

potřeby jódu pro dospělého člověka. Horní hranice snášenlivosti jódu je však u člověka individuální, jak uvádí Herzig et al. (2005). Riziko v podobě ohrožení zdraví konzumentů vysokými koncentracemi jódu ve vykupovaném mléce je však eliminováno průměrováním mléka, ke kterému dochází při svozu a následném zpracování mléka.

S obsahem jódu v mléce byl v roce 2013 souběžně stanoven i obsah jódu v syrovátce. Rudolfová a Čurda (2001) uvádí, že při zpracování mléka přechází až 85 % jódu do syrovátky. Tento fakt potvrzuje závislost obsahu jódu v syrovátce na obsahu jódu v mléce ( $r_{xy} = 0,979$ ), která je uvedena v grafu 2. Je tak patrné, že se zvyšujícím se obsahem jódu v mléce dochází souběžně ke zvyšování obsahu jódu v syrovátce. Průměrný obsah jódu v syrovátce byl  $245,84 \pm 259,97 \mu\text{g/l}$  při hodnotě mediánu  $163,00 \mu\text{g/l}$  a bylo potvrzeno, že v průměru 67,17 % jódu z mléka přechází do syrovátky.

## Závěr

Výsledky práce poukazují na postupný pokles průměrného obsahu jódu v mléce a nárůst počtu chovů s obsahem jódu pod  $100 \mu\text{g/l}$ . Při bilancování významu mléka a mléčných produktů pro zásobení konzumentů jódem je významné zjištění přestupu jódu do syrovátky na úrovni 67,17 %.

## Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu GAJU 094/2016/Z a NAZV KUS QJ-1510336

## Literatura

- DGE: DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (2011): Referenční hodnoty pro příjem živin. 1. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 192 s. ISBN 978-80-254-6987-3
- HERZIG, I., TRÁVNÍČEK, J., KURSA, J., KROUPOVÁ, V. (2005): Mléko jako zdroj jódu. Sborník referátu z konference s mezinárodní účastí "Den mléka 2005", 12. 5. 2005, ČZU Praha, 45-47s., ISBN 80-213-1327-7
- JISKRA, P. (2011): Poruchy štítné žlázy. Praha: Mladá fronta a.s., 46 s. ISBN 978-80-204-2456-3
- KALVACHOVÁ B. (2013): Rizika nedostatečného přívodu jódu. In: Sborník X. konference u příležitosti Dne jódu: Zásobení jódem jako prevence tyreopatií a zdroje dietární expozice; Státní zdravotní ústav Praha.
- KROUPOVÁ V., TRÁVNÍČEK J., STAŇKOVÁ M., RICHTEROVÁ J., DUŠOVÁ H. (2013): Vývoj obsahu jódu v mléce v prvovýrobě na území ČR. In: Sborník X. konference u příležitosti Dne jódu: Zásobení jódem jako prevence tyreopatií a zdroje dietární expozice; Státní zdravotní ústav Praha.
- KŘÍŽOVÁ, Z., TRÁVNÍČEK, J., HASONOVÁ, L., VÍTKOVÁ, L., STAŇKOVÁ, M. (2014): Mléko jako významný zdroj jódu v lidské výživě. *Mlékařské listy - zpravodaj*. Praha: Výzkumný ústav mlékárenský, 147, 20-23s, ISSN 1212-950X
- KURSA J., KROUPOVÁ V., KRATOCHVÍL P., TRÁVNÍČEK J., JEZDINSKÝ P. (1996): K diagnostice strumy skotu. *Veterinářství*, 3, 90-96.
- RUDOLFOVÁ, J., ČURDA, L.: (2001): Vliv technologických operací na obsah jódu v sýrech. Česká společnost chemická, Odborná skupina pro potravinářskou a agrikulturní chemii, Sborník celostátní přehlídky sýrů 2001, ISBN 80-86238-12-1
- RYŠAVÁ, L. (2010): Jód je nezbytný pro zdraví - máme ho dnes dostatek? [online]. Praha, březen 2010 [cit. 2016-01-20]. Dostupné na [www.szu.cz/tema/podpora-zdravi/den-jodu-1](http://www.szu.cz/tema/podpora-zdravi/den-jodu-1)
- TRÁVNÍČEK J., KROUPOVÁ V., DUŠOVÁ H., KRHOVJÁKOVÁ J., KONEČNÝ R. (2011): Optimalizace obsahu jódu v kravském mléce. Česká Budějovice: Jihočeská univerzita, 54 s. ISBN 978-80-7394-328-8

- ZAMRAZIL, V., BÍLEK, R., ČEŘOVSKÁ, J., DVOŘÁKOVÁ, M. (2010): Jodový deficit ve světě i v České republice - současný stav a perspektivy. *Vnitřní lékařství*, 56, 1310-1315
- ZAMRAZIL, V., ČEŘOVSKÁ, J. (2014): Jod a štítná žláza: optimální příjem jódu a poruchy z jeho nedostatku. [online]. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 51 s. [cit. 2016-01-20]. ISBN 978-802-0433-022

## Korespondující autor:

Ing. Zuzana Křížová, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13 370 05, České Budějovice, Česká Republika  
Tel.: 389 032 611, E-mail: [krizoz00@zf.jcu.cz](mailto:krizoz00@zf.jcu.cz)

Přijato do tisku: 1. 3. 2016

Lektorováno: 14. 3. 2016

## PŘIROZENÝ VÝSKYT KVASINKOVÝCH ORGANISMŮ V PEKAŘSKÝCH KVASECH

Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.,

Ing. Markéta Markvartová, Mgr. Jaroslava Marková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Soběslavská 841, Tábor 39001

## Natural occurrence of yeast species in sourdoughs

## Abstrakt

Kvasy představují heterogenní a živné prostředí pro přirozený výskyt kvasinek. Používání různých typů mouky v kvasech je řízeno poptávkou konzumentů po vyvážaných pekařských produktech. V závislosti na typu použité mouky jsme analyzovaly šest kvasů z pekáren v ČR a Rakousku. Typ mouky a pH kvasu jsou významnými faktory, které ovlivňují druhové zastoupení kvasinek. Celkem bylo izolováno šestnáct izolátů kvasinek, které byly určeny do sedmi druhů. V analyzovaných kvasech se vyskytovaly společně maximálně dva druhy kvasinek, většina druhů byla zastoupena po jednotlivých druzích v kombinaci s bakteriemi mléčného kvašení. Ačkoliv 44 % izolátů kvasinek bylo identifikováno jako *Saccharomyces cerevisiae*, v kvasech s moukou ječnou a špaldovou se tento druh vůbec nevyskytoval. Druhy jako *Pichia membranifaciens*, *Pichia fermentans*, *Naumovozyma castellii* a *Kazachstania unispora* mohou představovat nový potenciál pro výrobu kvasů obohacených o špaldovou či ječnou mouku.

**Klíčová slova:** kvas, mouka, kvasinky, druhová diverzita

## Abstract

The sourdoughs comprise heterogenic and nutritive environment for yeast, fungi and lactic acid bacteria. The yeast

are an important part of sourdough biota reflecting the composition of sourdough. In present study, the samples of sourdoughs obtained from six bakeries located in Czech Republic and Austria were analysed. The sourdoughs varied in the type of flour (rye, barley, wheat and spelt) and pH. Totally, sixteen isolates of seven yeast species and five bacteria strains were isolated, cultured and identified by using phenotypic and molecular genetic methods. Species pool of yeast in the sourdough respect the type of flour and pH.

The presence of single species or the co-existence of two yeast species at the most was found in one sample of sourdough. Although 44% of isolates was identified as *Saccharomyces cerevisiae* this species never occurred in the samples with barley and spelta flour. The species such as *Pichia membranifaciens*, *P. fermentans*, *Naumovozyma castelii* and *Kazachstania unispora* remains a new potential in sourdough technology enriched with spelt and/or barley flour.

**Keywords:** sourdough, flour, yeast, species diversity

## Úvod

Kvasy představují heterogenní a živné prostředí pro řadu mikroorganismů jako jsou kvasinky a bakterie mléčného kvašení (MBK). Diverzita a stabilita mikroorganismů v kvasech závisí na řadě ekologických faktorů, jenž zahrnují i ty technologické, jako jsou například salinita, pH, redoxní potenciál, chemické a enzymatické vlastnosti použité mouky a délka faktory kontrolovatelné jen do určité míry jako například kontaminace mikroorganismy z prostředí, popřípadě z dalších aditiv (De Vuyst et al, 2009; Di Cagno et al, 2014). Studie rovněž potvrzují geografickou specifitu v populacích kvasinek odpovídající složení kvasu. Mouka, jako nedílná součást kvasu, představuje jeden z faktorů, který je zodpovědný nejen za vlastnosti a kvalitu kvasu, ale, jak mnohé studie naznačují, i za mikrobiální složení. Žitná mouka přirozeně může obsahovat spektrum kvasinek odpovídající druhům *Candida crusei*, *Saccharomyces* spp., *Pichia satoi* (Kozlinskis et al, 2008), *C. humilis*, *Debaryomyces hansenii*, *S. uvarum* (Meroth et al, 2003) a spektrum bakterií mléčného kvašení. Ve špaldových kvasech byly nalezeny druhy jako *S. cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* a *C. glabrata* (Vrancken et al, 2010).

Kvasinkovité houbové organismy se v současné době určují klasickými metodami tj. na základě morfologie kolonií na živných médiích a podle morfologie buněk v mikroskopickém obraze. Dále se rody a druhy kvasinek určují dle fenotypových vlastností, chemotaxonomie a v neposlední řadě pomocí molekulárních metod (Kurtzman et al, 2011, 2014). Metody molekulární biologie jsou založené na identifikaci organismů na základě nukleotidové sekvence jejich RNA či DNA. Použití DNA markerů vychází z polymorfismu sekvencí DNA. Výhodou použití DNA markerů je nezávislost na podmínkách prostředí, rychlost a umožnění přesné identifikace organismů nebo stanovení příbuzenských vztahů. PCR analýza

(Polymerase Chain Reaction) je běžně využívaná metoda založená na polymerázové řetězové reakci, založená na amplifikaci DNA, a která je schopná požadovaný úsek DNA namnožit až  $10^9$  a efektivně oddělit od zbytku genomu. DNA markery pro houbové organismy a tím i pro kvasinky jsou založeny na přítomnosti konzervovaných úseků genů jaderné či mitochondriální DNA (pro houbové organismy jsou to: ITS 5.8S r DNA, SSU a LSU rDNA (D1/D2 doména) (Kurtzman et al, 2011, Schoch et al, 2012). Produkty PCR jsou následně sekvenovány. Upravené sekvence jsou porovnávány v mezinárodních databázích (NCBI, Blast, CBS -KNAW- identification system) a druhově přiřazeny k organismu s maximální možnou shodou bazí (100-95%). Výběr vhodných úseků genů a databáze organismů pro kvasinky byl odsouhlasen a potvrzen mezinárodním výborem pro taxonomii kvasinek v roce 2014/2015 na workshopu v CBS (Utrecht/Holandsko) a ISSY32 2015 (Perugia/Itálie). Taxonomická identifikace kvasinek založena na morfologickém hodnocení a fyziologických a biochemických testech, představuje kombinaci pracných metod a jejich výsledek - určení kvasinkového organismu - není vždy relevantní přiřazenému taxonu. S rozvojem a aplikací molekulárních metod se taxonomické hodnocení významně zpřesnilo. Nicméně, charakteristika fenotypových vlastností kmenů kvasinek je nezbytným doplněk charakteristiky kmene při jeho výběru k potenciálnímu praktickému využití.

Cílem této studie bylo vyhodnotit a vzájemně porovnat druhovou diverzitu kvasinek v šesti kvasech různého původu a složení. Odlišné složení vzhledem k typu mouky a různé pH byly hlavní sledované parametry, u kterých jsme předpokládali, že budou druhové spektrum kvasinek v kvasech ovlivňovat.

## Materiál a metody

### Izolace kvasinek

Původ kvasů, ze kterých byly izolovány mikroorganismy, jejich pH, a použitá mouka jsou uvedeny v tabulce 1. Postup při izolaci mikroorganismů byl následující. Do sterilní váženky byl navážen 1 g vzorku kvasu. Vzorek byl zalit 9 ml fyziologického roztoku a promíchán. Po homogenizaci byla provedena izolace mikroorganismů na vybraných živných půdách vhodných pro kvasinkové organismy s přidaným chloramfenikolem limitujícími růst bakterií a plísní (Meroth et al, 2003; Pulvirenti et al., 2004; Kozlinskis et al., 2008; Di Cagno et al, 2014). Na živných

**Tab. 1** Přehled kvasů, jejich původu a pH, ze kterých byly mikroorganismy izolovány

Původ	Mouka	pH
Moravský Krumlov, pekárna Ivanka (ČR)	žitná	4,67
Panatura (Panadoro Group AG)	pšeničná	5,3
Dýně na Víně (Tábor, ČR)	ječná	4,03
Ambrosia (Tábor, ČR)	ječná	3,8
Dýně na Víně (Tábor, ČR)	špaldová	3,7
Držkov (ČR)	žito a pšenice	4,01

**Tab. 2** Přehled kultivačních podmínek pro bakterie a kvasinky při získávání izolátů z kvasů včetně průměrných hodnot ( $n=5$ ) CFU . g<sup>-1</sup>

Médium	Kultivační podmínky	Mouka v kvasu (CFU . g <sup>-1</sup> )				
		žito	ječmen	pšenice + žito	špalda	pšenice
<b>Kvasinky</b>						
5% malt agar	Aerobní / 25 °C / 72 h	8,4 x 10 <sup>5</sup>	2,1 x 10 <sup>6</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>	8,5 x 10 <sup>5</sup>	28,2 x 10 <sup>6</sup>
YPD	Aerobní / 25 °C / 72 h	8,5 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>	3,8 x 10 <sup>7</sup>	9,8 x 10 <sup>6</sup>	3,7 x 10 <sup>6</sup>
Morfologický agar	Aerobní / 25 °C / 72 h	5,3 x 10 <sup>6</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>	6,8 x 10 <sup>6</sup>	5,7 x 10 <sup>5</sup>
GKCH	Aerobní / 25 °C / 72 h	7,3 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	6,2 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>
5% malt agar	Aerobní / 30 °C / 72 h	3,8 x 10 <sup>6</sup>	5,8 x 10 <sup>7</sup>	19,5 x 10 <sup>6</sup>	3,4 x 10 <sup>6</sup>	5,4 x 10 <sup>5</sup>
YPD	Aerobní / 30 °C / 72 h	2,4 x 10 <sup>6</sup>	1,8 x 10 <sup>7</sup>	7,6 x 10 <sup>6</sup>	4,5 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>7</sup>
Morfologický agar	Aerobní / 30 °C / 72 h	5,3 x 10 <sup>6</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>	6,8 x 10 <sup>6</sup>	5,7 x 10 <sup>5</sup>
GKCH	Aerobní / 30 °C / 72 h	8,0 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup>	7,2 x 10 <sup>6</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>
<b>Bakterie (BMK)</b>						
M17	Aerobní, 3 dny, 30 °C	1,2 x 10 <sup>3</sup>	1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>	3,5 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>
MRS57	Anaerobní, 3 dny, 30 °C	-	1,1 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	3,8 x 10 <sup>6</sup>	5,1 x 10 <sup>7</sup>
M103	Anaerobní, 5 dní, 25 °C	-	1,7 x 10 <sup>6</sup>	1,8 x 10 <sup>7</sup>	2,3 x 10 <sup>6</sup>	3,8 x 10 <sup>7</sup>

půdách byl vyhodnocen celkový počet mikroorganismů (CFU.g<sup>-1</sup>). Zároveň byly vzorky kvasů kultivovány na médiích vhodných pro růst bakterií mléčného kvašení a rovněž byl vyhodnocen celkový počet mikroorganismů na g vzorku kvasu. Je třeba předestříť fakt, že kultivační média a podmínky pro kvasinky a bakterie mléčného kvašení se liší. Použitá média pro kvasinky a bakterie mléčného kvašení, podmínky kultivace a finální počet kolonií (CFU.g<sup>-1</sup>) jsou uvedeny v tabulce 2. Kvasinkové organismy byly odizolovány z morfologického agarů, na základě vizuálně odlišných kolonií a na základě mikroskopické variability buněk u jednotlivých izolátů.

### Morfologická determinace

Izolace a počet kolonií (CFU.g<sup>-1</sup>) byly provedeny na odpovídajících živných médiích (tabulka 2). Mikroskopické preparáty kvasinek se připravují z kultur 5-7 dní starých na médiích: 5% malt agar, YPD, YM agar a acetátový agar (produkce askospór). Preparáty lze připravit: 1. stěrem kličkou do roztoku Tweenu (0,05%) a Trypanové modře v laktofenolu nebo ve vodném roztoku, nátěrem na sklíčko, protažením nad plamenem a barvením metylenovou modří. Produkce askospór se vyhodnocuje kvalitativně a kvantitativně na mikroskopickém preparátu barveném roztokem 0,5 % malachitové zeleně a 0,05 % basicým fuchsinem (Kurtzman et al, 2011, Samson et al, 2010). U preparátu se hodnotí: velikost a tvar buněk, dělení, pučení, tvorba pseudomycelia, sporulace.

### Molekulární metody

K izolaci DNA byly použity buňky kultivované v 5 ml tekutého YPD média po dobu 12 h při 28 °C. Izolace DNA

byla provedena komerčním kitem Ultra Clean DNA Microbial Kit (MOBIO, Elisabeth Farmacon) dle přiložených instrukcí. PCR reakce pro oba zvolené genové úseky probíhaly v 25 µL. Primery, pro ITS 5.8S r DNA, a LSU rDNA (D1/D2 doména) jsou uvedeny v tabulce 3. Koncentrace všech použitých primerů byla 10 pmol/ml. Koncentrace DNA použité v PCR reakcích dosahovala 1 ng/ml (stanoveno na fluorometru Qubit). PCR reakce (24,5 µl reakční směsi a 0,5 µl DNA) pro amplifikaci ITS1F/ITS4 probíhala za těchto podmínek: PCR H<sub>2</sub>O -11 µl, PPP Master Mix (TOP BIO, ČR) - 12,5 µl, primer ITS1F - 0,5 µl, primer ITS4 - 0,5 µl. PCR reakce probíhala na termocycleru BIOMETRA v 35 cyklech (program: 5 min - 94 °C, denaturace 94°C/30s; amplifikace 53 °C/30 s; extenze 72 °C/1,5 min; konečná extenze 72 °C/10 min). Pro jaderný úsek 26S rDNA byly amplifikovány primery NS1 a NS4. PCR reakce (24,5 µl reakční směsi a 0,5 µl DNA): PCR H<sub>2</sub>O -11 µl, PPP Master Mix (Top Bio, ČR) - 12,5 µl, primer NS1 - 0,5 µl, primer NS4 - 0,5 µl. PCR reakce probíhala na termocycleru BIOMETRA v 36 cyklech (program: 5 min - 95 °C, denaturace 95 °C/2 min; amplifikace 52 °C/1 min; extenze 72 °C/2 min; konečná extenze 72 °C/7 min).

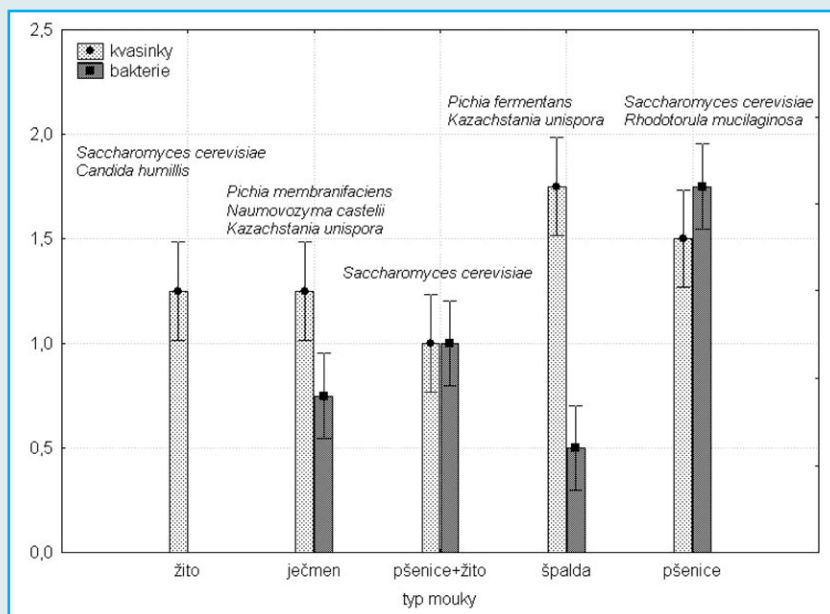
PCR produkty byly vizualizovány na 1,5 % agarózovém gelu. Sekvenační reakce byly namíchány z PCR produktů: H<sub>2</sub>O - 6,2 µl, Primer - 0,1 µl, DNA vzorku - 0,5 µl. takto připravená reakce byla ve vialkách odeslána do GATC Biotech (Německo) k osekvenování Sangerovou metodou.

Výsledné sekvence byly vyhodnocené pomocí programů BioEdit, v.8, MEGA v 6.0.) (Hall, 1989). Výsledky sekvenování byly upraveny v programu BioEdit Software v.8.

Soubor dat byl zkompletován a vyhodnocen v programu MEGA v.6. Taxonomická příslušnost jednotlivých kmenů byla vyhodnocena na základě kompatibility se sekvenčními daty v databázích NCBI BLAST, CBS - KNAW Sekvence byly identifikovány a přiřazeny k sekvenčním údajům druhů s maximální možnou shodou bazí (100-95 %). Fylogenetická analýza

**Tab. 3** Typy primerů použité v PCR reakci

primer	genový úsek	primer	citace
ITS1F	ITS 5,8S rRNA	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	Schoch at al, 2012
ITS4	ITS 5,8S rRNA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Schoch at al, 2012
NS1	28SrRNA (LSU)	GTA GTC ATA TGC TTG GTC TC	Fell et al, 2000
NS4	28S rRNA (LSU)	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	Fell et al, 2000



**Obr. 1** Průměrný počet druhů kvasinek a BMK (osa Y) ve vzorcích kvasů s různým druhovým zastoupením mouky (osa X). Variabilita byla testována analýzou kovariance při hladině významnosti  $\alpha = 0.05$  (ANCOVA,  $R^2=0,62$ ,  $F_{(6,28)} = 10,05$ ,  $p \leq 0,001$ ,  $N=7$ ). Data byla log transformována a pH kvasů bylo implementováno jako kovariát.

a konstrukce fylogenetických stromů byla, na základě sekvencí, provedena v programu Mega v. 6.0. metodou "maximální věrohodnosti" (ML) (Tamura et al., 2013).

### Statistické metody

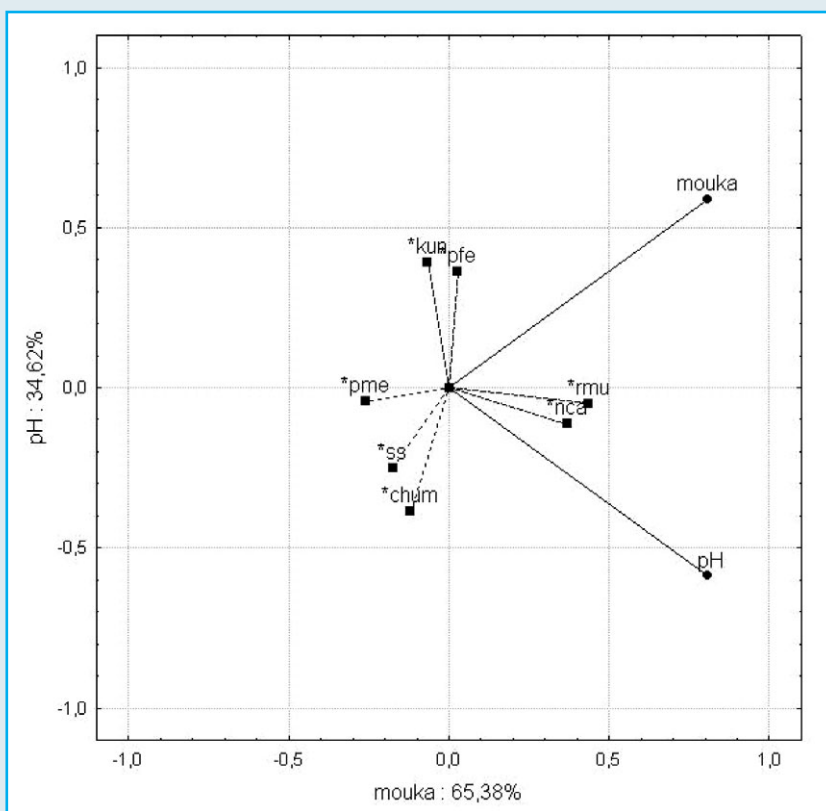
Získaná data byla zpracována a analyzována v programu Statistica Software verze 8.0. V případě testování variability mezi daty v případě nových kmenů kvasinek z různých kvasů byla použita ANCOVA (analýza kovariance), kde pH hodnota kvasů byla brána jako kovariát. Při testování síly vlivu faktorů jako jsou druh mouky a pH byla použita analýza hlavních komponent (Lepš et al, 1996). Data byla zpracována při hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ .

### Výsledky a diskuze

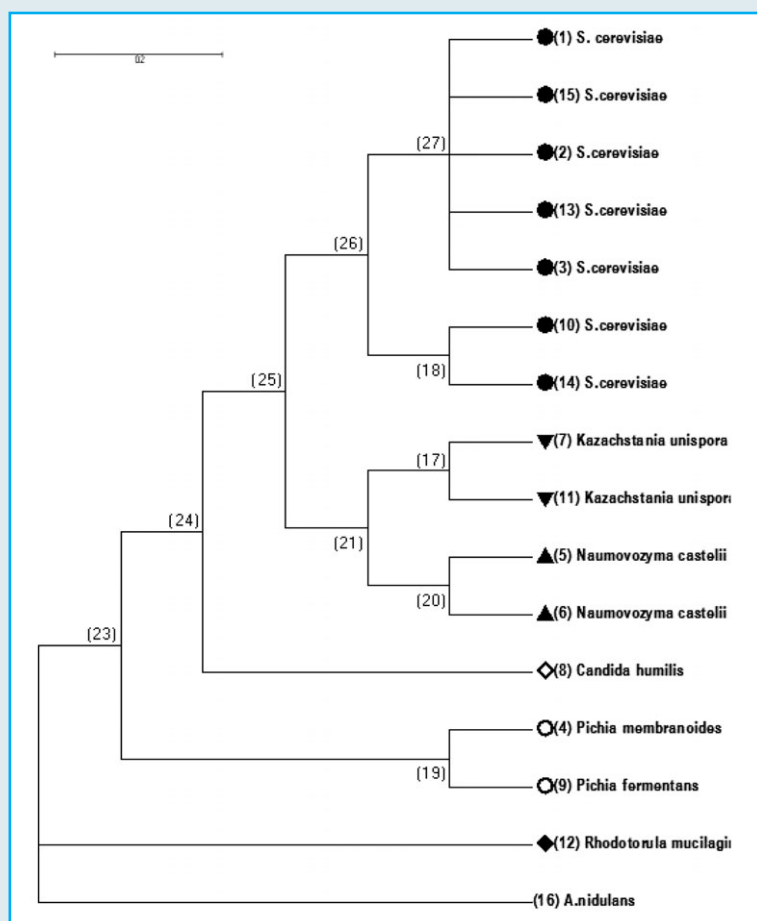
Ze šesti kvasů bylo izolováno celkem 16 izolátů, které byly následně identifikovány do sedmi druhů kvasinek. I když druh *Saccharomyces cerevisiae* byl nejhojněji zastoupeným druhem v rámci všech vyizolovaných vzorků (44 %), výskyt se vztahoval převážně na kvasy pšeničné a žitné (obrázek 2 a 1). V pokusech s laboratorními kvasy Vrancken et al, 2010 potvrzují výskyt *S. cerevisiae* i ve kvasích s konečným pH 2,5. V analyzovaných kvasích se vyskytovaly společně maximálně 2 druhy kvasinek společně, většina

druhů byla zastoupena po jednotlivých druzích v kombinaci s bakteriemi mléčného kvašení (obrázek 1). Obdobná studie Pulvirenti et al (2004) také prezentuje, že 80 % z 35 vzorků kvasů obsahovalo pouze jeden druh kvasinek, 17 % obsahovalo dva druhy a pouhých tři procenta měla třídruhové složení. Tento fakt je ovlivněn nejen podmínkami prostředí, ale také regulačními mechanismy, které ovlivňují populační dynamiku zastoupených druhů kvasinek (antibióza, kompetice aj.)

Druh *Kazachstania unispora* se vyskytoval ve kvasích s ječnou moukou a moukou špaldovou. V kvasích s ječnou moukou byl identifikován druh *Naumovozyma castellii* a *Pichia membranifaciens*. Ve vzorcích z ječných kvasů byly identifikovány tři druhy kvasinek, nikdy se ale nevyskytovaly všechny tři druhy společně, většinou jednotlivě eventuálně dva druhy společně. Překvapivě, jako dominantní druh v ječných kvasích z Maroka je deklarován druh *Candida humillii* a *Saccharomyces cerevisiae* (Huys et al, 2013). Je třeba, ale zmínit, že i geografický původ surovin má zásadní vliv na druhové zastoupení kvasinkových organismů v kvasích.



**Obr. 2** Závislost druhového složení kvasinek v kvasích na hlavních faktorech: typu mouky a pH (PCA - analýza hlavních komponent,  $p \leq 0,05$ ): pfe - *Pichia fermentans*, pme - *P. membranoides*, ss - *Saccharomyces cerevisiae*, chum - *Candida humillii*, rmu - *Rhodotorula mucilaginosa*, nca - *Naumovozyma castellii*, kun - *Kazachstania unispora*.



**Obr. 3** Molekulární fylogenetická analýza vygenerovaná metodou maximální kompozitní podobnosti (MCL) založená na Tamura-Nei modelu. Bootstrap konsenzus fylogram je vygenerován na základě 500 opakování. Jednotlivé fylogenetické větve odpovídají více než 20 % bootstrapovému opakování. Analýza zahrnuje 16 nukleotidových sekvencí. Ve finálním datasetu bylo 404 porovnávaných sekvencí ITS 5,2S rRNA a D1/D2 LSU. Analýza byla provedena v programu MEGA 6.0v. Jako outgroup k ukotvení stromu byl zvolen *Aspergillus nidulans*.

Studie založené na detekci DNA ve vzorku pomocí denaturační gelové elektroforézy potvrzují výskyt několika druhů *Saccharomyces* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Isaathenka orientalis* a *Candida humilis* v DNA profilu ze třech žitných kvasů s různou opravou teploty a aditivy (Meroth et al, 2003), nebyl ale zohledněn vliv pH. V žitném kvasu, odebíraném ve třech fázích technologie jeho výroby, sledoval Kozlinski (2008) nárůst kvasinek a bakterií mléčného kvašení v časové řadě zároveň se změnami pH kvasu. Druhové spektrum v této studii určoval podle API testů, což může být poněkud nedostačující a zavádějící pro taxonomickou determinaci druhů kvasinek. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia satoii* a *Candida crusei* byly nejfrekventovanější druhy, které se v žitných kvasech vyskytovaly. V našich žitných vzorcích byl také potvrzen výskyt *S. cerevisiae* a/nebo *Candida humilis*. Většina námi izolovaných druhů se vyskytovala ve vzorcích společně s BMK, s výjimkou druhů z žitné mouky, kde se kvasinkové izoláty vyskytovaly bez přítomnosti BMK a naopak, i když společný výskyt *Candida humilis*

a *Lactobacillus sanfranciscensis* byl potvrzen v několika studiích, týkajících se ekologie kvasových mikroorganismů (Gänzle et al, 2014). Příčinou může být fakt, že kvasy pocházely z různých výrobních šarží, nebo mohly být upravovány přidávkou organických kyselin. Je také možné, že i přes snahu použít co nejširší spektrum médií pro izolaci bakterií jsme nemuseli zachytit méně běžné druhy bakterií v žitných kvasech. Oba dva výše uvedené druhy, *S. cerevisiae* a *C. humilis* izolované z uvedených žitných kvasů byly izolovány v řadě studií nejen z kvasů žitných, ale i kukuřičných, pšeničných (Huys et al, 2013).

Pšeničné kvasy byly na kvasinky poměrně chudé. Byly izolovány identifikovány jen dva druhy, *S. cerevisiae* a v kvasu pšenično - žitném ještě *Rhodotorula mucilaginosa*, jenž je spíše kontaminantem, než žádoucím kvasinkovým kmenem. *R. mucilaginosa* se řadí mezi basidiomycetoidní kvasinky (*Basidiomycota*, *Urediniomycetes*). Analýza hlavních komponent (obrázek 2.) predikuje, že právě pH v korelaci s druhem mouky v tomto případě bude určujícím faktorem druhové bohatosti kvasu na kvasinkové organismy, protože oba typy kvasů, jak pšeničný, tak pšenično-žitný byly méně kyselé, než ostatní. Nejnižší pH měl kvas špaldový (pH 3,7), byly z něho izolovány a identifikovány druhy jako *Kazachstania unispora* a *Pichia fermentans*. Tyto dva druhy se vyskytovaly v závislosti na typu použité mouky v kvasech, kdežto výskyt *S. cerevisiae* a *Candida humilis* byl ovlivněn spíše pH kvasu. I když druh *Kazachstania unispora* není primárním druhem v kvasech, celosvětově je tento druh zmiňován v souvislosti s žitnými a pšeničnými kvasy ve Finsku a Itálii (Huys et al, 2013). *Naumovozyma castellii* je druh kvasinky, který není v literatuře s kvasy spojován ve smyslu přirozeného výskytu, přesto molekulární analýzy ITS a D1/D2 LSU a morfologické studie potvrdili 100 % taxonomickou příslušnost obou izolátů. Analýza hlavních komponent potvrzuje u tohoto druhu jistou nezávislost na ekologických parametrech, jako jsou typ mouky a pH (obrázek 3). Všechny izoláty kvasinek z výše uvedených kvasů byly taxonomicky zařazeny k druhům kvasinek na základě sekvence ITS 28S rRNA a D1/D2 LSU rRNA. Naše sekvence se pohybovaly v rozmezí 100-98 %. Fylogenetický strom konstruovaný metodou maximální kompozitní pravděpodobnosti (ML) v programu MEGA v.6., potvrzuje správné taxonomické určení na základě sloučených fylogenetických větví, pro jednotlivé druhy. Jako outgroup, taxonomicky vzdálený druh, byl použit *Aspergillus nidulans* (obrázek 3). Všechny uvedené druhy kvasinek byly zařazeny jako součást sbírky CCDM Laktoflora.

Kvasy představují zajímavý, dynamický, rozmanitý a proměnlivý ekosystém, ze kterého lze vyizolovat řadu

kvasinek, plísní a BMK. Na základě jejich identifikace a fyziologických vlastností, mohou být posléze tyto kmeny užívány v dalších potravinářských technologiích. Z literatury i naší studie je patrné, že druhové spektrum kvasinek je rozmanité a nepředvídatelné. Během naší práce se nám povedlo vyizolovat a identifikovat druhy kvasinek (*Naumavozyma castelii*), které v literatuře jsou zmiňovány v jiných substrátech, než jsou kvasy, nebo je údajů o jejich výskytech v kvasech málo (*Kazachstania unispora*). V současné době existuje řada molekulárních metod, které významně posunuly identifikaci a taxonomii kvasinek. V našem případě jsme spojili metodu klasickou, kde jsme izolovali a rozočkovávali kmeny samostatně a následně identifikovali pomocí molekulárních metod. Při tomto způsobu může dojít k vynechání nějakého druhu. Existují však i možnosti, které umožňují například zachytit celé spektrum kvasinkové DNA v daném vzorku (denaturační gelová elektroforéza) a následně identifikovat druhové složení bez ztráty, ke které může dojít během klasické izolace.

#### Literatura:

- DE VUYST, L., NEYSENS, P. (2005): The sourdough mikrobióla: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in food science & technology*, 16, s 43-56.
- DE VUYST, L., VRANCKEN, G., RAVYTS, F., RIMAUX, T., WECKX, S. (2009): Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food microbiology*, 26(7), s 666-675.
- DI CAGNO, R., PONTONIO, E., BUCHIN, S., DE ANGELIS, M., LATTANZI, A., VALERIO, F., GOBBETTI, M., CALASSO M. (2014): Diversity of the lactic acid bacterium and yeast microbiota in the switch from form-to liquid-sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), s. 3161-3172.
- FELL, J. W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G., STATZELL-TALLMAN, A. (2000): Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 50: s 1351-1371.
- GÄNZLE, M. G. (2014): Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology* 37, s 2-10.
- HALL, T.A (1989): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Ac Sym* 41: 95-98.
- HUYS, G., DANIEL, H-M. a DE VUYST, L. (2013): Taxonomy and biodiversity of sourdough yeast and lactic acid bacteria. V knize *Handbook of sourdough biotechnology*. (Gobbetti, M. and Gänzel, M. ed.) s. 105-154, Springer, New York.
- KURTZMAN, C. P., FELL J. W., BOEKHOUT T., Robert, V. (2011): Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeast. V knize *The yeast a taxonomy study* (Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout, T. ed.), s 87-128, Elsevier, London, UK.
- KURTZMAN, C. P. (2014): Use of gene sequence analyses and genome comparison for yeast systematics. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, 64, s 325-332.
- KURTZMAN, C. P., FELL J. W., BOEKHOUT T. (2011): Gene Sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. V knize *The yeast a taxonomy study* (Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout, T. ed.), s 87-128, Elsevier, London, UK.
- MEROTH, C. B., HAMMES, P. W., HERTEL, C. (2003): Identification and population dynamics of yeast in sourdough fermentation processes by PCR-Denaturing Gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, s 7453-7461.
- LEPŠ, J. (1996) *Biostatistika*. Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice, s. 160.
- PULVIRENTI, A., SOLIERI, L., GULLO, M., DE VERO, L. a GIUDICI, P. (2004): Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in applied microbiology*, 38, s 113-117.

- SAMSON, R., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD J.C., ANDERSEN, B. (2010): *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDRORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, A. C. CHEN, W., a FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, 109 (16), s 6241-6246.
- KOZLINSKIS, E., SKUDRA, L., KLAVA, D., KUNKULBERGA, D. (2008): Characterization of rye sourdough mikrobióla. *Foodbalt*, 89 - 93.
- VRANCKEN, G., DE VUYST, L., VAN DER MEULEND, R., HUYS, G., VAM-DAMME, P. & DANIEL, H-M. (2010) Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous BMKoratory sourdoughs. *FEMS Yeast research*, 10, s 471-481.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., a KUMAR, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, s. 2725-2729.

#### Poděkování:

Práce vznikla za podpory projektu NAZV KUS QJ-1310256 a NAZV KUS QJ1515338.

Přijato do tisku: 10. 3. 2016

Lektorováno: 28. 3. 2016

## PŘÍKLADY VYUŽITÍ VÝSLEDKŮ VÝZKUMU V PRAXI

V následujícím článku, který redakce Mlékařských listů převzala z odborného a stavovského týdeníku Zemědělec číslo 10/ 2016, výzkumná organizace - Výzkumný ústav živočišné výroby /VÚŽV/ seznamuje čtenáře - zemědělskou a potravinářskou veřejnost s vybranými výsledky aplikovaného výzkumu, které jsou dobře využitelné v praxi. Výzkumný ústav mlékařský /VÚM/, jako spolvydavatel Mlékařských listů využívá této příležitosti, aby jako předmluvu k převzatému článku zmínil svou spolupráci s VÚŽV při řešení některých výzkumných projektů. Jsme přesvědčeni, že návaznost výzkumu zemědělského a výzkumu potravinářského ve spolupráci se zemědělskou a potravinářskou praxí jsou tím správným směrem, kterým se náš výzkum v resortu zemědělství má ubírat. Jako příklad takové spolupráce uvádíme některé vybrané projekty spolupráce VÚM a VÚŽV. V rámci opouzaných projektů ve VÚŽV byly kromě výběru v převzatém článku i další projekty, na kterých VÚŽV spolupracuje s dalšími výzkumnými organizacemi a zemědělskými podniky, statek Horní Dvorce s.r.o., PET s.r.o. a Biofarma DoRa s.r.o.

Projekt "Výzkum faktorů ovlivňujících rentabilitu, kvalitu a bezpečnost mléka a mléčných produktů v chovech malých přežvýkavců v ČR" je řešen pod vedením odpovědné řešitelky ing. Jany Rychtářové Ph.D. Tento projekt je zaměřen na rozvoj malých mlékáren, kterých za poslední dva roky přibýlo v ČR cca 50. Na těchto farmách probíhá většinou návazně faremní produkce mléka a mléka a mléčných výrobků z různých druhů mlék pro spotřebu tzv. ze dvora. VÚŽV při řešení projektu spolupracuje s VÚM a ČZU.

Výzkum v oblasti faremní produkce mléka s jeho zpracováním na farmách otevírá nové možnosti sortimentu