



VLIV FILTRÁTŮ S OBSAHEM „KILLER TOXINU“ NA KVASINKY KONTAMINUJÍCÍ MLÉČNÉ PRODUKTY A MLÉKÁRENSKÉ PROVOZY

Miloslava Kavková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

The effect of filtrates with killer toxins on the yeast contaminating dairy and dairy products

Abstrakt

V této studii byl testován antifungální efekt čtyř filtrátů s obsahem „killer toxinů“ vůči šestnácti kmenům kvasinek kontaminujících mléčné produkty a mlékárenské provozy. Reakce kontaminujících druhů kvasinek na přítomnost filtrátu s killer toxinem byla hodnocena *in vitro*, formou terčíkových testů. Sledovaným parametrem byla tvorba inhibiční zóny. Citlivost kontaminantů vůči killer toxinu byla vyhodnocena s ohledem na faktory jako je mezidruhová a vnitrodruhová variabilita kvasinek, kmen produkující killer toxin a obsah soli v mediu. Ve filtrátech byla potvrzena metodou SDS-PAGE přítomnost proteinů, jejichž molekulární hmotnost (kDa) odpovídá velikosti glykoproteinů detekovaných u druhově příslušných kvasinek s produkcí killer toxinů.

Klíčová slova: killer toxin, kvasinky, kontaminant, mezidruhová variabilita, vnitrodruhová variabilita

Abstract

The antifungal effect of four filtrates containing killer toxins was tested against sixteen strains of yeast contaminants isolated from dairies. The disc method on yeast malt agar enriched with salt was used to assess the sensitivity of yeast contaminants to filtrates containing killer toxins. The size of the inhibition zone was influenced by

factors including intra- and inter-specific variability, the origin of the filtrates, and the salinity of media. The killer toxins were detected in the filtrates by using SDS-PAGE method.

Keywords: killer toxin, yeast, dairy contaminants, inter-specific variability, intra-specific variability

Úvod

Kvasinky jsou všudypřítomné organismy osidlující různé ekologické niky. Řadí se do říše *Fungi* do oddělení *Ascomycota* (*Saccharomycetales*) a *Basidiomycota* (*Tremelalles*). Většina kvasinek žije saprofytickým způsobem života, ale mohou být také příležitostnými patogeny živočichů a imunodeficientních osob (Geddes-McAllister a kol., 2019). Kvasinky, ve vztahu k potravinám, jsou na základě definovaných vlastností konkrétního izolátu náležejícího ke konkrétnímu druhu buď hlavním technologickým organismem, na němž závisí kvalita produktu (pivovarnictví, vinařství, mléčné nápoje), anebo také jsou nežádoucím kontaminantem, který způsobuje znehodnocení potraviny. Kromě těchto dvou základních atributů mohou izoláty kvasinek s prokázanou antimikrobiální a antifungální aktivitou také fungovat jako ochranné agens v potravinách. Druhem, který byl uznán, na základě klinických studií, jako druh s probiotickými vlastnostmi a jehož izoláty jsou za tímto účelem i komerčně využité ve farmacii a lékařství, je *Saccharomyces boulardii*. (Czerucka a kol., 2007; Hatoum a kol., 2012). Produkce antimikrobiálních (AM) a antifungálních látek (AF) byla však prokázána i u izolátů jiných druhů kvasinek (Hatoum a kol., 2012). Sekrece AM a/nebo AF proteinů vůči konkrétním patogenům je popsána v mnoha studiích. Například klinické studie se živými i lyofilizovanými kulturami *S. boulardii* prokázaly produkci proteinu 54kDa (serin esteráza) vůči klostridiálnímu toxinu a nižší frakce ≤ 10 kDa byly detekovány vůči zánětlivým markerům (Czerucka a kol., 2007; Palma a kol., 2015). Kromě AM a AF proteinů, mohou izoláty kvasinek produkovat glykoproteiny o velikosti 5-100 kDa s tzv. "Killer aktivitou" neboli, "Killer toxiny" (také mycocin, zymocin). Kvasinky, které tvoří "killer toxiny" (dále jen KT) mohou prostřednictvím těchto

toxinů zabíjet a/nebo inhibovat druhy, kmeny, biotypy kvasinek k nim citlivé. KT K2 a K28 jsou syntetizovány jako prekursori a po dozrání buněk jsou sekretovány do media. KT jsou schopné usmrcovat cílené citlivé buňky kvasinek přes buněčné receptory. K1 toxin poškozují buněčné membrány citlivých kvasinek přes nezávislé receptory buněčné stěny v β -D-glukanové struktuře a přes receptor v cytoplasmatické membráně, identifikovaný jako Kre1p. K28 toxin narušuje permeabilitu buněčné stěny přes manoproteinový komplex (Buzzini a kol., 2007). Výsledným efektem je zvýšená permeabilita buněčné membrány a buněčná smrt.

Fenotypy s produkcí KT se vyskytují napříč rodovým spektrem kvasinek bez ohledu na to, ze kterých zdrojů pocházejí. V rámci jednoho druhu se mohou vyskytovat jedinci s produkcí KT, jedinci citliví a/nebo rezistentní vůči KT. Fenotypově je produkce KT u kvasinek podmíněna přítomností viru, u *Saccharomyces cerevisiae* jsou to např. viry Totiviridae (dsRNA, L-A a M), které jsou v infikovaných buňkách přítomné jako virusové částice (virus-like particles, VLPs) zodpovědné za produkci KT- K1, K2, a K28 (Novotná a kol., 2004). V přirozených ekosystémech přítomnost viru a produkce KT výrazně zvyšuje kompetiční vlastnosti těchto fenotypů v substrátu. Účinek KT vůči sensitivním izolátům je podmíněn podmínkami prostředí jako je pH, teplota, denzita kvasinkových buněk v prostředí aj. Kvasinky s produkcí KT mohou v rámci interferenční kompetice chránit medium či hostitele před nežádoucími kontaminanty (patogeny) a zajistit jeho potřebné osídlení (Boynton a kol., 2016). Tento fenomén je předmětem studií v potravinářském průmyslu, zejména ve vinařství a pivovarnictví (Loweš kol., 2000). Populace kvasinek produkující KT byly testovány jako kontrolní mechanismus k řízení zastavení fermentačního procesu u vína, piva i chlebového kvasu (Antonini a kol., 2005, Lopes & Sangorrin, 2010). Jako prevence proti kontaminantům, zejména divokým kmenům kvasinek, jsou kvasinky produkující KT součástí startérových kultur (například inhibice *Brettanomyces bruxelensis*). Kromě inhibičních vlastností, KT produkované některými kvasinkami mají fungistatické účinky vůči oportunním patogenům jako např. KT *Pichia anomala* vůči *Candida albicans* (Vadkertiova & Slavikova, 2007). Fungistatické účinky jsou většinou podmíněny specifickými podmínkami jako je teplotní rozmezí pro účinek či pH. Kvasinky produkující KT byly také úspěšně testované vůči plísni *Botrytis cinerea* (Santos a kol., 2004). Navíc u řady KT byla potvrzena i antibakteriální aktivita vůči bakteriálním kontaminantům v nápojích. Některé KT byly úspěšně testované jako antimikrobiální agens vůči *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurum* a *Bacillus cereus* (Waema a kol., 2009). Využití kvasinek s produkcí KT nebo přímo filtrátů kvasinkových kultur s obsahem KT se nabízí jako vhodná alternativa nahrazující chemické konzervanty v potravinářství.

Ve vztahu ke kvasinkám kontaminujícím mlékárenské provozy a výrobky nebyly prozatím popsány přímé in-

terakce s kvasinkami produkujícími KT nebo s filtráty s obsahem KT. V rámci této pilotní studie jsme ověřovali *in vitro* účinek KT u 4 kmenů kvasinek s prokázanou produkcí KT vůči kvasinkám kontaminujícím mléčné výrobky a mlékárenské provozy rodu *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Trichosporon* sp. a *Saccharomyces* sp. a produkce KT byla ověřena proteomickými metodami.

Metody

Izolace, identifikace a uložení kontaminantů

Z kontaminovaných vzorků solných lázní a sýrů byly izolovány kvasinky na YPD mediu s přidavkem soli. Čistota izolátů byla ověřena mikroskopicky, proveden mikromorfologický popis buněk. Na morfologickém agaru (Kurtzman a kol., 2011) byla charakterizována makromorfologie kolonií kvasinek. Mikromorfologické znaky byly popsány na základě mikroskopického obrazu a identita byla ověřena na základě sekvenování ITS1F a ITS4 rRNA úseku (Eurofins, Německo). Kultury byly označeny akronymem sbírky a uloženy na šikmých agarech a kryoprezervaci pod glycerolem. Izoláty, jež nejsou označeny akronymem sbírky, jsou součástí pracovních sbírek Výzkumného ústavu mlékárenského s.r.o.. Všechny uvedené kmeny rodu *Candida*, *Trichosporon* a *Kluyveromyces marxianus* CCDBC 620 byly izolovány v rámci řešených projektů v roce 2019. Ostatní

Tab. 1 Seznam vybraných kontaminantů – kvasinek z mlékárenských provozů a sýrů. Tyto druhy byly použity pro testování antifungální aktivity kmenů kvasinek produkujících KT.

Matrice	Druh	kmen	Medium
syrečky	<i>Candida krusei</i>	CCDBC 600	YPD, YMA, GPY, morfologický agar, 25 °C
sýr	<i>Candida inoconspicua</i>	CCDBC 601	
sýr	<i>Candida parapsilosis</i>	CCDBC 612	
sýr	<i>Candida intermedia</i>	izolát	
solná lázeň	<i>Trichosporon asahii</i>	izolát	
solná lázeň	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	CCDBC 2032, 2033	
plísňový sýr	<i>Trichosporon domesticum</i>	CCDM 1062	
kefir	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CCDM 270	
koumis sýr		CCDM 258 CCDBC 620	
sýr	<i>Kluyveromyces lactis</i>	CCDBC 617	
vinařská	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CCDM 88	
vinařská		CCDM 282	
žitný kvas		CCDM 2004	
pivo		CCDM 1069	

Tab. 2 Seznam vybraných kvasinek s ověřenou produkcí KT včetně citací publikací, kde byly tyto izoláty popsány.

Označení izolátu	Druh	Citace
IFO 1267	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Gunge a kol., 1981
SK (T158-K1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Palfree a Bussey, 1979 Jirků, 1992
SS (S6/1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2n	Palfree a Bussey, 1979 Jirků, 1992
K2 1358	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Schmitt a Breinig, 2006

uvedené kmeny (tabulka 1) jsou dlouhodobě vedeny ve sbírce CCDM (viz www.ccdm.cz).

Testování filtrátu s KT vůči kvasinkám kontaminujícím potraviny – terčíkové testy

Kultury izolátů s ověřenou produkcí killer toxinů byly získány z PřFUK v Praze. Byly uchovávány na MEA na šikmých agarrech. Pro účel testování byly kultury s KT i kontaminanty kultivovány v YM bujónu při 25 °C 48 h (modif. Lopez a Sangorín, 2010). K testování aktivity KT na kmeny kontaminantů bylo použito základní medium YMA s 0,003% metylenové modři a obsahem soli (NaCl) 0 -1 -1,5 -2%. Medium bylo připraveno v citrátovém pufru a výsledné pH bylo 4.6. Tato media byla za účelem terčíkových, jamkových či proužkových kultur inokulována izolátem kontaminující kvasinky s koncentrací buněk 1×10^4 v 1 ml Rinsenova roztoku (Sigma-Aldrich, Německo) v množství 100 μ l na Petriho misku s průměrem 6 mm. V případě jamkového testu byly sterilně korkovrtem do každé misky vykrojeny tři jamky, které byly naplněny filtrátem. Filtrát byl připraven tak, že nakultivované kultury kvasinek produkující KT byly centrifugovány a supernatant byl následně filtrován sterilně stříkačkovým filtrem (Chromafil®CA-45/25(S), Německo) o velikosti pórů 4,5 μ m. K terčíkovým testům byly použity terčíky k testování antibiotik (Whatmann, 13 mm, USA). Hodnocena byla difúzní zóna na rozhraní terčíku (jamky) s filtrátem z kvasinek produkujících KT. Petriho miska byla seskenována a pomocí analýzy obrazu změřena difúzní zóna (mm). Pro každou interakci byly měřeny čtyři terčíky (jamky) ve dvou opakování.

Detekce KT ve filtrátu

Filtráty z nativních kultur kvasinek s produkcí KT byly připraveny tak, že nakultivované kultury kvasinek produkující KT byly centrifugovány a supernatant byl následně filtrován sterilně stříkačkovým filtrem (Minisart) o velikosti pórů 4,5 μ m. Další filtrace probíhala na kolonkách a filtrech Amicon Ultracel® Amicon ProAffinity Concentrator (Merck, USA) o předpokládané velikosti přefiltrovaných proteinů 1000 MWCO a 3000 MWCO. Z výše uvedených filtrátů byly zároveň izolovány proteiny pro SDS-PAGE separaci a analýzu proteinů za použití Ni-NTA Resin Kit® (Calbiochem, Novagen, USA) a systému kolon Amicon® Pro Purification System (MERCK Millipore, USA) pro 30 kDa, 100 kDa a ≥ 100 kDa. Tyto rozsahy byly zvoleny na základě studií Salek, 2001 a Buzzini a kol., 2007. Zakoncentrované produkty byly stabilizované za použití Laemli sample buffer s přídavkem merkaptanolu (95 °C) v poměru 1:1 (vzorek : pufr). K analýze SDS-PAGE byly připraveny 10 a 12% polyakrylamidové gely, vhodné na uvedené rozsahy proteinů, na které byly naneseny do jamek vzorky (8 μ l) a marker (Precision Plus® Protein Dual Xtra standards, Biorad, UK). Elektroforéza probíhala za použití aparatury MiniProtean® Electrophoresis System

(BioRad, UK), při teplotě 24 °C, při počátečním napětí 90 mA a po projetí vzorků jamkami a zaostřovacím gelem se navýšila na 120 mA. Po dokončení elektroforézy (migrační vzorků) (cca 1h) byly gely opláchnuty ultračistou vodou a stabilizovány v fixačním roztoku (50:10:40 / metanol: kyselina octová: H₂O) po dobu 30 min. Poté byly gely opláchnuty 3x ultračistou vodou po 5 minutách a následně barveny v GelCode™ Blue Stain (FisherScientific, Německo) po dobu 1h na kývací plošině. Gely byly promyty několikrát ultračistou vodou během 5 h. Kontrola a dokumentace izolovaných proteinových produktů na polyakrylamidovém gelu proběhla na světelné desce. Analýza produktů SDS-PAGE byla provedena pomocí GelAnalyser Software 2010.

Statistické zpracování dat

V rámci celého experimentu byl sledován vliv faktorů, které ovlivňovaly velikost inhibiční zóny. Sledován byl vliv média YMA s různým obsahem soli, rodové spektrum kvasinek, vnitrodruhová variabilita kontaminujících kvasinek a vliv kmene kvasinek s produkcí KT. K analýze dat byla použita faktoriální analýza variance a použit program Statistica software 12.0, Factorial ANOVA, Post Hoc LSD test. Faktoriální ANOVA byla použita rovněž při hodnocení faktorů v rámci samotné vnitrodruhové variability kontaminujících kvasinek, s cílem získat informaci o druhově podmíněných interakcích mezi kvasinkami s produkcí KT a kontaminanty.

Výsledky a diskuze

Detekce KT ve filtrátu

Na základě předešlých experimentů byly testovány čtyři kmeny KT produkujících kvasinek vůči šestnácti kmenům kontaminujících kvasinek spadající pod rody *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Trichosporon* sp. a *Saccharomyces* sp. Proteiny detekované metodou SDS-PAGE na 10% gelu, cíleně izolované pomocí membránových kolonek 100 a 30 kDa z hrubých filtrátů KT kvasinek, odpovídaly velikosti 75 a 50 kDa, což odpovídá K1 a K2 *Saccharomyces cerevisiae* (Salek, 2001) a 154 kDa v případě *Kluyveromyces lactis* (IFO1267) (Buzzini a kol., 2007). Tyto spektra odpovídající velikosti KT byly detekovány i u hrubého filtrátu spolu s dalšími proteiny, jejichž funkce nám není známá. Filtrace a zakoncentrování produktu přes kolonky Amicon Pro umožňují cílenou detekci KT na základě jejich známé molekulární hmotnosti.

Testování filtrátu s KT vůči kvasinkám kontaminujícím potraviny – terčíkové testy

Každý rod kontaminující kvasinky byl zastoupen čtyřmi izoláty, které reprezentovaly jeden nebo více druhů. Velikost inhibičních zón byla měřitelným kritériem pro hodnocení rozdílu mezi filtráty obsahujícími KT, různé citlivosti na KT v rámci druhů a rodů kvasinkových kontaminantů. Efekt filtrátu spočíval nejen v tvorbě

inhibiční zóny, ale také byla ovlivněna morfologie kolonií kvasinek a jejich densita. Velikost inhibičních zón byla ve všech případech do 4 mm. Faktoriální analýza v rámci celého experimentu prokázala, že významnými faktory, jenž ovlivňují tvorbu a velikost inhibičních zón, je pouze druh kontaminanta a medium s různým obsahem soli (Tab 3). Vnitrodruhová variabilita kontaminantů a původ filtrátu tj. kmen produkující KT, neměly na základě této faktoriální analýzy významný vliv na velikost inhibičních zón.

Detailní analýzy pro jednotlivé rody kvasinek-kontaminantů (*Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Trichosporon* sp., *Saccharomyces* sp.) potvrdily, že rozdíl ve velikosti a tvorbě mezi izoláty spadající pod *Saccharomyces cerevisiae* a *Kluyveromyces* sp. je statisticky nevýznamný (Tab. 4). Kmeny rodu *Candida* sp. a *Trichosporon* sp., vykazovaly průkazné rozdíly ve velikosti difúzních zón v rámci druhové variability (Tab 4). U rodu *Candida* se jedná o druhovou specificitu a u rodu *Trichosporon* se potvrdila variabilita i v rámci druhu *Trichosporon coremiiforme*. Podrobné analýzy jednotlivých rodů kontaminantů také potvrdily, že původ filtrátu s KT měl signifikantní vliv na tvorbu zóny u rodů *Kluyveromyces* a *Saccharomyces* resp., jednalo se o filtráty od stejných rodů s produkcí KT. Vliv filtrátu s KT na tvorbu zóny nebyl průkazný v rámci rodu *Trichosporon* a *Candida*. Kultivační medium bez a s odstupňovaným přidavkem soli tvorbu a velikost inhibičních zón jednoznačně ovlivňovalo ve všech případech.

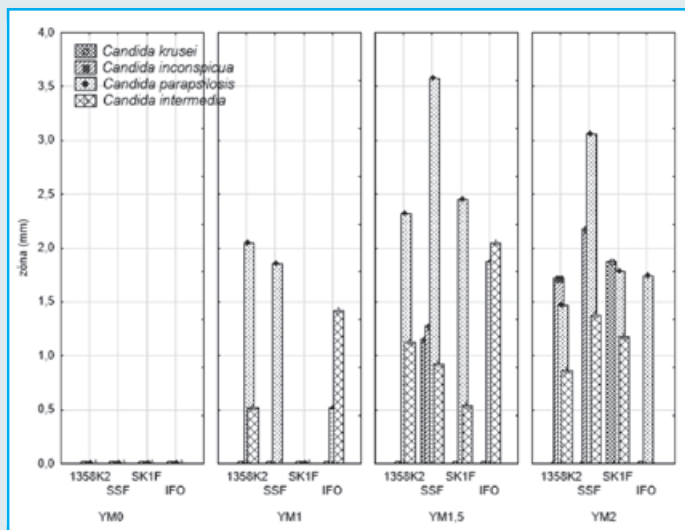
Na základě tvorby a velikosti inhibičních zón je zřejmé že, že izolát *C. krusei* vykazoval minimální citlivost vůči testovaným KT kmenům, a to pouze na médiích s 1,5 -2% obsahem soli (Obr. 1). Obdobný výsledek byl pozorován u *Candida inconspicua*.

Tab. 3 Celkový vliv testovaných faktorů pro všechny kmeny kvasinkových kontaminantů na velikost zóny (mm) s ohledem na sledované faktory v rámci celého experimentu: rod kvasinky, vnitrodruhovou variabilitu a medium s obsahem soli. Statistica software 12.0, Factorial ANOVA, $p \leq 0,05$. Index* označuje statisticky významný faktor, ns statisticky nevýznamné.

Faktor	Stupně volnosti	F	p
Rod kvasinky	3	3,7955	0,010943*
Vnitrodruhová variabilita	3	1,1307	0,337258ns
Kmen s produkcí KT	3	1,1342	0,335880ns
Medium	3	34,2688	0,000000*

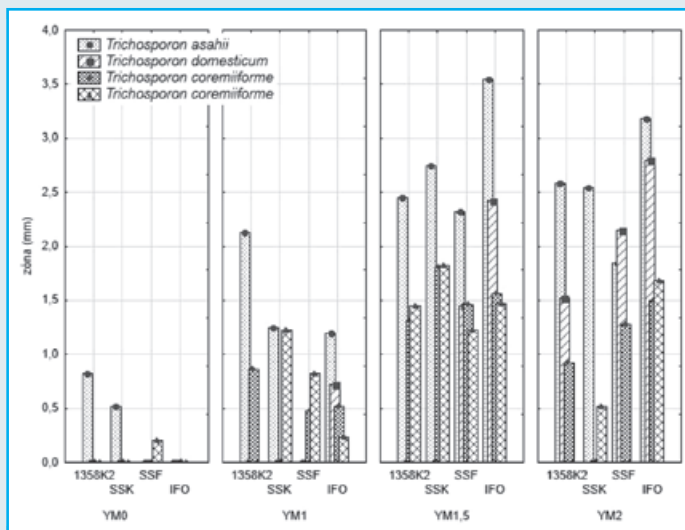
Tab. 4 Vliv testovaných faktorů v rámci rodů kontaminujících kvasinek – vnitrodruhové variability, kmenů s produkcí KT a medium s obsahem soli na vnitrodruhovou variabilitu kvasinkových kontaminantů. Statistica software 12.0, Factorial ANOVA, $p \leq 0,05$. Index* označuje statisticky významný faktor, ns statisticky nevýznamné.

Kontaminant	Stupně volnosti	rod							
		<i>Kluyveromyces</i>		<i>Saccharomyces</i>		<i>Trichosporon</i>		<i>Candida</i>	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Vnitrodruhová variabilita	3	1,62	0,19ns	2,11	0,11ns	9,86	0,001*	11,09	0,001*
Kmen s produkcí KT	3	4,48	0,01*	7,86	0,001*	2,28	0,089ns	1,88	0,14ns
Medium	3	5,14	0,003*	17,23	0,001*	21,210	0,001*	10,41	0,001*

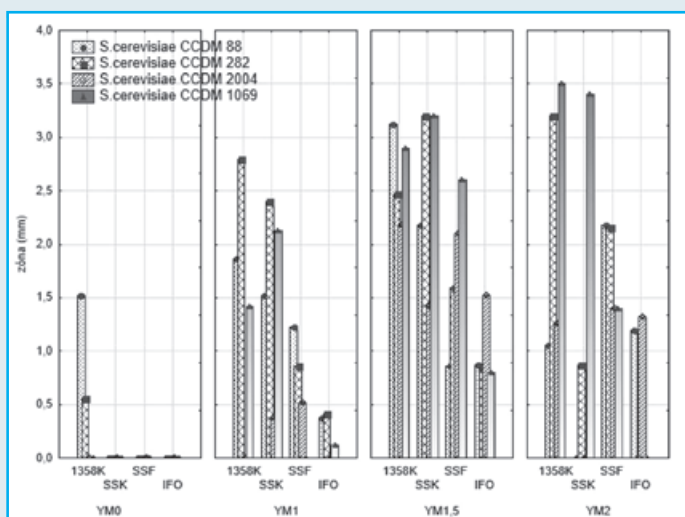


Obr. 1 Velikost inhibiční zóny (mm) jako reakce druhů *Candida* sp. na přítomnost filtrátů s KT na médiích s různým obsahem soli.

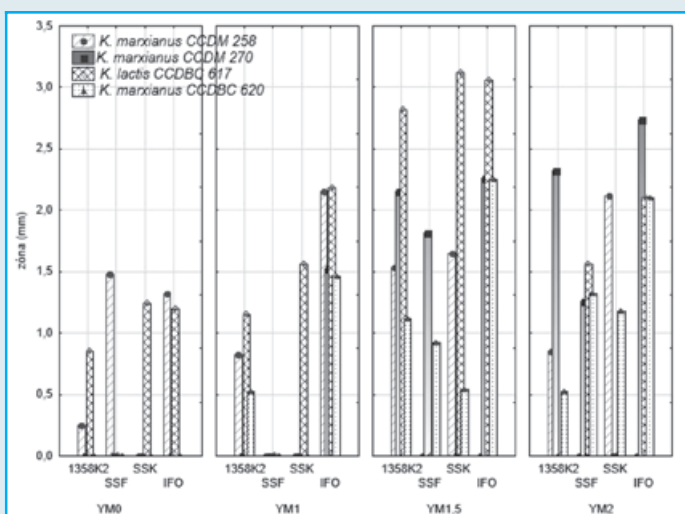
U *Candida inconspicua*. Kmen *Candida parapsilosis* CCDBC 612 reagoval na přítomnost filtrátu s KT tvorbou inhibičních zón ve všech médiích obsahujících sůl. Obdobně reagoval na přítomnost KT i izolát *C. intermedia*. Reakce těchto dvou druhů na přítomnost KT byla významně odlišná od *C. krusei* a *C. inconspicua*. Druhy kandid, jež byly testovány, jsou nežádoucími kontaminanty v mlékárenském průmyslu, ale také jsou známé jako příležitostní patogeni (Buzzini a Martini, 2001). Tvorba inhibičních zón probíhala v optimálních podmínkách *in vitro* a není tudíž známá reakce na technologické podmínky zejména u kvasinek produkujících killer toxin. Nicméně, jejich původ poukazuje na vysokou toleranci k obsahu soli a technologickým procesům. Jsou značně polymorfni a schopné se přizpůsobit různým podmínkám. Toto prvotní testování KT druhů kvasinek vůči kandidám bylo provedeno v řízených podmínkách – stejné pH substrátu a teplota kultivace. Řada studií uvádí variabilitu v citlivosti vůči KT toxinu v závislosti na pH prostředí, obsahu soli a teplotě, ale také na koncentraci konkurenčního druhu kvasinek (Boynton, 2019; Baeza akol. 2008). Izoláty kontaminantů byly izolovány z matric jako je solné médium či sýry, jsou tedy schopné růst a přežít v prostředí s vyšším obsahem soli. V rámci hodnocení jejich vlastností coby sbírkových kmenů byl hodnocen růst v mediu s obsahem soli 1-10 % u všech uvedených kmenů. U kmenů produkující KT byl ověřen



Obr. 2 Velikost inhibiční zóny (mm) jako reakce druhů *Trichosporon* sp. na přítomnost filtrátů s KT na médiích s různým obsahem soli.



Obr. 3 Velikost inhibiční zóny (mm) jako reakce kmenů *Saccharomyces cerevisiae* na přítomnost filtrátů s KT na médiích s různým obsahem soli.



Obr. 4 Velikost inhibiční zóny (mm) jako reakce kmenů *Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus* na přítomnost filtrátů s KT na médiích s různým obsahem soli.

růst v médiích s přidavkem soli 0-5 % a byl sledován při teplotě 25 °C beze změn oproti kontrolním variantám bez soli. Většina studií zaměřená na AF aktivitu killer toxinů popisuje specifické korelace mezi obsahem soli v mediu a pH. Je třeba ale zohlednit rod, druh a izolát KT produkující kvasinky a experimentální podmínky (Boynnton, 2019).

U druhů rodu *Trichosporon* se jako nejcitlivější ukázal izolát druhu *Trichosporon asahii*, který tvořil inhibiční zóny se všemi filtráty a s některými i při nulovém obsahu soli v mediu (Obr. 2). I zde se nepotvrdila významná variabilita v účinku mezi filtráty s KT, ale významný byl rozdíl v citlivosti testovaných kontaminantů rodu *Trichosporon*. *T. domesticum* (CCDM 1062) tvořil inhibiční zóny v reakci na přítomnost KT až při vyšších dávkách soli tj. 1,5-2 % a stejně tak oba izoláty *T. coremiiforme*.

I když je uváděno, že účinek killer toxinů je zpravidla druhově specifický (Buzzini a kol, 2007), je patrné, že na filtráty druhů *S. cerevisiae* a *K. lactis* reagovaly tvorbou inhibiční zóny i jiné druhy kvasinek. Je to však otázka experimentálních podmínek, rodu, druhu a vnitrodruhové variability a také původu a fenotypu kontaminující kvasinky. Testování účinku KT vůči patogenním kvasinkám provedl Buzzini a kol, 2001. Testoval úspěšně filtráty druhů *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* a *Pichia anomala* s produkcí KT při 37 °C vůči 382 druhům kvasinek se zaměřením na patogenní druhy. Testování v našich podmínkách proběhlo při 25 °C, kde byla zohledňována optimální teplota pro růst a vývoj většiny testovaných druhů kontaminantů. V případě potravinářských kontaminantů by bylo vhodné sledovat i efekt nižších teplot s ohledem na technologii výroby daného výrobku a na možnost vstupní kontaminace.

Filtráty s obsahem KT měly významný vliv na tvorbu inhibičních zón v rámci testování na kmenech náležejících ke *Kluyveromyces lactis* a *Kluyveromyces marxianus* (Obr. 4). Tvorba inhibičních zón nebyla tedy v tomto případě významně podmíněna testovanými kmeny kontaminantů, ale původem filtrátu. Nejcitlivějším kmenem byl kmen CCDBC 6017 (*K. lactis*) v interakci s filtrátem IFO1268 (*K. lactis*). Inhibiční zóny se objevovaly i na médiích bez a s nízkým obsahem soli. Kmeny *S. cerevisiae* (Obr. 3) reagovaly tvorbou inhibiční zóny se všemi filtráty s KT, i když reakce na kmen IFO1268 (*K. lactis*) byla významně nižší než u ostatních filtrátů s KT, které pocházely ze *S. cerevisiae*.

Závěr

I když se v tomto případě jedná na našem pracovišti o pilotní studii s omezeným počtem filtrátů i kontaminantů, možnost protektivního využití filtrátů s KT je reálná, přestože faktorů, které výsledný efekt ovlivňují, je celá řada. Primární roli hraje výběr kmene

s intenzivní produkcí KT s širokým spektrem účinku. Některé studie jako Wojcik a Kordowska-Wiater (2015) zmiňují, že největší potenciál v rámci kmenů s produkcí KT představují divoké kmeny kvasinek. Samotné testování interakcí in vitro má své limity, ale bez tohoto kroku nelze ověřit fenotypy a biotypy kvasinek, citlivost vůči KT za optimálně řízených podmínek (Buzzini a kol., 2007). I když byl otestován vliv KT na velké druhové spektrum kvasinek, nejvíce studií je zaměřeno na potenciální využití KT ve farmácii vůči patogenním druhům kvasinek, déle ve vinařství a pivovarnictví. Ostatní odvětví potravinářského průmyslu, včetně mlékárenství antifungální efekt kvasinek s produkcí KT vůči kvasinkovým kontaminantům prozatím opomíjí.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu QK1910036 a institucionální podpory MZE-RO1418.

Literatura

- ANTONINI S.R.C., SANINO A., ARAÚJO J.C. & TOSTA C.D. (2005): The killer yeasts and the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5, s. 40-46.
- BAEZA M. E., SANHUEZA M. A. CIFUENTES H.V. (2008): Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biol Res*, 41, s. 73-182.
- BOYNTON P. J. (2019): The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast*, 36, s. 473-485.
- BUZZINI P., TUCCHETTI B., VAUGHAN-MARTINI A.E. (2007): The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res*, 7, s. 749-760.
- BUZZINI P. & MARTINI A. (2001): Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. *Med Mycol*, 39, s. 479-482.
- CZERUCKA D., PICHE T., RAMPAL P. (2007) Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, s. 767-778.
- GEDDES-MCALLISTER J. A SAPIRO R (2019): New pathogens, new tricks: emerging, drug resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1435, s. 57-85.
- GUNGE A., TAMARU F., OZAWA K., SAKAGUCHI I. (1981): Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of bacteriology*, 145, 382-390.
- HATOUM R., LABRIE S., FLISS I. (2012): Antimicrobial and probiotic properties of yeast from fundamentals to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, s. 1-12.
- 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.
- LOPES, C. A. a SANGORRÍN, M. P. (2010): Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, s. 298-306.
- LOWES, K., SHEARMEN, C.A., PAYNE, J. MACKENZIE, D., ARCH, D.B., MERRY, R.J. & GASSON, M.J. (2000): Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocins HM K. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, s. 1066-1076.
- NOVOTNÁ D., FLÉGELOVÁ H. a JANDEROVÁ B. (2004): Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4, s. 803-813.
- JIRKŮ V. (1992): Nystatin and killer toxin sensitivity of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 8, s. 192-195.
- PALFREE R.G.E. a BUSSEY H. (1979): Yeast Killer Toxin: Purification and Characterisation of the Protein Toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 93: 487-493.
- PALMA M. L., ZAMITH-MIRANDA D., MARTINS F. S., BOZZA F. A., NIM-RICHTER L., MONTERO-LOMELI M., MARQUES E.T.A., DOURADINHA B. (2015): Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, s. 6563-6570.
- SALEK A.T. (2001): Yeast antimicrobial proteins, *Biotechnology*, 4, s. 135-162.
- SANTOS, A., SANCHEZ, A. a MARQUIRA, D. (2004): Yeast as biological agent to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 159, s. 331-339.
- SANTOS, A., SAN MAURO, M., BRAVO, E. & MARQUINA, D. (2009): PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155, s. 624-634.
- SCHMITT M., BREINIG F. (2006): Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*, 4, 212-221.
- VADKERTIOVA R. a SLAVIKOVA E. (2007): Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. *Polish Journal of Microbiology*, 56, s. 39-43.
- WAEMA S., MANEESRI J. a MASNIYOM P. (2009): Isolation and identification of killer yeast from fermented Vegetables. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, s.126-134.
- WOJCIK-KORDOWSKA M. a WIATER M. (2015): The occurrence of killer activity in yeasts isolated from natural habitats. *Acta Biochimica Polonica*, 62, 821-824.

Korespondující autor: Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: m.kavkova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 23. 6. 2020
Lektorováno: 5. 8. 2020

SCREENING NA MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACI V SOLI A OCHUCUJÍCÍCH SLOŽKÁCH PRO MLÉČNÉ VÝROBKY

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jana Smolová,
Ivana Hyršlová
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Screening on microbial contaminants in salt
and flavouring components for dairy products

Abstrakt

Porozumění zdrojům a cestám šíření mikrobiální kontaminace ve výrobě mléčných výrobků je komplexní problém. Tato práce se zaměřuje na vybrané suroviny a složky, které jsou k mléčným meziproduktům přidávány. Zatímco tepelně ošetřené gelové ochucující