardii*) alkalmazzák probiotikumként is, bár ez nem veszélytelen. Megfigyeltek olyan esetet mikor a gombák opportunista kórokozókként viselkedtek [3]. Ezeket a kolóniákat kialakító és jellemzően fertőző képleteket gyakran kereskedelmi probiotikumokból és pékélesztőből izolálták [11,12].

A *S. cerevisiae* mellett a borászatban egy nem túl távoli rokonát, a *Saccharomyces bayanus*-t (1. Ábra) alkalmazzák. Ez a gombafaj három másik fajból (a *Saccharomyces uvarum*, a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Saccharomyces eubayanus*) hibridizálódott [13,14]. Az *S. bayanus* tűrőképessége igen magas, jól ellenáll a magas alkoholtartalomnak, illetve nyomásnak. Aktivitása nem csökken alacsonyabb hőmérsékleten, illetve alacsony pH-értéknél sem.



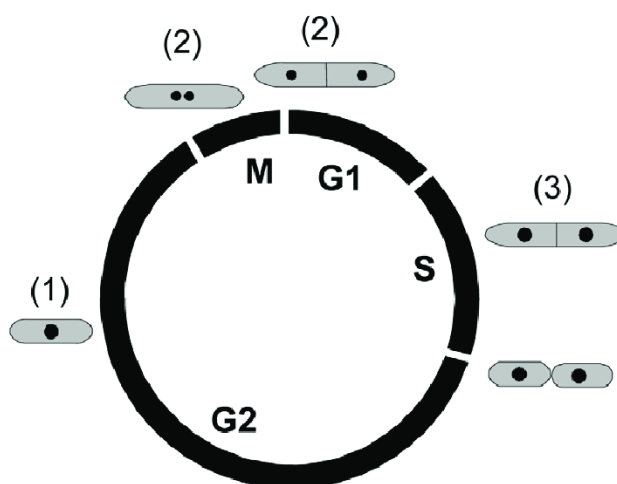
1. Ábra: Az *S. bayanus* mikroszkópos képe, forrás: saját fénykép

2.1.2. A *Schizosaccharomyces pombe* általános jellemzése

A *Schizosaccharomyces pombe* a *Schizosaccharomycetales* rend tagja, melyet 1893-ban Paul Lindner izolált először sikeresen kelet-Afrikai köles sörből. Az 1950-es években a gombát genetikai kutatásokra és a sejtciklus megismerésére használták tesztalanyként [15,16], mivel az *Sch. pombe* sejtei osztódáskor csak a sejt végein nőnek, majd mediális hasadással osztódnak két azonos méretű leánysejtre.

A sejt szaporodás főbb szakaszai a DNS szintézise, amely az S (szintetikus) fázisban megy végbe, ezt követően a sejt magosztódás (mitózis) és a sejtosztódás (citokinézis). A G1 az M és S fázis közötti szakasz, a G2 pedig az S és M fázis közötti szakasz. A hasadó élesztőben a G2 fázis különösen meghosszabbodik, míg a G1 igen rövid és a citokinézis (anya és leánysejt szegregációja) nem történik meg addig, amíg egy új S (szintetikus) fázis be nem indul (2. Ábra). Az *Sch. pombe* olyan mechanizmusok segítségével szabályozza a mitózist, amelyek hasonlóak a többsejtű állatokéhoz. Általában haploid állapotban szaporodik. Éheztetéskor az ellentétes párosodási típusú sejtek diploid zigótát alkotnak, amely azonnal belép a meiózisba, és négy haploid spórát hoz létre. Amikor a körülmények javulnak, ezek a spórák kicsíráznak, és szaporodó haploid sejteket termelnek [21].

2. Ábra: Az *Sch. pombe* általános sejtciklusa, forrás: Cell-Cycle Analysis of Fission Yeast Cells by Flow Cytometry (2023)



A *Sch. pombe* egy egysejtű eukarióta, amelynek sejtei rúd alakúak (2. Ábra). A sejtek általában 3-4 mikrométer átmérőjűek és 7-14 mikrométer hosszúak. Körülbelül 14,1 millió bázispárból

álló genomja a becslések szerint 4970 fehérjét kódoló gént és legalább 450 nem kódoló RNS-t tartalmaz [22].

Az *Sch. pombe* génszekvenciáját 2002-ben tették elérhetővé, így ez a gombafaj lett a hatodik eukarióta modell szervezet, amelynek genomját teljesen megszekvenálták. Ez teljesen felszabadította az benne lévő potenciális kutatási lehetőségeket, és számos, az emberi génekkel ortológ gént azonosítottak benne [23], köztük számos emberi betegségben szerepet játszó gént. 2006-ban publikálták a *Sch. pombe* szinte összes fehérjéjének szubcelluláris lokalizációját, molekuláris címkeként zöld fluoreszcens fehérjét használva [24].

Az *Sch. pombe* két variánssal rendelkezik, amelyek az *Sch. pombe* var. *pombe* illetve az *S. pombe* var. *malidevorans* (3. Ábra) [25,26].

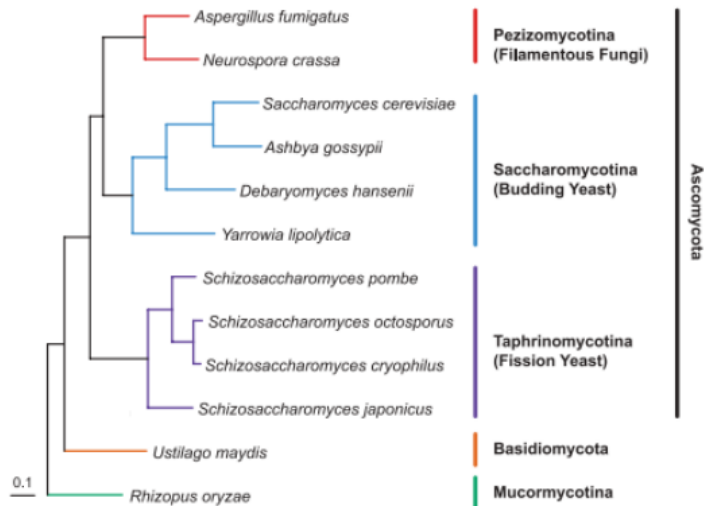


3. Ábra: Az *Sch. pombe* var. *malidevorans* mikroszkópos képe, forrás: saját fénykép

Amellett, hogy a fent említett tulajdonságai miatt kiváló kutatási modell szervezet, a *Sch. pombe* alkalmasnak tűnik ipari használatra is. Hiszen jól tolerálja a pH és hőmérsékletváltozást, illetve a kevés vizet tartalmazó környezetet [17,18]. Ozmofil tulajdonsága miatt a magas cukortartalmú közeget kedveli. Fermentáció során a fermentlében 10-15%-os alkoholtartalom érhető el általa, ami a cider fermentálás szempontjából megfelelő [19]. Kedvezőtlen tulajdonsága lehet az ecetsav termelése, de ez törzsenként eltérő, 0,8-1,4g/L körül mozog [20].

2.1.3. A *Schizosaccharomyces japonicus* általános jellemzése

A *Schizosaccharomyces japonicus* a *Schizosaccharomyces* nemzetség tagja, amelyet először a japán Kyusyu Egyetem eperföldjéről izoláltak [27]. Közele rokona az *Sch. pombe*-nak (4. Ábra) [28].



4. Ábra: A *Sch.japonicus* és *Sch. pombe* filogenetikája, forrás: Rhind és mtsai. (2011)

Az *Sch. japonicus*-nak is pálcika alakú sejtjei vannak, és hasadással osztódik (5. Ábra).



5. Ábra: Az *Sch. japonicus* mikroszkópos fényképe, forrás: saját fénykép

Egyik feltűnő tulajdonsága, hogy a sejtek mérete nagyobb mint az *Sch. pombe*-é, és benne kondenzált mitotikus kromoszómák figyelhetők meg adott körülmények között [29]. Robinow és Hyams kutatók arról számoltak be, hogy „A vegetatív sejtek osztódó magjaiban a kromoszómák viselkedése legjobban a hasadó élesztők nagyobb fajainál tanulmányozható, nevezetesen a *Sch. japonicus* és *Sch. japonicus var. versatilis*.” fajoknál [29]. A *Sch. japonicus* egyértelműen megkülönböztethető az *Sch. pombe*-től, nem csak méretében, hanem a micéliumképző képességében is [30,31]. Abban is különbözik a rokonfajtól, hogy a *Sch. japonicus* nyolc spórás aszkospórát alkot, és jódnegatív [27,30].

A *Sch. japonicus* egy egysejtű eukarióta gomba, amelyet a molekuláris és sejtbiológiai kutatásokban használnak modell szervezetként kis mérete, gyors növekedése és könnyű genetikai manipulálhatósága miatt. Az *Sch. japonicus* haploid élesztő, amely hasadással szaporodik aszexuálisan. Kb. 12,5 megabázisos genommal rendelkezik, amely mintegy 4896 fehérje-kódoló gént tartalmaz (<https://www.japonicusdb.org/status/genome-overview>). Az *Sch. japonicus* genomjának teljes annotálása már megtörtént, ami értékes erőforrást jelentett a sejtes folyamatok genetikai alapjainak megértéséhez [32].

A gomba egyik egyedi jellemzője, hogy tápanyaghányra adott válaszként képes átváltani hifás növekedési állapotba. Ez a folyamat visszafordítható. Azaz, ha a sejtek tápanyagellátása javul, a hifák képesek újra vegetatív sejtekké alakulni. Az *Sch. japonicus* fonalas növekedését széles körben kutatták, és az általa meghatározott molekuláris mechanizmusok is részben ismertek már [33].

Az *Sch. japonicus*-t modell szervezetként használják más sejtfolyamatok, például a sejtosztódás, a DNS replikáció és a sejtpolaritás vizsgálatára is. A kutatók például az *Sch. japonicus*-t használták az anillin fehérje funkciójának tanulmányozásához, amely kritikus szerepet játszik a citokinézisben, abban a folyamatban, amely során az anya- és leánysejtek fizikailag is elválnak egymástól a mitózis után [34]. Az *Sch. japonicus*-nak praktikus alkalmazásai is vannak. Használták az etanol, a megújuló bioüzemanyag előállítására, valamint a heterológ fehérje termeltetésére ipari és gyógyszeripari célból [3].

Összességében az *Sch. japonicus* egy értékes modell szervezet, amely jelentősen hozzájárult a sejtes folyamatok alapjainak megértéséhez. Kis mérete, gyors növekedése és genetikai manipulálhatósága miatt ideális organizmus molekuláris és sejtbiológiai kutatásokhoz és az ipari alkalmazásai sem elhanyagolhatóak.

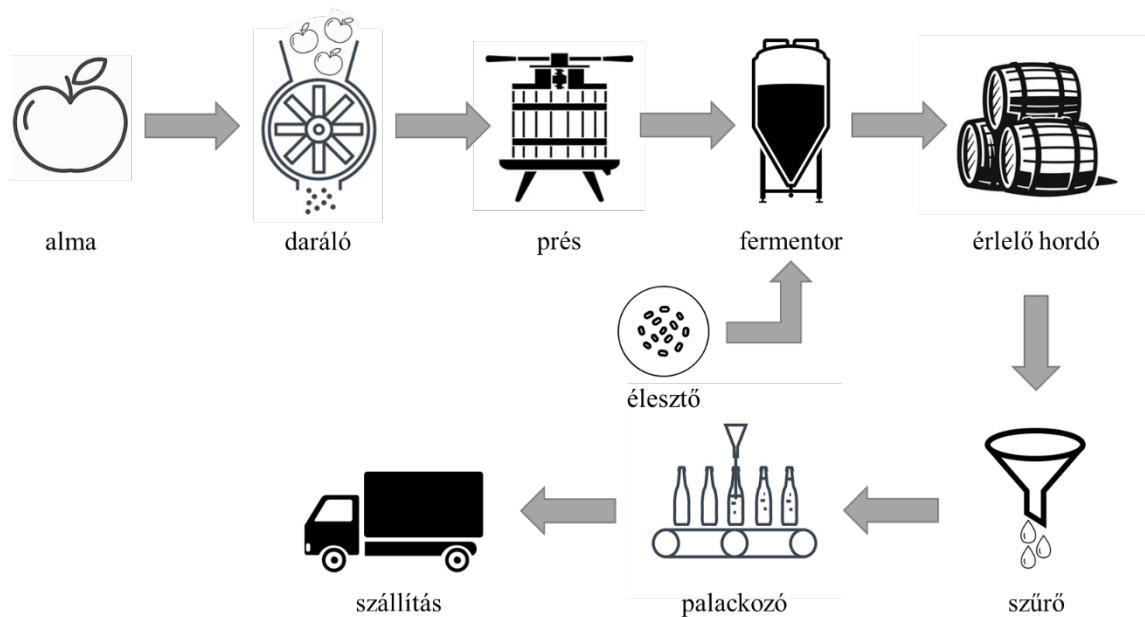
2.2. A cider fermentálás

A cider, vagy almabor készítése sokrétű folyamat, számos tényező befolyásolja. Időigényes művelet, melyet nem lehet sürgetni. A jó cider titka a megfelelő almafaj gondos kiválasztásában rejlik [3]. Az almát leszüretelik, megszabadítják a levelektől, illetve szármagadványoktól, majd ledarálják vagy lereszelik őket, mivel ebben a formában könnyebben kinyerhető belőlük az almalé. Az alma préselése után a kapott présle még tartalmazhat természetes patogén kórokozókat, illetve vad élesztőgombákat. Az ellenük való védekezésnek több lépcsője van. A legtöbb gyümölcsöskertben megmossák az almákat préselés előtt, egyes cégek emellett pasztóritálják az almalevet. Pasztörözéskor a folyadékot hirtelen, rövid időre felmelegítik 60-90 °C-ra, majd gyorsan lehűtik. A folyamat előnye a hagyományos melegítéssel szemben, hogy a cider ízét illetve aromáját kevésbé befolyásolja. A vad élesztőgombák gátlására a pasztörözés mellett alkalmazhatóak még szulfít vegyületek, melyek hatására a gombák nem képesek részt venni a fermentációban, de bennmaradnak a fermentleében [3,35].

A vad élesztőktől előzetesen megtisztított musthoz gyakran adnak starter tenyészetet. Azaz, hozzáadnak egy kiválasztott élesztőt, amely a mustban található cukrot, amely meghatározásához leggyakrabban a Balling, a Brix vagy az Oechsle skálát használják [32,33], metabolikus folyamatok során alkohollá, illetve szén-dioxiddá alakítja. Az erjedési folyamat időtartama az almalé cukortartalmától és a környezeti hőmérséklettől függ. A fermentáció során képződő szén-dioxid elvezetéséről gondoskodni kell [3,35]. A folyamat során ellenőrizni kell az ital hőmérsékletét és pH-ját is.

Az erjedés után az almabor érlelésre kerül. Az érlelés során alakul ki a cider végleges íze és illata [38], amely függ az érlelés időtartamától és körülményeitől.

Mielőtt a kész almabor palackba töltésére sor kerülne, leszűrjük azt, hogy eltávolítsák az esetlegesen benne lévő szilárd anyagokat. A palackozott italt hűvös, száraz helyen tárolják (6. Ábra).



6. Ábra: Az almalé ipari feldolgozás folyamata, forrás: saját szerkesztés

2.3. A Jonagold almalé általános jellemzése

A Jonagold almafajta egy közepesen nagy méretű alma, amelyre gyakran sárga, piros és zöld színek jellemzők. Az alma húsa általában sárgás-fehér, szaftos és édes, enyhén savanykás utóízzel [39].

Ezt az almafajtát az 1940-es években Hollandiában tenyésztették ki, az Jonathan és a Golden Delicious almafajták keresztezésével. Azóta világszerte nagyon népszerűvé vált az ízletessége és szép megjelenése miatt [35].

Egy másik forrás szerint 1943-ban New York államban a New York State Agricultural Experiment Station-ben hozták létre a két fent említett almafaj keresztezésével, majd 1968-ban kezdték el az iparban használni.

A Jonagold almának közepesen vastag a héja, amely hasznos a gyümölcs szállítás során. Az alma húsa tömör és rostos, amely azonban mégis könnyen rágható. Az almafelület egyenetlen és enyhén csúszós lehet, de a többi fajtaéhoz hasonlóan érdemes a mosás előtt megtisztítani [36].

Összességében a Jonagold almafajta egy ízletes és könnyen fogyasztható alma, amely jól megőrzi az ízét a tárolás során is. Kiválóan alkalmas friss fogyasztásra, de használják sütéshez, főzéshez és egyéb ételkészítési módszerekhez is [40].

A Jonagold almafajta használata a borászatban lehetőséget ad az alma aromájának és ízének átültetésére a borba. Az almabor készítésekor fontos, hogy az almát jó minőségű és érett állapotban használják fel, mivel ez javítja a bor minőségét [40].

Az almabor készítéséhez az almát először préselik, majd az így nyert mustot erjesztik. Az almabor lehet száraz vagy édes ízű, és hagyományos vagy modern technikákkal lehet elkészíteni [3,35,40]. Kiválóan illik a különféle étel- és desszertfajtákhoz, és jó alternatíva lehet a hagyományos borok mellett. Az alma egyedülálló ízvilága és aromája miatt az almabor egy egyedi és érdekes választás lehet a borok szerelmeseinek [3,40].

3. A kísérlethez használt anyagok és módszerek

A kiválasztott törzsek tenyésztését, a fermentációs műveletet, illetve az eredmények kiértékelését a Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén végeztük. Az analitikai vizsgálatot a Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutató Nonprofit Kft. Tarcali laboratóriumában végezték el.

3.1. Táptalaj előkészítése

A kísérlet első lépéseként táptalajt készítettünk a gombák szaporításához. YPA táptalajt alkalmaztunk, melynek összetétele a következő:

- 1% Élesztőkivonat
- 1% Pepton
- 10% Glükóz
- 3% Agar

A táptalaj hozzávalóit analitikai mérlegen mértük ki 4 tizedes pontossággal. Ezt követően desztillált vízben oldottuk fel őket. A pH-t 5-re állítottuk borkósavval ($C_4H_6O_6$). A kész táptalajt autoklávozással sterilizáltuk.

3.2. Gombák felszaporítása

A táptalajt Petri-csészékbe öntöttük, majd rájuk leoltottuk a három szaporítani kívánt gombafajt, amelyeket az alábbi 1.Táblázat tartalmaz.

Faj	Törzs szám ¹
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> var. <i>malidevorans</i> ¹	9-1
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	7-286
<i>Saccharomyces bayanus</i>	10-1668

¹A Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményében szereplő törzsszámok

1.Táblázat: Az alkalmazott gombafajok és törzs számuk, forrás: saját szerkesztés

A szaporítás végén tömény sejtuszuspenziót készítettünk desztillált vízzel. Az eredményül kapott elegy tisztaságát mikroszkóp alatt ellenőriztük, majd Bürker-kamrás sejtszámolással következtettünk a benne található sejtmennyiségre.

3.3. Fermentációs vizsgálat előkészítése

Minden fermentáló lombikba 300ml jonagold almalevet mértünk ki. Az almalé préselt, pasztőrözött, rostos Jonagold almából készült. A pH-ja 3,8 körül volt 12,8%-os Brix értékkel. Az almalé fajsúlya 1.0518 N/m^3 , a Brix érték alapján 6,9%-os alkoholszintre számíthattunk. Egy-egy lombikba $4 \cdot 10^6$ sejt/ml koncentrációjú élesztőgomba oldatra volt szükség a hatékony fermentációhoz. Mindegyik gombával 2 fermentációt végeztünk 3 lombikban.

3.4. A *Schizosaccharomyces* élesztőtörzsek fermentációkinetikai vizsgálata az almalében

A fermentációt egy stabil hőmérsékletű zárt helyiségben végeztük el közel állandó 22°C-os hőmérsékleten. Erjesztés közben a felszabaduló szén-dioxid a lombikok dugójába helyezett üvegcsövön keresztül távozott. Ezt a jelenséget felhasználva a lombik súlyának 24 óránként való mérésével nyomon követhettük a fermentáció előrehaladását. Az erjesztést akkor állítottuk le, mikor két egymást követő napon már nem volt tapasztalható tömegváltozás. Hogyan számoltuk a termelt CO₂ mennyiséget? Ahány g volt a súlyvesztés, annyi g? A súlyvesztés arányos volt a megtermelt CO₂ mennyiségével.....??? Valamit írjunk ide.

3.5. A fermentlevek analitikai vizsgálata

A fermentáció végeztével a fermentleveket analitikai összetétel vizsgálat céljából a Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetébe küldtük. A vizsgálatához Bruker Alpha II FTIR Spektrofotométert használtak. A minták kiértékelését az Opus 7.8. szoftver alkalmazásával készítették, központi kalibráció alapján. (https://www.foodbites.eu/j15/images/stories/foodbites/pdf/an97_alpha_wineanalyzer_en.pdf)

4. Eredmények és megbeszélésük

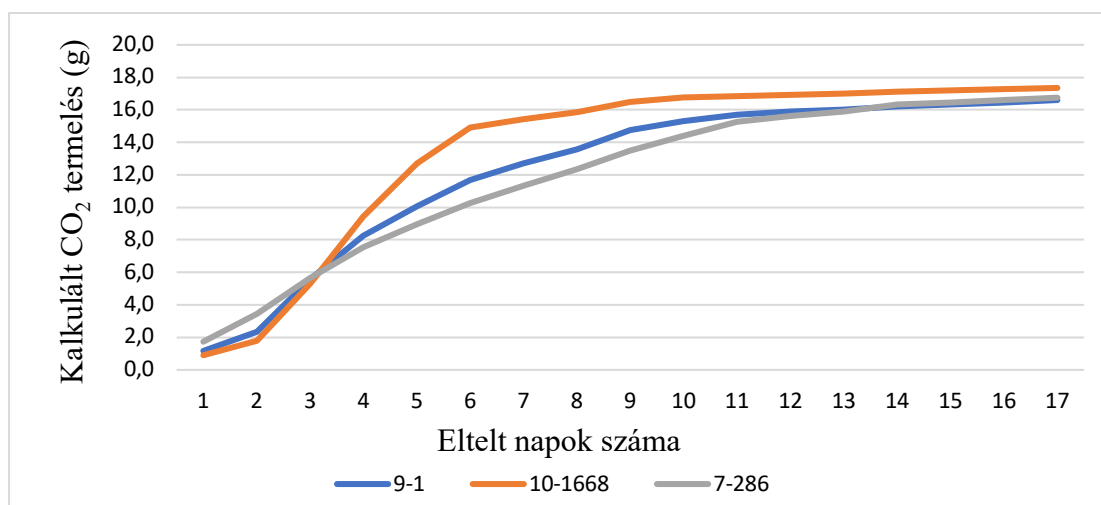
4.1. Erjesztés-kinetikai vizsgálatok az almalében

A fermentációs kísérletet a 7. Ábrán látható „kutyogós” lombikokban végeztük. Erjedés mindhárom élesztőgomba törzs esetén történt.



7. Ábra: Erjesztés-kinetikai vizsgálat „kutyogós” lombikokban forrás: saját fénykép

A kísérlet során 24 óránként lemértük a lombikok súlyát táramérlegen, a súlyvesztésből következtettünk a termelt szén-dioxid mennyiségére, amelyet a 8. Ábra szemléltet.



8. Ábra: A vizsgált élesztőtörzsek fermentációja során termelt CO₂ mennyisége forrás: saját ábra

(Mindegyik törzzsel 3 fermentációt hajtottunk végre. A 3 azonos törzs CO₂ termelési adatait átlagoltuk a konzisztensebb eredmény érdekében. A 10-1668 törzs második lombikján a 11. napon mérés közben eltört a parafadugóba szerelt üvegcső, így ezt a gombafajt a két sértetlen, steril fermentáció alapján értékeltük).

A leggyorsabb és leghatékonyabb fermentáció az *S. bayanus* (10-1668) törzset tartalmazó lombikokban ment végbe. Az aktív növekedési ciklus körülbelül 48 óra alatt ért véget. A törzsnek az aktív növekedési szakasz végétől számítva 7-8 napra volt szüksége az erjedéshez, amely során 17,4 g szén-dioxid termelődött.

Az *Sch. pombe* var. *malidevorans* (9-1) törzs reakciókinetikai görbéje az *S. bayanus*-éhoz hasonló. Ennek az élesztőnek szintén kb. 2 napra volt szüksége, hogy meginduljon a fermentáció. Az erjedés a 2. és 8. nap között volt a legaktívabb, a folyamat közben habképződést tapasztaltunk (9. Ábra). Az utóerjedési fázis a 9. és 13. nap alatt ment végbe. A fermentáció a 14-15. napon véget ért. Az *Sch. pombe* a folyamat során 16,6 g CO₂-t termelt.



9. Ábra: A 9-1-es és 7-286-os élesztő esetében tapasztalt habképződés a fermentáció közben, forrás: saját fénykép

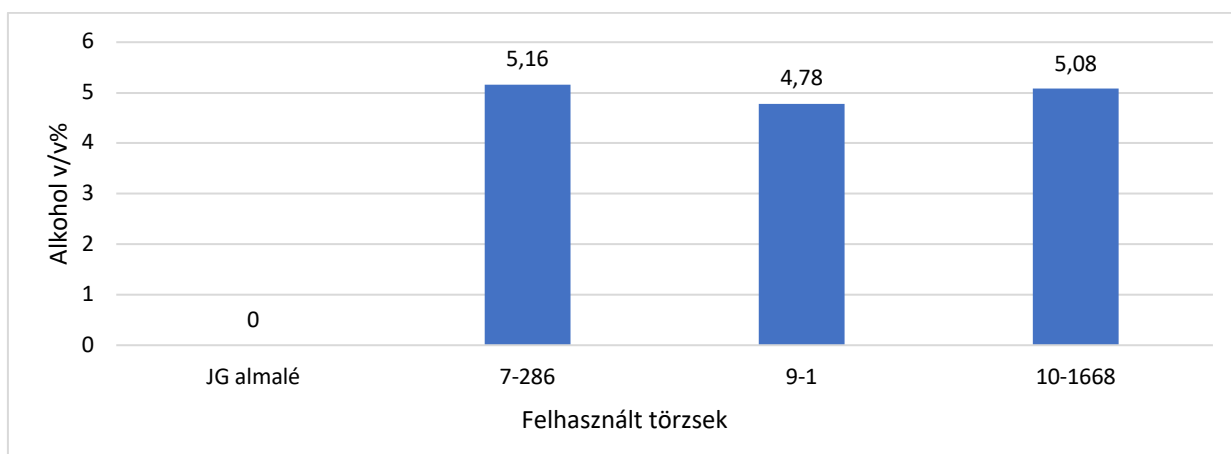
Az *Sch. japonicus* (7-286) szinte azonnal elérte az aktív szaporodási szakasz végét. A 10. napig viszonylag konzisztensen folyt a fermentáció. Az utóerjedés a 11. naptól a 16. napig tartott. Az *Sch. japonicus* az *Sch. pombe* var. *malidevorans*-tól valamivel több, 16,8 g CO₂-t

termelt, amelyet jelentősebb habképződés kísért, mint az *Sch. pombe* var. *malidevorans* esetében. (9. Ábra)

Megállapíthatjuk, hogy az *Sch. pombe* erjesztés-kinetikai szempontból nagyon hasonló értékeket mutatott az *S. bayanus*-hoz. CO₂ termelése kevesebb mint 5% -al tért el. Az *Sch. japonicus* is ígéretes, gyorsabban elérte aktív szaporodási fázist, viszont hosszabb fermentációs időre volt szüksége, mint az *Sch. pombe*-nak vagy az *S. bayanus*-nak. Az *Sch. japonicus* mindössze 3,5% -al kevesebb szén-dioxidot produkált, mint a kontroll, *S. bayanus*. Mindkét *Schizosaccharomyces* törzsnél tapasztalható volt habképződés, az *S. bayanus*-nál nem.

4.2. A ciderek analitikai-kémiai összetételének összehasonlítása

Erjesztés-kinetikai szempontból az *Sch. pombe* hasonlított jobban az *S. bayanus* élesztőre, de az *Sch. japonicus* esetében sem tapasztaltunk túl nagy eltéréseket. Hogy pontosabb képet kapjunk a két vizsgált *Schizosaccharomyces* törzs fermentációs tulajdonságairól a kész cidereken analitikai vizsgálatot végeztünk. A vizsgálatokat a fermentálékban található alkohol térfogatszázalékos mennyiségének mérésével kezdtük. Az eredményeket a 10. Ábra szemlélteti.

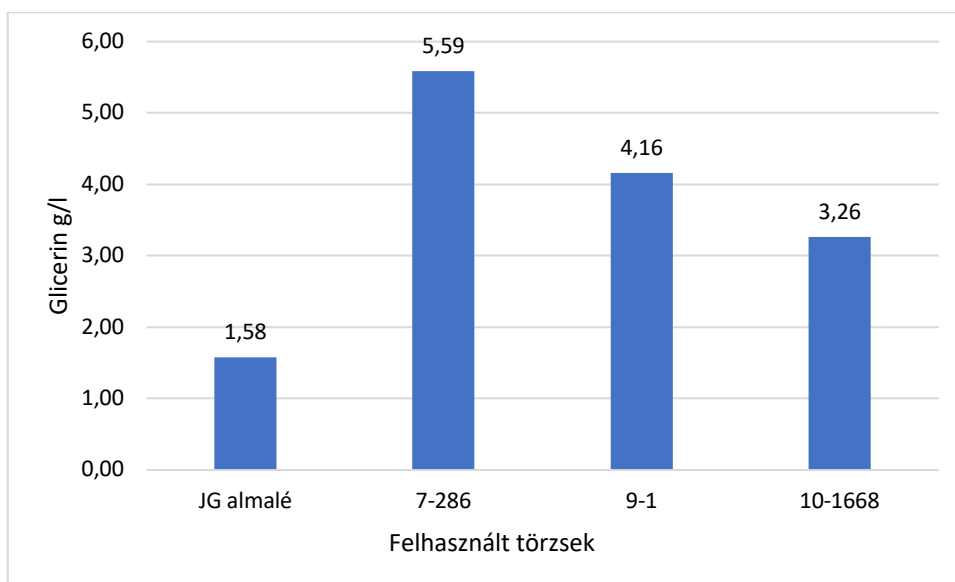


10. Ábra: A fermentlevekben található alkohol térfogatszázalékos aránya, forrás: saját ábra

Az almalé Brix értéke (12,8%) alapján 6,9 v/v% -os alkoholszintre számítottunk. Ezt az értéket egyik fermentáció esetében sem sikerült elérnünk. Kísérletünk során az *Sch. japonicus* érte el a legmagasabb, 5,16%-os alkoholszintet. Ezt a törzset az *S. bayanus* követte 5,08% -os értékkel, majd az *Sch. pombe* következett 4,78% -al. A kapott adatok alapján a *Schizosaccharomyces* törzsek közül az *Sch. japonicus* bizonyult hatékonyabbnak. A két

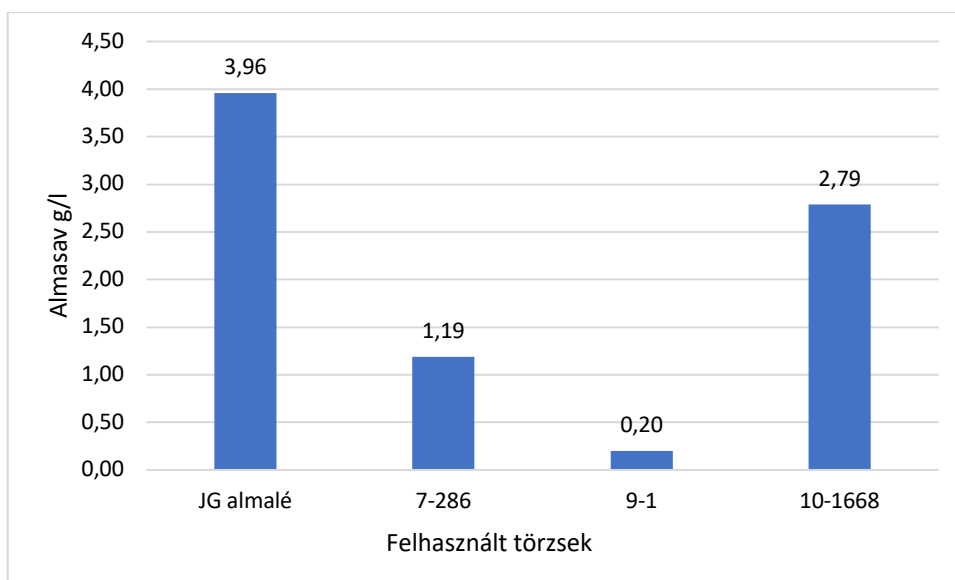
Schizosaccharomyces törzs között 0,38% -os eltérést tapasztalunk az alkoholszint tekintetében. Mivel a forgalomban lévő ciderek alkoholszintje 1,2-8,5% között van [41], ezért e tekintetben, megfelelőnek tekinthetők a vizsgált törzseink. A magasabb alkoholtartalom általában a magasabb sejtaktivitás jele. Az alkoholos italok fermentációja során kedvező a nagy sejtaktivitás, mert az élesztőgombák anyagcserefolyamatai során olyan vegyületek is keletkezhetnek, amelyek pozitív hatással lehetnek a kész cider ízére, illatára [41].

Több kutatás is foglalkozott már a *Schizosaccharomyces pombe* törzsek fermentációs képességeik vizsgálatával. Ezek kimutatták, hogy szőlőlével végezve a fermentációt ezen törzsek hatékonyabb glicerintermelők mint a *Saccharomyces* törzsek [42]. Ezek a megfigyelések igaznak bizonyultak a mi kísérletünk során is. A 11. Ábra a törzsek által termelt glicerinnennyiséget szemlélteti.



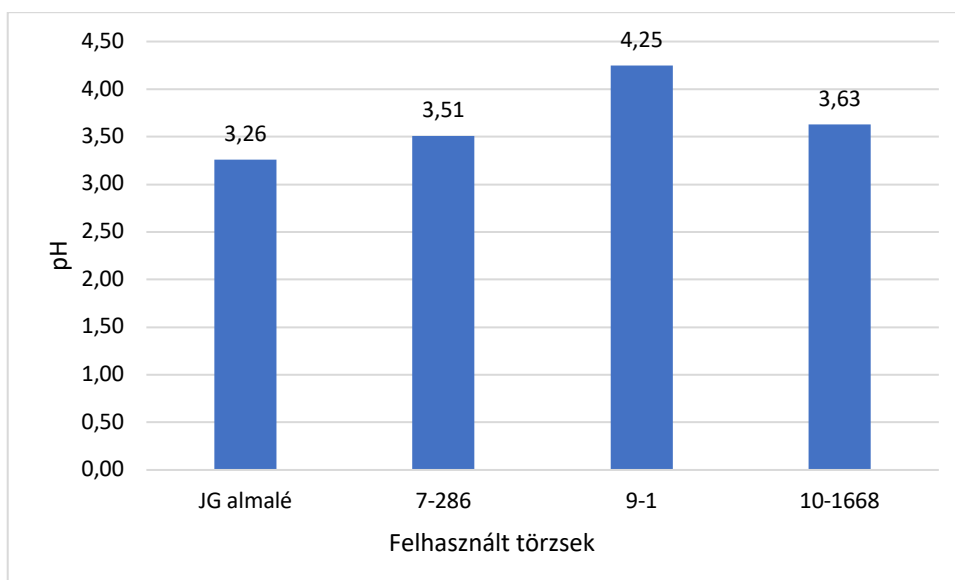
11. Ábra: A glicerinnennyisége a fermentlevekben, forrás: saját ábra

A 7-286-os *Sch. japonicus* termelte átlagosan a legtöbb 5,59 g/l glicerint. A 9-1-es *Sch. pombe* ennél kevesebbet, 4,16 g/l-t termelt. A legkevesebb glicerint, 3,26 g/l-t a 10-1668-as *S. bayanus* termelte, amely 42% -al kevesebb mint a *Sch. japonicus* termelése. Mivel az alkohol és a glicerintermelés szoros kapcsolatban áll egymással [43], arra következtethetünk ez alapján a két paraméter alapján, hogy mindkét vizsgált nem-saccharomyces törzs megfelelő fermentációs képességekkel rendelkezik a jonagold almalevek fermentálásához. A megfelelő glicerol tartalom különösen fontos például a borok testessége szempontjából. A továbbiakban egy másik fontos tulajdonságot, a fermentlevekben található almasav mennyiségét vizsgáltuk, amelyet a 12. ábra szemléltet.



12. Ábra: Az almasav mennyisége a fermentlevekben, forrás: saját ábra

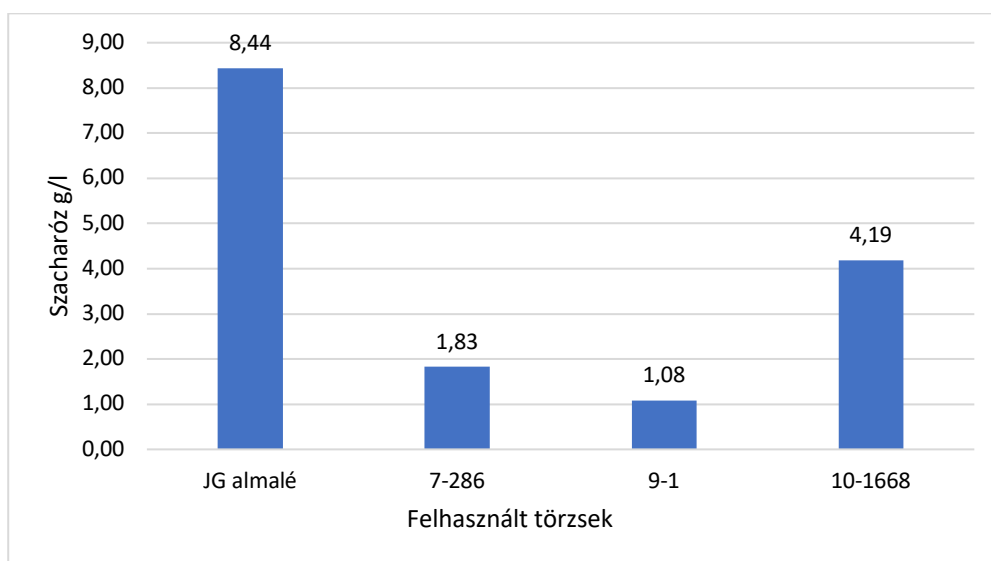
Almasav fogyasztás tekintetében a 10-1668-as *S. bayanus* bizonyult a legkevesbé hatékonynak 2,79 g/l-es koncentrációt hagyva az almalében. A két *Schizosaccharomyces* faj ennél lényegesen többet fogyasztott. Közülük a 7-286-os *Sch. japonicus* bizonyult kevésbé hatékonynak. Ez az élesztő 1,19 g/l-es almasavkoncentrációt hagyott a ciderben. A 9-1-es *Sch. pombe* szinte az összes almasavat elfogyasztotta, 0,2 g/l-t hagyva a fermentlében. Az *S. bayanus* az eredeti 3,96 g/l almasavtartalom mintegy 70%-át, a *Sch. japonicus* 30%, a *Sch. pombe* pedig 5% almasavtartalmat hagyott a fermentáció végeztével. Az *Sch. pombe* esetében tapasztalt nagy különbséget a malolaktikus fermentáció okozhatta, amely az alkalmazott *Sch. pombe* var. *malidevorans* egyik jellemzője. Az fokozottabb almasavbontás kedvező lehet, emeli az aromatartalmat, lágyabbá teszi a borokat, illetve csökkenti a fiatal borok „zöld” ízét. Sok esetben baktériumokkal végeztetik el ezt a feladatot [44]. A laktózbaktériumok alkalmazását azonban az ipar igyekszik elkerülni [43], ezért ezek alapján az adatok alapján a *Schizosaccharomyces* törzsek fokozottabb almasavbontási képessége kedvező lehet. A 9-1-es *Sch. pombe* almasav fogyasztása volt a legerőteljesebb, amelyet a pH-ja is jól prezentál. Ez a törzs használta fel a legtöbb almasavat, ami a savas pH-ért lenne felelős, így ennek lett a legkevesbé savas a pH-ja. A ciderek pH értékeit a 13. Ábra szemlélteti.



13. Ábra: A ciderek átlagos pH értéke, forrás: saját ábra

Ahogy az a 13. ábrán is látható a 7-286-os *Sch. japonicus* produkálta a legalacsonyabb, 3,51-es átlagos pH értéket. Ebben az esetben volt a legalacsonyabb a pH-növekedés. Hozzá hasonló 3,63-as pH-t kaptunk a 10-1668-as *S. bayanus* -al végzett fermentációban is. Az *Sch. pombe* pH-ja 4,25-re növekedett, ami a ciderfermentálás szempontjából pozitív, mivel a 3,8 -as pH alatt olyan organizmusok kezdenek el növekedni, amelyek az ital romlásához vezetnek, anyagcseretermékeik kellemetlen ízt és illatot okoznak [45]. Ez alapján a mi esetünkben az ipar számára az *Sch. pombe* alkalmazása a legkedvezőbb.

A három vizsgált törzs cukorfogyasztási adataiból a szacharózfogyasztásuk mutatott még eltérő adatokat. A törzsek által elfogyasztott szacharóz mennyiségét a 14. Ábra szemlélteti.



14. Ábra: A szacharóz mennyisége a fermentlevekben, forrás: saját ábra

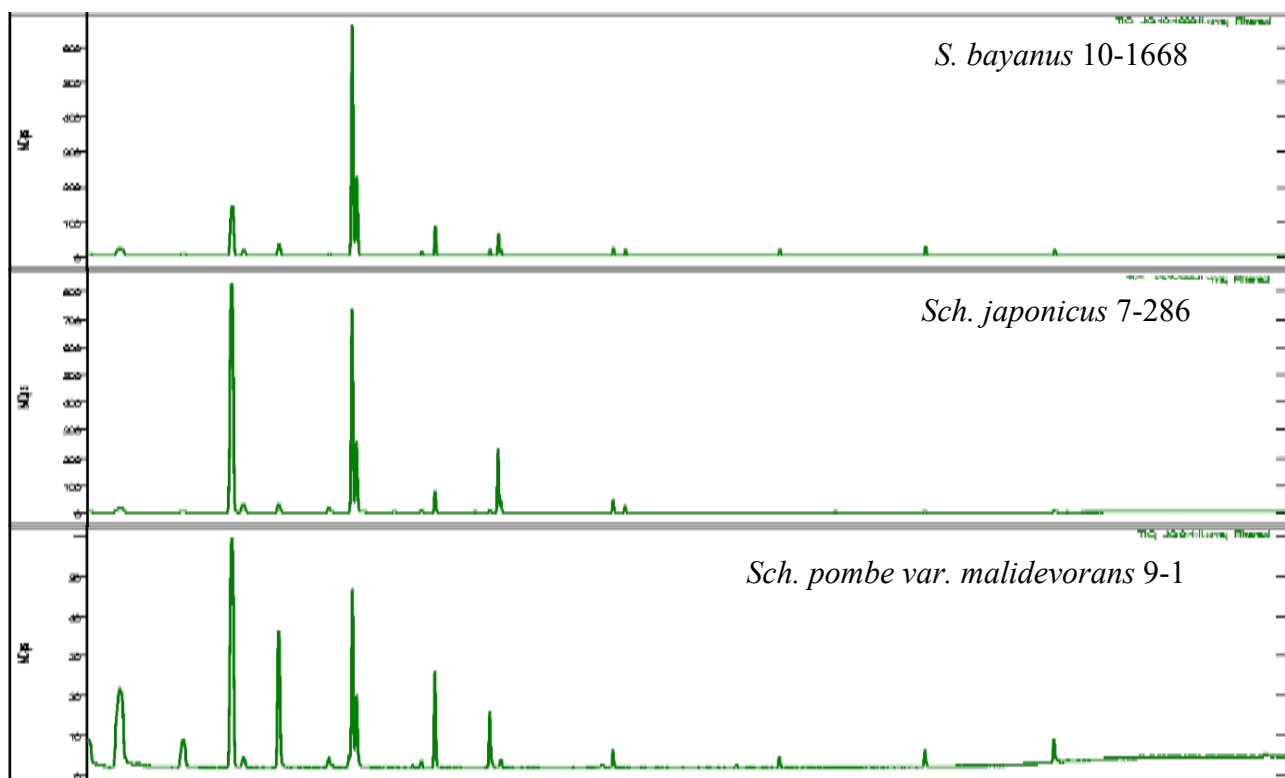
A 14. Ábráról jól leolvasható, hogy a legtöbb cukrot a 9-1-es *Sch. pombe* fogyasztotta. A kiindulási almalé 8,44 g/l szacharóztartalmának a *Sch. pombe* majdnem 87%-át hasznosította. Ebben a fermentációban a cukorkoncentráció 1,08 g/l-re csökkent. Hasonló 1,83 g/l-es értéket kaptunk a 7-286-os *Sch. japonicus* -al fermentált ciderben is. Az *S. bayanus* az almalé szacharóztartalmának 50%-át használta el. A répacukor (szacharóz) fogyását az is jelezte, hogy mindkét *Schizosaccharomyces* törzs esetében tapasztaltunk habképződést, amely cukor anyagcserében való lebontása során keletkező hatékony szén-dioxid termelés jele.

A múltban a *Schizosaccharomyces* nemzetséget jelentős ecetsav termelése miatt nem alkalmazták a fermentációs iparban, mivel a magas ecetsav koncentráció kellemetlen ízt eredményez [47]. Ezért a mintáinkban az ecetsav mennyisége is mérésre került. Az adataink azt mutatták, hogy a 10-1668 kontroll törzs 0,54 g/l, míg a 7-286 *Sch. japonicus* 0,65 g/l, a 9-1 *Sch. pombe* 0,62 g/l ecetsavat termelt. Azaz, a hasadó élesztők kicsivel több ecetsavat termeltek, mint a kontroll törzs, ami nem feltétlenül kívánatos tulajdonság.

4.3. A ciderek aromaprofiljainak analitikai összehasonlítása

A továbbiakban az aromaprofiljait elemeztük ki. A három vizsgált élesztőfaj által fermentált cider gázkromatográfiás aromaprofiljai a 15. ábrán láthatóak. A kromatogramokon jól látszik, hogy a három élesztő erős hasonlóságot mutat. Az *S. bayanus* és *Sch. japonicus* törzsek által fermentált ciderek kromatogramjai különösen hasonlóak, első felük szinte teljesen megegyezik. A kromatogramok második felében az *S. bayanus* és *Sch. pombe* var. *malidevorans* között tapasztalunk nagyobb hasonlóságot.

A kromatogramok közötti különbséget a 3. táblázat szemlélteti, melyben az első oszlopban találjuk a detektált vegyületek nevét. A második, harmadik és negyedik oszlopban „x” -el jelölve láthatjuk, hogy az adott sorban szemléltetett vegyület, melyik ciderben volt észlelhető. Az ötödik oszlopba találhatóak a vegyületek által okozott ízek, illatok



15. Ábra: A vizsgált cider minták gázkromatográfiás kromatogrammja, forrás: saját szerkesztés

Az aromakomponensek között jópárat találunk, amely 2 vagy akár mindhárom élesztőben is megtalálható. A 3. táblázatban fentről lefelé haladva az első ilyen vegyület az etil-acetát (Ethyl Acetate), amely édes, gyümölcsös illatot okoz. Az almabor alkoholos illatát az 1-propanol, az izoamil-alkohol (1-Butanol, 3-methyl-) adják. Szintén alkoholos, de inkább a ragasztó illatára emlékeztető illatot okoz a 2-metil-1-butanol, amely szintén mindhárom ciderben megtalálható volt.

A kész almabor gyümölcsös illatát és ízét a karbonsav butil-, etil- és hexilészter vegyületek okozzák az etil-acetáton kívül. Ezek közül 3 olyan aromakomponenset detektáltunk, amely mindhárom fermentlében megtalálható volt. Ezek a butánsav, etilészter (Butanoic acid, ethyl ester) amely ananászra emlékeztető illatot kölcsönöz, az ecetsav, butilészter (Acetic acid, butyl ester) ami lédús, gyümölcsös aromájú és a Dodekánsav, etilészter (Dodecanoic acid, ethyl ester) amelynek az illata a babérolajra emlékeztet.

Megfigyeltünk olyan összetevőket is, amelyek csak 1 esetleg 2 ciderben volt megtalálható. Ezek közül jelentős az etil-palmiát (Hexanoic acid, ethyl ester). Ez a vegyület kellemes viaszos aromát okoz a fermentlében, illata az ananászéhoz hasonló. Az etil-pamiátot az *Sch. pombe var. malidevorans*-ból illetve az *S. bayanus*-ból tudtuk csak kimutatni. Mindkét

Schizosaccharomyces faj esetében detektáltunk 1-hexanol vegyületet, amely erős fűszeres illat, a frissen vágott fű illatára emlékeztet.

A kontroll élesztő (*S. bayanus*) két olyan aromakomponenst termelt, amelyet a *Schizosaccharomyces* fajok esetében nem detektáltunk. Az *Sch. pombe* var. *malidvorans* és az *Sch. japonicus* fajoknál megfigyeltünk néhány olyan komponenst is, amelyek csak az adott fermentlé tartalmazott. Ezek közül fontosabb vegyület volt az izobutil-acetát (Isobutyl acetate) amelyet az *Sch. japonicus* által erjesztett almalében találtunk. Az izobutil-acetát kellemes virágillatot eredményez. Említésre méltó még az 1-butanol-2-metil-acetát (1-Butanol, 2-methyl-, acetate), melynek édes, banánra hajazó illata van.

VEGYÜLET	10-1668	7-286	9-1	ÍZ/SZAG
2H-PYRAN, TETRAHYDRO-2-(2,5-UNDECADIYNYLOXY)-	X			Ismeretlen
1-PROPANOL	X		X	Etil-alkoholra emlékeztető
ETHYL ACETATE	X	X	X	Édeskés, gyümölcsös
BORONIC ACID, ETHYL-	X	X		Szagmentes
1-BUTANOL	X	X	X	Kellemetlen
PROPANOIC ACID, ETHYL ESTER	X	X	X	Ananászszzerű aroma
1-BUTANOL, 3-METHYL-	X	X		Balzsamos, alkoholos
1-BUTANOL, 2-METHYL-	X	X	X	Ragasztószerű, alkoholos
BUTANOIC ACID, ETHYL ESTER	X	X	X	Ananász
ACETIC ACID, BUTYL ESTER	X	X	X	Gyümölcsre emlékeztető
2H-PYRAN-2-ONE, TETRAHYDRO-3,6-DIMETHYL-	X			Ismeretlen
1-BUTANOL, 3-METHYL-, ACETATE	X	X		Banános
HEXANOIC ACID, ETHYL ESTER	X		X	Ananászéhoz hasonló
ACETIC ACID, HEXYL ESTER	X	X		Ecetes illat, savanyú íz
OCTANOIC ACID, ETHYL ESTER	X		X	Almahéjhoz hasonló
DECANOIC ACID, ETHYL ESTER	X		X	Almahéjhoz hasonló
DODECANOIC ACID, ETHYL ESTER	X	X	X	Babérolaj illat
PREG-4-EN-3-ONE, 17A-HYDROXY-17B-CYANO-		X		Ismeretlen
THIRANE		X		Kellemetlen
ISOBUTYL ACETATE		X		Gyümölcsös, virágillat

1-HEXANOL		X	X	fűszer illat, frissen nyírt fű illata
PENTANOIC ACID, 3-METHYL-, ETHYL ESTER		X		Ismeretlen
1-DECEN-4-YNE, 2-NITRO-			X	Ismeretlen
8,11-OCTADECADIENOIC ACID, METHYL ESTER			X	Olajos, fás illat
DL-HOMOSERINE			X	Szagtalan
2-PROPENOIC ACID, PENTYL ESTER			X	Ismeretlen
1-PENTANOL			X	kellemetlen
1-BUTANOL, 2-METHYL-, ACETATE			X	édes banánra emlékeztető

3. Táblázat: A kísérlet eredményeképp kapott 3 cider aromaprofilja az élesztők szerint,
forrás: saját szerkesztés

Adataink alapján a két *Schizosaccharomyces* törzs sok tekintetben megfelelő lehet cider erjesztésére. Habár az ecetsavelőállítási képességük magasabb volt, mint a kontroll törzs, az alkohol és glicerintermelés, almasavfogyasztás, szacharózfogyasztás tekintetében a jonagold almalével végzett ciderfermentáció során kedvezőnek tekinthetők a képességeik. Akár önállóan, vagy *S. cerevisiae*, vagy *S. bayanus* törzsekkel végzett együttes fermentációban új aromaanyagokkal gazdagíthatják a végterméket. Érdemes őket tovább vizsgálni és az erjesztési körülményeket tovább optimalizálni.

5. Összefoglalás

Manapság egyre több teret hódítanak maguknak a könnyed, valamilyen formában ízesített alkoholos italok. A cégek próbálnak egyre színesebb, változatosabb portfóliót előállítani. A különböző ízeket azonban nem csak természetes adalékanyagokkal, hanem gyakran szintetikus vegyszerekkel érik el. Kísérletünkben két, az iparban nem, vagy kevéssé elterjedt élesztőt, a *Schizosaccharomyces japonicus* illetve a *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*-t hasadó élesztőket vizsgáltuk. Az *Sch. pombe* fajt egy afrikai sörből izolálták, míg a *Sch. japonicus*-t eperléből. Így felmerült a kérdés hogy, alkalmasak lehetnek-e almalé fermentálásra. Kontroll élesztőként a *Saccharomyces bayanus*-t használtuk, amely manapság felváltotta az élelmiszeriparban jelentős múlttal rendelkező *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztőt.

Az erjesztési folyamat fermentációkinetikai vizsgálata során megfigyeltük, hogy a legtöbb CO₂-t a *S. bayanus* termelte. Az *Sch. pombe* és az *Sch. japonicus* közel azonos mennyiséget termelt, azonban az erjesztésük tovább tartott. Az *Sch. japonicus* esetében viszont pozitívként kiemelhető, hogy az erjedési folyamat szinte azonnal elindult. Ezzel szemben, az *Sch. pombe* és az *S. bayanus* esetében csak 36-48 óra elteltével indult be a fermentáció.

Az analitikai vizsgálatok bővebb betekintést adtak a lezajlott fermentációs művelet mögé. Rávilágítottak az egyes vizsgált gombafajok néhány előnyére és hátrányára is. Az alkoholszint és glicerintermelés alapján az *Sch. japonicus*, almasavfogyasztás, pH és szacharózfogyasztás szempontjából nézve az *Sch. pombe* var. *malidevorans* bizonyult hatékonyabbnak az elvégzett fermentációs műveletben. Ugyan az *Sch. japonicus* is mutatott pozitív értékeket, a ciderfermentációs iparban mégis az *Sch. pombe* alkalmazása lehet célravezetőbb, a vele elért 3,8-as pH feletti eredmény miatt.

A gázkromatográfiás aromaprofil vizsgálat egyértelműen megmutatta, hogy magas szintű hasonlóság mutatkozik mindhárom élesztővel erjesztett cider esetében. Az *S. bayanus* illetve az *Sch. japonicus* főbb aromakomponenseiket tekintve jobban hasonlítottak egymásra, azonban a mellékkomponensek tekintetében a *Sch. pombe* var. *malidevorans* mutatott nagyobb hasonlóságot a kontroll, az iparban már alkalmazott élesztővel.

Végeredményül megállapíthatjuk, hogy a *Schizosaccharomyces japonicus* és a *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans* alkalmas és költséghatékony lehet az

élelmiszeripar számára mind fermentációkinetikai, analitikai és aromaprofil tulajdonságait tekintve. Az *Sch. japonicus* a jonagold almalé esetében ígéretes, a fermentációs körülmények további optimalizálása jobb eredményeket eredményezhet. Megállapíthatjuk, hogy érdemes a jövőben vele további kutatásokat végezni.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a Lajtosné Takács Szonjának, a Debreceni Egyetem doktorandusz hallgatójának az útmutatást és segítséget, amelyet a laboratóriumi munka során, illetve a dolgozat megírása alatt nyújtott tanácsaival, észrevételeivel. Köszönöm Szonja, jó volt együtt dolgozni!

Köszönöm témavezetőmnek, Gálné Dr. Miklós Idának, hogy a szakdolgozatomhoz szükséges kísérlethez helyet biztosított nekem a Debreceni Egyetem és a Genetika és Alkalmazott Mikrobiológia tanszékének laboratóriumában és köszönöm, hogy lektorálta munkámat.

Hálás vagyok a Tokaj Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet (Tarcál) munkatársainak, hogy segítettek a fermentlevek analitikai vizsgálatában.

Köszönöm Dr. Kutas Dávid barátomnak, aki végig mellettem állt és segítette munkám tapasztalatával és tanácsaival.

Végül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, családomnak és barátaimnak, akik tanulmányaim során végig mellettem álltak.

7. Forrásjegyzék

- [1] Charters, Steve. Wine and society. Routledge, (2006)., 47-133.
- [2] Merwin, I. A.; Padilla-Zakour O. I. and Valois S. (2008) Cider Apples and Cider-Making Techniques in Europe and North America.; Horticultural Reviews 34:365-415.
- [3] the best of Brew your own CIDERMAKING magazin, Copyright © (2020) Battenkill Communications, Inc.
- [4] Downing, Donald L. Apple cider. Processed apple products, (1989) 169-188.
- [5] Strobe, P. K., Skelly, D. A., Kozmin, S. G., Mahadevan, G., Stone, E. A., Magwene, P. M., ... & McCusker, J. H. (2015). The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome research*, 25(5), 762-774.
- [6] Duan, S. F., Han, P. J., Wang, Q. M., Liu, W. Q., Shi, J. Y., Li, K., ... & Bai, F. Y. (2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature communications*, 9(1), 2690.
- [7] Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J. X., Pflieger, D., Bergström, A., ... & Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556(7701), 339-344.
- [8] Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). Domestication of industrial microbes. *Current biology*, 29(10), R381-R393.
- [9] Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., ... & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.
- [10] Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology*, 16(10), 2091-2102.
- [11] Pfliegler, W. P., Boros, E., Pázmándi, K., Jakab, Á., Zsuga, I., Kovács, R., ... & Pócsi, I. (2017). Commercial strain-derived clinical *Saccharomyces cerevisiae* can evolve new phenotypes without higher pathogenicity. *Molecular nutrition & food research*, 61(11), 1601099.

- [12] Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J. X., Pflieger, D., Bergström, A., ... & Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556(7701), 339-344.
- [13] Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., ... & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), 14539-14544.
- [14] Bedriñana, R. P., Alonso, J. M., & Valles, B. S. (2017). Evaluation of autochthonous *Saccharomyces bayanus* strains under stress conditions for making ice ciders. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 217-225.
- [15] Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., & Loprieno, N. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*. *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi: Volume 1*, 395-446.
- [16] Fantes, P. A., & Hoffman, C. S. (2016). A brief history of *Schizosaccharomyces pombe* research: a perspective over the past 70 years. *Genetics*, 203(2), 621-629.
- [17] Loira, I., Morata, A., Palomero, F., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Schizosaccharomyces pombe*: A promising biotechnology for modulating wine composition. *Fermentation*, 4(3), 70.
- [18] Suárez-Lepe, J. A., Palomero, F., Benito, S., Calderón, F., & Morata, A. (2012). Oenological versatility of *Schizosaccharomyces* spp. *European Food Research and Technology*, 235, 375-383.
- [19] Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- [20] Callejo, M. J., González, C., & Morata, A. (2017). Use of non-*Saccharomyces* yeasts in bottle fermentation of aged beers. *Brewing technology*, 101-119.
- [21] Morgan, D. O. (2007). *The cell cycle: principles of control*. New science press.
- [22] Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., ... & Bähler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*, 453(7199), 1239-1243.

- [23] Wood, V., Harris, M. A., McDowall, M. D., Rutherford, K., Vaughan, B. W., Staines, D. M., ... & Oliver, S. G. (2012). PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic acids research*, 40(D1), D695-D699.
- [24] Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., ... & Yoshida, M. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature biotechnology*, 24(7), 841-847.
- [25] Sipiczki, M., Kucsera, J., & Dobo, E. (1985). Homo-and heterothallic sexual types in *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*. *Current genetics*, 9, 263-272.
- [26] Grallert, Á., Bozsik, A., Szilágyi, Z., Sipiczki, M., Zilahi, E., & Miklós, I. (1999). Genetics, physiology and cytology of yeast-mycelial dimorphism in fission yeasts. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 46(2-3), 297-302.
- [27] Yukawa, Matao; Maki, Tetsuo. Regarding the new fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Kyushu Daigaku Kiyou*, 1931, 4: 218-226.
- [28] Niki, H. (2014). *Schizosaccharomyces japonicus*: the fission yeast is a fusion of yeast and hyphae. *Yeast*, 31(3), 83-90.
- [29] Robinow, C. F., & Hyams, J. S. (1989). General cytology of fission yeasts. *Molecular biology of the fission yeast*, 273-330.
- [30] Sipiczki, M., Takeo, K., Yamaguchi, M., Yoshida, S., & Miklos, I. (1998). Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology*, 144(5), 1319-1330.
- [31] Helston, R. M., Box, J. A., Tang, W., & Baumann, P. (2010). *Schizosaccharomyces cryophilus* sp. nov., a new species of fission yeast. *FEMS yeast research*, 10(6), 779-786.
- [32] Guo, Y., Singh, P. K., & Levin, H. L. (2015). A long terminal repeat retrotransposon of *Schizosaccharomyces japonicus* integrates upstream of RNA pol III transcribed genes. *Mobile DNA*, 6(1), 1-7.
- [33] Kinnaer, C., Dudin, O., & Martin, S. G. (2019). Yeast-to-hypha transition of *Schizosaccharomyces japonicus* in response to environmental stimuli. *Molecular biology of the cell*, 30(8), 975-991.

- [34] Chapman, E., Taglini, F., & Bayne, E. H. (2022). Separable roles for RNAi in regulation of transposable elements and viability in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *PLoS Genetics*, 18(2), e1010100.
- [35] open.ai database (2023.03.28)
- [36] Kawano, S., Abe, H., & Iwamoto, M. (1995). Development of a calibration equation with temperature compensation for determining the Brix value in intact peaches. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 3(4), 211-218.
- [37] Zimmerman, M., & Balling, C. (2021). Screening for borderline personality disorder with the McLean Screening Instrument: a review and critique of the literature. *Journal of Personality Disorders*, 35(2), 288-298.
- [38] Mangas, J. J., Cabranes, C., Moreno, J., & Gomis, D. B. (1994). Influence of cider-making technology on cider taste. *LWT-Food Science and Technology*, 27(6), 583-586.
- [39] Gwanpua, S. G., Van Buggenhout, S., Verlinden, B. E., Christiaens, S., Shpigelman, A., Vicent, V., ... & Geeraerd, A. (2014). Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chemistry*, 158, 283-291.
- [40] National Fruit Collection DATABASE, (2023.02.18)
<http://www.nationalfruitcollection.org.uk/full2.php?id=3065&&fruit=apple>
- [41] Buratti, S. and Benedetti, S. (2016) Alcoholic Fermentation Using Electronic Nose and Electronic Tongue.; *Electronic Noses and Tongues in Food Science*, pp.291-299.
- [42] Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., & Barile, D. (2017). Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*: Quantification and characterization. *Food Microbiology*, 61, 136-149.
- [43] Benito, S. (2019). The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(11), 4291-4312.
- [44] Jackson, R. S. (2000). *Wine science: principle, practice, perception*. Academic Press.

[45] Lea, A. G., & Drilleau, J. F. (2003). Cidermaking. *Fermented beverage production*, 59-87.