

Tab. 4 Množství AK v sýrech během procesu zrání v rozmezí 45 až 120 dní (n = 3; p = 95 %)

stáří sýra	45 dní	75 dní	120 dní
AK	NH <sub>4</sub> /12/19/22 mg/kg	NH <sub>4</sub> /12/19/22 mg/kg	NH <sub>4</sub> /12/19/22 mg/kg
1-Lys	1121 ± 85/1798 ± 118/2081 ± 169/1897 ± 141	1954 ± 121/2921 ± 102/3215 ± 98/2804 ± 145	3309 ± 254/5132 ± 425/5343 ± 369/4812 ± 287
2-Arg	45 ± 7/119 ± 8/154 ± 11/186 ± 14	<38/244 ± 17/179 ± 9/268 ± 24	<38/305 ± 22/188 ± 12/290 ± 18
3-His	203 ± 19/429 ± 32/454 ± 41/452 ± 27	328 ± 21/826 ± 45/686 ± 49/629 ± 56	513 ± 41/1270 ± 101/1271 ± 98/1045 ± 84
4-Gly	541 ± 42/220 ± 17/322 ± 25/260 ± 17	253 ± 25/393 ± 29/525 ± 42/430 ± 37	467 ± 28/733 ± 65/878 ± 71/751 ± 72
5-Asn	791 ± 65/839 ± 47/920 ± 38/937 ± 48	1123 ± 89/1406 ± 112/1465 ± 95/1297 ± 87	1666 ± 115/1952 ± 145/2124 ± 102/1956 ± 98
6-Ala	300 ± 25/358 ± 29/485 ± 35/351 ± 21	424 ± 18/509 ± 38/610 ± 48/501 ± 65	578 ± 44/865 ± 74/934 ± 89/782 ± 61
7-Ser	365 ± 28/400 ± 35/390 ± 17/311 ± 10	531 ± 26/652 ± 39/606 ± 42/532 ± 36	767 ± 58/985 ± 85/896 ± 105/841 ± 61
8-Thr	375 ± 45/436 ± 35/410 ± 21/380 ± 29	724 ± 66/714 ± 54/588 ± 47/542 ± 51	939 ± 69/1009 ± 87/959 ± 74/1104 ± 95
9-Pro	481 ± 29/1059 ± 54/1210 ± 75/975 ± 84	829 ± 78/1703 ± 95/2011 ± 154/1663 ± 121	1642 ± 127/2942 ± 254/3297 ± 198/2703 ± 245
10-Phe	673 ± 45/864 ± 85/818 ± 71/843 ± 65	1038 ± 47/1453 ± 85/1477 ± 96/1300 ± 68	1765 ± 115/2347 ± 178/2492 ± 164/2238 ± 136
11-Met	280 ± 22/333 ± 28/296 ± 11/234 ± 15	410 ± 27/469 ± 31/389 ± 25/434 ± 29	561 ± 51/830 ± 62/805 ± 69/641 ± 54
12-Val	556 ± 45/923 ± 81/941 ± 75/842 ± 66	1041 ± 75/1489 ± 81/1476 ± 115/1285 ± 87	1906 ± 85/2579 ± 135/2453 ± 175/2326 ± 165
13-Leu	1473 ± 98/1881 ± 78/1988 ± 147/2017 ± 112	2182 ± 175/3040 ± 251/3153 ± 178/2938 ± 195	3542 ± 210/5038 ± 415/4912 ± 354/4539 ± 254
14-Ile	383 ± 28/493 ± 41/590 ± 38/468 ± 17	497 ± 47/794 ± 85/901 ± 65/676 ± 58	992 ± 101/1404 ± 110/1687 ± 95/1415 ± 121
15-Gln	815 ± 65/1047 ± 71/1117 ± 88/1063 ± 74	1257 ± 85/1549 ± 113/1721 ± 87/1224 ± 101	1570 ± 131/2046 ± 154/2236 ± 144/1842 ± 132
16-Tyr	432 ± 25/445 ± 36/420 ± 28/382 ± 41	662 ± 48/727 ± 51/742 ± 86/616 ± 54	1040 ± 72/1241 ± 83/1183 ± 58/931 ± 69
17-Trp	50 ± 11/57 ± 13/72 ± 8/28 ± 6	46 ± 9/94 ± 10/98 ± 7/52 ± 6	108 ± 21/171 ± 11/145 ± 13/131 ± 9
18-Glu	2280 ± 175/3002 ± 205/3280 ± 269/3054 ± 154	3674 ± 185/5061 ± 325/5248 ± 251/4391 ± 321	5751 ± 369/7627 ± 547/8321 ± 414/7260 ± 369
19-Asp	211 ± 15/202 ± 21/225 ± 17/196 ± 16	320 ± 25/284 ± 29/398 ± 36/290 ± 14	512 ± 29/569 ± 41/654 ± 38/481 ± 26

McSWEENEY P. L. H. (2004): Biochemistry of cheese ripening. *Inter. Journal of Dairy Technology*, 57, s. 127–144.

MOORE S., STEIN W. H. (1963): Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, 6, s. 819–831.

ROUBAL P., BAZALOVÁ O., ČURDA L., DRÁB V., HYRŠLOVÁ I., ŠTĚTINA J. (2021): Využití enzymatického a probiotického potenciálu mikroorganismů k vývoji nových a zvýšení kvality a trvanlivosti stávajících mléčných a pekárenských výrobků. *Redakčně upravená zpráva projektu QK1910024*.

SARWAR G., BOTTING H. G. (1993): Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 615, s. 1–22.

MIREILLE Y., RIJNEN L. (2001): Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, s. 185–201.

#### Korespondující autor:

Mgr. Ladislav Bár

Sýrařské oddělení, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Soběslavská 841, 390 02 Tábor

e-mail: l.bar@vum-tabor.cz

Přijato dne: 31. 10. 2022

Lektorováno: 24. 11. 2022

## ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA KVASINEK VŮČI KONTAMINANTŮM RODU ASPERGILLUS SPP. A PENICILLIUM SPP.

Miloslava Kavková<sup>1</sup>, Šárka Horáčková<sup>2</sup>, Vladimír Dráb<sup>1</sup>,  
Jaromír Cihlář<sup>1</sup>, a Ladislav Bár<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,

<sup>2</sup> Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Antifungal activity of yeast against fungal  
contaminants *Aspergillus* spp. and *Penicillium*  
spp.

#### Abstrakt

Testování a aplikace protektivních látek přírodního původu nebo nezávadných a bezpečných mikrobiálních agens a jejich produktů se dostává, v návaznosti na poptávku po potravinách bez chemických konzervantů, do popředí výzkumu. Mezi taková agens patří i druhy kvasinek, které vykazují antifungální aktivitu vůči plísním. V naší studii jsme testovali inhibiční aktivitu pěti izolátů *Wickerhamomyces anomalus*, šesti izolátů

kvasinek *Kazachstania pseudohumilis*, *K. humilis*, *K. barnettii* a *K. unispora* a čtyřech izolátů *Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus* na růst mycelia osmi druhů aspergilů a šesti druhů penicilií, izolovaných z kontaminovaných potravin a provozů. Výsledky ukázaly, že izoláty jednotlivých druhů kvasinek, které úspěšně inhibovaly aspergily, vykazovaly nižší inhibiční efekt vůči peniciliím. Významná byla také variabilita v citlivosti aspergilů a penicilií vůči testovaným kmenům kvasinek. *Aspergillus niger* a *A. flavus* byly vůči působení kvasinek méně citlivé než ostatní druhy aspergilů. Významný inhibiční efekt na růst mycelia aspergilů (74 % oproti kontrolnímu růstu) byl pozorován u izolátů *Wickerhamomyces anomallus* KV3 (74 %) a KV4 (70 %), kdežto vůči peniciliím se uplatňoval kmen CCDM 605, který inhiboval růst mycelia o 60 % oproti kontrolám. Růst mycelia u penicilií významně inhiboval o 77 % kmen *Kluyveromyces lactis* CCDM 1054. I když se jedná o in vitro testy, je zřejmé, že určité kmeny kvasinek jsou schopné inhibovat růst mycelia aspergilů a penicilií. Kmen *K. lactis* CCDM 1054 také intenzivně produkoval kyselinu mléčnou a sorbovou, což snižovalo pH substrátu. Kmeny *K. pseudohumilis* CCDM 3302 a *K. humilis* CCDM 3305 inhibovaly růst mycelia plísní o 57-50 % oproti kontrolám. Tyto kmeny a *K. lactis* CCDM 1054 se lišily spektrem extracelulárně produkováných proteinů a peptidů v 30kDa koncentráte.

**Klíčová slova:** kvasinky, mikromycety, inhibice, růst mycelia, metabolické produkty

## Abstract

The testing and application of natural protective substances or wholesome and safe microbial agents, including its products, become on research focus because of customers' requests. These microbial agents also include the yeast performing the antifungal activity against the moulds. We tested the inhibitory effect of five isolates of *Wickerhamomyces anomallus*, six isolates of *Kazachstania humilis*, *K. pseudohumilis*, *K. barnettii*, *K. unispora* and four isolates of *Kluyveromyces lactis* and *K. marxianus* against on growth of mycelia of eight species of *Aspergillus* sp. and six species of *Penicillium* sp. obtained from contaminated food and manufacturing plants. The results showed that yeast performed various antifungal effects against aspergilli and penicilia. The differences were also noted in sensitivity within the species *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.. The strains of *A. niger* and *A. flavus* were more resistant to the yeast and its metabolic products than other strains. The isolates KV3 (74 %) and KV4 (70 %) belonging to *W. anomallus* significantly inhibited the growth of aspergilli, whereas the strain CCDM 605 (60 %) inhibited the growth of *Penicillium* sp. in comparison to control variants. The strain CCDM 1054 (*K. lactis*) significantly suppressed *Penicillium* sp. growth (77 %). This strain also produced intensive lactic and sorbic acid in cultivation media and decreased the

substrate's pH value. Strains CCDM 3302 (*K. pseudohumilis*) and CCDM 3305 (*K. humilis*) suppressed the growth of mycelia by 57-50 % compared to the control. These two strains and *K. lactis* CCDM 1054 produced a spectrum of peptides and proteins in 30kDa concentrates.

**Keywords:** yeast, micromycetes, inhibition, mycelial growth, metabolic products

## Úvod

Vláknité mikromycety a kvasinky představují druhově rozmanité skupiny houbových organismů, které spolu s řadou mikroorganismů tvoří v přirozených podmínkách komunity, v nichž dochází k vzájemným interakcím na úrovni kompetice o živiny a prostor, antibiocy, parazitismu či predace. Potravin, pekařské a mléčné výrobky, představují pro vláknité mikromycety i kvasinky uniformní prostředí bohaté na živiny s malou mikrobiologickou konkurencí. Nejčastějšími kontaminanty potravin jsou vláknité mikromycety, zejména rody *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., a *Fusarium* spp.. Kontaminující druhy zpravidla tolerují vyšší hladinu soli (halotolerantní druhy) (15 %), nízkou vodní aktivitu ( $a_w$ ) a mají širší teplotní amplitudu (Garnier a kol., 2017; Udovickí a kol., 2018). Potravin znehodnocují nejen nutričně i senzory, ale i produkcí mykotoxinů a dalších sekundárních metabolitů (Ráduly a kol., 2020). Sanitace výrobních a expedičních prostor a zařízení schválenými prostředky je sice pravidelnou součástí výrob, ale vzhledem k rezistentním a adaptačním mechanismům kontaminujících plísní nemusí být vždy efektivní. Legislativa EU povoluje konzervační prostředky v pekařských výrobcích, jako je E 280 (kyselina propionová) nebo E281 (propionát sodný) v množství 0,2-0,3 % (hm) (Coda a kol., 2011), které chrání výrobek po deklarovanou dobu. V mléčných výrobcích jsou také v rámci EU povolené konzervanty, jako je kyselina sorbová (E200) a její soli (E202 a E203), benzoáty (E211, E212, E213) (Nařízení komise (EU) č. 1129/2011, Garnier a kol., 2017). V současné době jsou celosvětově preferovány potraviny bez chemických konzervantů. Řada studií se proto zaměřuje na vývoj a aplikaci konzervantů přírodního původu (rostlinné éterické oleje aj.), využití bakterií mléčného kvašení a jejich metabolických produktů (Matevosyan a kol., 2020, Wang a kol., 2021) a také kvasinek (Souza a kol., 2017; Freimoser a kol., 2019). Antifungální aktivita kvasinek vůči toxigenním plísním je přičítána kombinacím několika mechanismů, jako např. kompetice o prostor a živiny, sekrece enzymů (glukanázy, chitinázy, proteázy), produkce toxinů a uvolňování těkavých látek (VOCs) (Freimoser a kol., 2019). Produkce těchto látek jsou podmíněné vnitrodruhovou variabilitou (jsou tedy vlastností kmene, nikoliv obecně druhu) a podmínkami prostředí. Výběr kmene s antifungální aktivitou musí být cílen tak, aby účinek byl efektivní a bez vedlejšího účinku, tedy bez znehodnocení potravinářského produktu

kvasinkou. V rámci ochrany potravin před plísněmi, zejména u kvasů, se využívá synergického účinku kvasinek s prokázaným antifungálním účinkem v kombinaci s laktobacily (Carbonetto a kol., 2020). Na základě dostupných vědeckých výsledků a výsledků získaných při řešení projektů jsme se zaměřili na antifungální aktivitu kmenů rodů *Wickerhamomyces* sp., *Kazachstania* spp. a *Kluyveromyces* spp.. Celkem 15 kmenů kvasinek bylo testováno vůči osmi druhům aspergilů a šesti druhům penicilií.

## Materiály a metody

### Houbové organismy

Kvasinky (Tabulka 1) a vláknité mikromycety (Tabulka 2) použité k testování vzájemných interakcí pocházejí ze sbírek mikroorganismů CCDBC (Milcom a.s., CZ) a CCF (Karlova univerzita, CZ). *A. tabacinus* a *A. unguis* jsou kmeny izolované z kontaminovaných pekařských a mléčných výrobků. Stejně jako kmeny ze sbírek CCDBC a CCF, byly nově izolované kmeny identifikovány na základě sekvenování jaderných a nejaderných úseků DNA (barkódování) podle Schoch a kol., 2012; Stiellow a kol., 2015 a dále doplněny o mikroskopické popisy (Samson a kol., 2010). Kmeny kvasinek byly určeny na základě sekvenace ITS spektra (Schoch a kol., 2012) a morfologie kolonií a buněk (Kurtzman a kol., 2014).

### Antifungální test

Interakce mezi kvasinkami a vláknitými mikromycetami byly testovány modifikovanou metodou podle Demirbas a kol. 2017. Za účelem testování byly mikromycety kultivovány metodou přelivu vytemperovaným malt extrakt agarem (MEA, Himedia, Indie) a to tak, že

Tab. 1 Seznam použitých kmenů kvasinek

Rod	Druh	Kmen
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>anomalus</i>	CCDM 605, CL8, KV4, WA2, KV3
<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	CCDM 1054, KL6A
	<i>marxianus</i>	CCDM 258, CCDM 270, KM8A
<i>Kazachstania</i>	<i>pseudohumilis</i>	CCDM 3300, CCDM 3302
	<i>barnettii</i>	CCDM 3301
	<i>humilis</i>	CCDM 3305
	<i>unisporea</i>	CCDM 3304, CCDM 2010

Tab. 2 Seznam použitých kmenů mikromycet rodů *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.

<i>Aspergillus</i> sp.	Akronym	<i>Penicillium</i> sp.	Akronym
<i>A. fumigatus</i>	CCF3170	<i>P. glabrum</i>	CCDBC 312
<i>A. penicillioides</i>	CCF1832	<i>P. crustosum</i>	CCF 304
<i>A. niger</i>	CCF3264	<i>P. carneum</i>	CCF 308
<i>A. tabacinus</i>	Izolát VUM	<i>P. discolor</i>	CCDBC 340
<i>A. cibarius</i>	CCDBC 318	<i>P. fimum</i>	CCDBC 339
<i>A. versicolor</i>	CCDBC 321	<i>P. chrysogenum</i>	CCDBC 311
<i>A. unguis</i>	Izolát VUM		
<i>A. montevicensis</i>	CCDBC 338		

1ml inokulum ve formě kapky obsahovalo  $1.10^5$  konidií ve fyziologickém roztoku. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány při 25 °C, penicilia 5 dní, aspergily 7 dní. Kvasinky byly kultivovány 24 h v YPD (kvasničný extrakt, pepton, dextrosa) bujónu (Himedia, Indie). Vytemperovaný MEA agar byl zaočkován 1% podílem bujónu s kmenem či izolátem kvasinek po 24 h kultivaci a rozlit na Petriho misky. Koncentrace kvasinek na Petriho miskách dosahovala koncentrace  $10^5$  buněk v 1 mL. Koncentrace konidií a kvasinek byly definovány na základě výpočtu v Bürkerově komůrce (Samson a kol., 2010). Z Petriho misek s nakultivovanými penicilií či aspergily byly sterilně korkovrtem vyseknuté terčíky (průměr 5 mm). Na každou misku s kmenem kvasinky byly přeneseny dva terčíky od každého druhu penicilia a aspergila. Misky byly kultivovány v 25 °C v termostatu. Radiální růst mycelia byl měřen po 24 h po dobu 5-7 dní. Od okraje každého terčíku byl měřen růst mycelia na čtyřech místech. Růst mycelia penicilií a aspergilů z terčíků na čistém MEA představoval kontrolní variantu. Celé experimenty včetně kontrol byly opakovány třikrát včetně všech měření.

## Extracelulární produkty kvasinek

### Organické kyseliny

Hodnoty pH byly stanoveny u bujónů (YPD, MEA) zaočkováných kvasinkami po 24h kultivace pomocí pH metru InoLab pH 720 a elektrody SenTix Sp (WTW, Německo). Profil organických kyselin pro každý kmen/izolát v obou médiích byl vyhodnocen kapilární izotachoforézou (EA 02, VILLA Labeco, Slovakia) a kapilární elektroforézou Agilent CE G7100 (Agilent Technologies, USA) s UV detekcí.

### Proteiny a peptidy

Extracelulární proteiny a peptidy byly izolovány pomocí ultrafiltračních kolonek AMICON 30 MWO (Sigma Aldrich, USA) (Kavková a kol., 2022). Profil extracelulárních peptidů a proteinů byl detekován podle Haider a kol., 2011 metodou Tricine-SDS-PAGE na 15 % a 12 % polyakrylamidovém gelu.

## Zpracování dat

Antifungální testy byly opakovány třikrát pro všechny kombinace kvasinek, aspergilů a penicilií. Výsledky byly zpracovány v programu Statistica Soft. verze 12.1. (StatSoft Europe, Hamburg, Germany) metodou analýzy variance s faktoriálním designem při  $p \leq 0,05 \leq \alpha$  s následnou Post Hoc analýzou (Post Hoc Tukey test) (Lepš a Šmilauer, 2016). Prezentovaná data představují statistické hodnoty (Df – stupně volnosti, F – hodnota kvantilů, a p – nejmenší hladina významnosti testu) a definují tak významnou variabilitu pro aspergily a penicilia, pro testované kmeny kvasinek a pro kombinaci kvasinek a aspergilů či penicilií.

## Výsledky a diskuze

Testování antifungálního účinku u tří rodů kvasinek vůči aspergilům a peniciliím ukázalo, že míra inhibice růstu mycelia na MEA s kvasinkou je závislá na druhu a kmenu kvasinky, ale také na druhu penicilia nebo aspergilu, které vykazují vůči kvasinkám různou citlivost. Druhy aspergilů s melanizovanými konidiiemi (*A. niger* a *A. fumigatus*) jsou méně citlivé vůči kvasinkám a jejich metabolitům než druhy *A. montevicensis* nebo *A. unguis*. Penicilia jsou obecně, v porovnání s aspergily, na kvasinky méně citlivá. I mezi jednotlivými druhy penicilií byly pozorovány rozdíly v citlivosti, např. *P. crustosum* byl méně citlivý než *P. discolor*. Inhibiční účinek kvasinek je interpretován napříč druhovým spektrem použitých aspergilů a penicilií, zahrnuje tedy interakce s nejvíce i nejméně citlivými druhy penicilií a aspergilů.

*Wickerhamomyces anomalus* (dříve *Pichia anomala*) je kvasinka, u které byl popsán inhibiční účinek vůči fungálním kontaminantům v krmivech a potravinách, vůči rostlinným patogenům i fungálním patogenům v humánní a veterinární medicíně (Tay a kol., 2019; Coda a kol. 2011). Inhibiční účinek je založen na několika mechanismech, jako jsou kompetice o živiny a prostor, tvorba biofilmů, sekrece killer toxinů, produkce extracelulárních

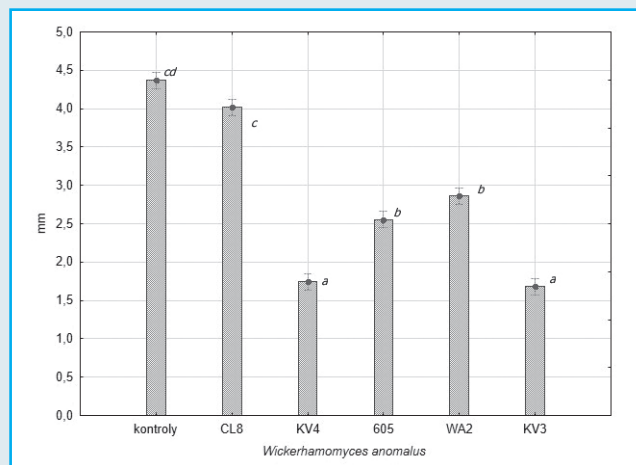
hydrolytických enzymů (Hong a kol., 2017) a dále i na produkci těkavých látek (VOCs) (Syroková a kol., 2022; Oro a kol., 2018). Antifungální účinek různých kmenů *W. anomalus* byl testován vůči peniciliím, aspergilům, fusáriím, hlízence, plísní šedé a řadě dalších houbových organismů za účelem ochrany skladovaných rostlinných produktů (např. jahody, rajčata, hrozny révy vinné) (Salas a kol., 2017), ale také s cílem prodloužit trvanlivost pečiva (Garcia a kol., 2019; Coda a kol., 2011). V našich experimentech jsme testovali pět kmenů *W. anomalus* (Tabulka 1), které byly získány převážně z kvasů a pekařských výrobků vůči 8 druhům aspergilů a 6 druhům penicilií (Tabulka 2). Inhibiční účinek na růst aspergilů byl variabilní v rámci souboru izolátů *W. anomalus* a zároveň byla i variabilní citlivost aspergilů. Obecně, *A. niger* a *A. flavus* byly vůči působení metabolitů *W. anomalus* téměř rezistentní oproti *A. unguis* a *A. montevicensis*, které vykazovaly nejvyšší senzitivitu. Vzhledem k tomu, že druh kontaminace nelze předvídat, působení kmenů *W. anomalus* bylo hodnoceno napříč celým druhovým spektrem aspergilů (Obrázek 1). Statisticky průkazná variabilita byla potvrzena jak mezi kmeny aspergilů, tak mezi kmeny *W. anomalus* (Tabulka 3). Radiální růst mycelia aspergilů (růst mycelia po obvodu terčíku) byl významně ovlivněn kmeny KV4 a KV3 získanými z domácích

**Tab. 3** Variabilita inhibičního účinku *W. anomalus* na radiální růst mycelia osmi druhů aspergilů

Faktor	Df	F	p
<i>Aspergillus</i> sp.	7	412,03	0,00E*
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	5	114,10	0,00E*
<i>Aspergillus</i> x <i>Wickerhamomyces</i>	35	32,46	0,00E*

Df – stupně volnosti, F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.) Index\* označuje statisticky významné odlišnosti při  $p \leq 0,05$ .

**Obr. 1** Inhibiční účinek *W. anomalus* na radiální růst mycelia osmi druhů aspergilů. Sloupce představují průměrné hodnoty třech opakování experimentu a s.e.m. (Faktoriální ANOVA, Statistica Soft.2.1.) Významné rozdíly v inhibičním účinku jsou označeny indexovými hodnotami (PostHoc Tukey test signifikance, Statistica Soft. v 12.1.)



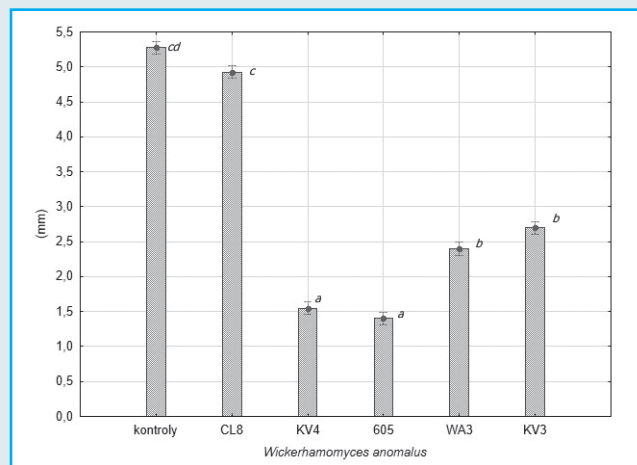
s.e.m. - střední chyba průměru

**Tab. 4** Variabilita inhibičního účinku *W. anomalus* na radiální růst mycelia pěti druhů penicilií

Faktor	Df	F	p
<i>Penicillium</i> sp.	4	25,51	0,00E*
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	5	332,04	0,00E*
<i>Penicillium</i> x <i>Wickerhamomyces</i>	20	21,54	0,00E*

Df – stupně volnosti, F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.) Index\* označuje statisticky významné odlišnosti při  $p \leq 0,05$ .

**Obr. 2** Inhibiční účinek *W. anomalus* na radiální růst mycelia pěti druhů penicilií. Sloupce představují průměrné hodnoty třech opakování experimentu a s.e.m. (Faktoriální ANOVA, Statistica Soft. 12.1.) Významné rozdíly v inhibičním účinku jsou označeny indexovými hodnotami (PostHoc Tukey test signifikance, Statistica Soft. v 12.1.)



žitných kvasů. Oproti kontrole inhibovaly tyto kmeny růst mycelia aspergilů o 59 %. Antifungální účinek *W. anomalus* VRL-76 byl testován především vůči toxigenním kmenům *A. flavus* (Hua a kol., 2014, Hua a kol., 2019) s tím, že kromě inhibice myceliárního růstu byla také potlačena tvorba mykotoxinů. V odborné literatuře je sice dostatek informací o antifungální aktivitě vůči fytopatogenním plísním s cílem posklizňové ochrany ovoce (Salas a kol., 2017), ale *W. anomalus* doposud nebyla testována na širším druhovém spektru aspergilů.

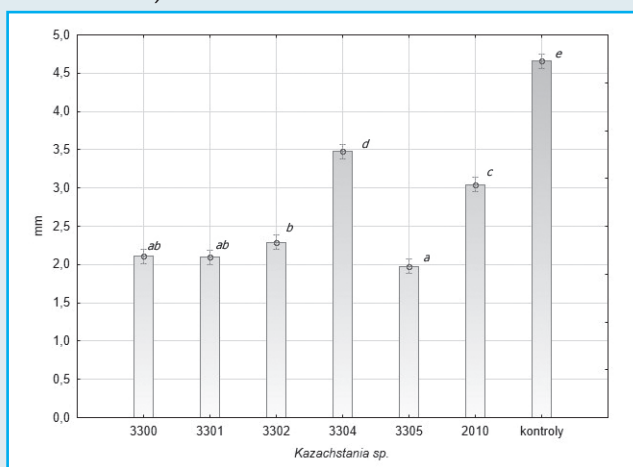
Inhibiční účinky kmenů *W. anomalus* na testovaná penicilia byly rovněž variabilní v závislosti na citlivosti druhu *Penicillium* sp. Do prezentovaných výsledků bylo zahrnuto celé jejich spektrum (Tabulka 4). Obecně nejméně citlivé vůči účinkům kmenů *W. anomalus* bylo *P. crustosum*, *carneum* a *P. chrysogenum*. Druhy *P. discolor*, *P. fimorum* a *P. glabrum* byly izoláty *W. anomalus* inhibovány. V rámci experimentů je patrné, že největší inhibiční účinek na penicilia měl izolát KV4 a kmen CCDM 605, které inhibovaly růst radiálního mycelia oproti kontrolám o 70-74 % (Obrázek 2). Antifungální účinek *W. anomalus* byl testován a uplatňován zejména u kmenů s produkcí killer toxinu (mycocin), a to na celé spektrum vláknitých hub včetně penicilií (Vieira a kol., 2022; Kowalska a kol., 2022).

**Tab. 5** Variabilita inhibičního účinku *Kazachstania* sp. na radiální růst mycelia osmi druhů aspergilů

Faktor	Df	F	p
<i>Aspergillus</i> sp.	7	195,769	0,00E*
<i>Kazachstania</i> sp.	6	110,092	0,00E*
<i>Aspergillus</i> x <i>Kazachstania</i> sp.	42	21,149	0,00E*

Df – stupně volnosti, F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.) Index\* označuje statisticky významné odlišnosti při  $p \leq 0,05$ .

**Obr. 3** Inhibiční účinek šesti kmenů/izolátů *Kazachstania* sp. na radiální růst mycelia osmi druhů aspergilů. Sloupce představují průměrné hodnoty třech opakování experimentu a s.e.m. (Faktoriální ANOVA, Statistica Soft.2.1.) Významné rozdíly v inhibičním účinku jsou označeny indexovými hodnotami (PostHoc Tukey test signifikance, Statistica Soft. v 12.1.)



Kvasinky rodu *Kazachstania* sp. představují skupinu kvasinek, jejíž zástupci byli dříve řazeni pod rod *Candida* sp. Druhy, jako *K. exiqa*, *K. humilis*, *K. unispora* a *K. barnettii* byly původně izolovány z fermentované zeleniny, kefiru a kvasů (Jaqués a kol., 2016). Jednotlivé druhy se liší fenotypickými vlastnostmi (asimilace cukrů). Uvedené druhy jsou halotolerantní a osmotolerantní. Antifungální účinky *K. unispora* z kefiru byly testovány vůči *A. niger*, *A. flavus* a čtyřem druhům penicilií (Goktas a kol., 2020). Ostatní druhy jsou popisovány v současné literatuře jako významná součást tradičních kvasů (Urien a kol., 2019). Fenotypy *K. exiqa* s killer toxinem byly úspěšně testovány vůči *P. digitatum* a *P. italicum* v rámci ochrany citrusových plodů (Florescia Perez a kol., 2016).

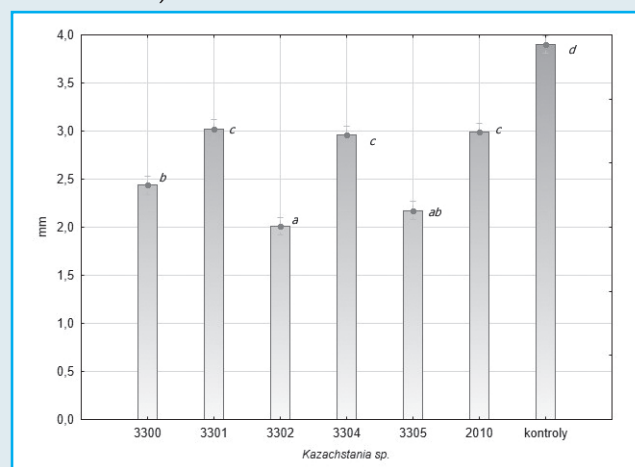
Vůči aspergilům a peniciliím jsme testovali 6 kmenů náležejících k druhům *K. unispora*, *K. barnettii*, *K. humilis* a *K. pseudohumilis* (Tabulka 2), původem z kvasů. Analýza variance potvrdila variabilitu v citlivosti aspergilů i v interakcích s kmeny *Kazachstania* sp. (Tabulka 5, Obrázek 3). Významné rozdíly byly zřejmé i v případě testování antifungálního účinku vůči *Penicillium* sp. (Tabulka 6, Obrázek 4). Aspergily byly významně inhibovány kmeny *K. pseudohumilis* 3300 (50 % oproti kontrolnímu růstu), *K. barnettii* 3301 (50 %) a *K. humilis* 3305 (57 %). Kmeny penicilií byly vůči kmenům

**Tab. 6** Variabilita inhibičního účinku *Kazachstania* sp. na radiální růst mycelia pěti druhů penicilií

Faktor	Df	F	p
<i>Penicillium</i> sp.	4	47,86	0,00E*
<i>Kazachstania</i> sp.	6	101,99	0,00E*
<i>Penicillium</i> x <i>Kazachstania</i> sp.	24	9,36	0,00E*

Df – stupně volnosti, F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.) Index\* označuje statisticky významné odlišnosti při  $p \leq 0,05$ .

**Obr. 4** Inhibiční účinek šesti kmenů/izolátů *Kazachstania* sp. na radiální růst mycelia pěti druhů penicilií. Sloupce představují průměrné hodnoty třech opakování experimentu a s.e.m. (Faktoriální ANOVA, Statistica Soft.2.1.) Významné rozdíly v inhibičním účinku jsou označeny indexovými hodnotami (PostHoc Tukey test signifikance, Statistica Soft. v 12.1.)



*Kazachstania* sp. méně citlivé. Významný inhibiční účinek na růst mycelia penicilií byl pozorován u kmene *K. pseudohumilis* CCDM 3302 (47 %).

*Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus* jsou homoithalické kvasinky se schopností asimilovat laktózu a inulin. Kmeny obou druhů jsou využívány nejen v mlékařských výrobcích, ale *K. marxianus* také v ostatních odvětvích, zvláště pro schopnost tolerovat vyšší teploty, krátký generační čas a intenzivní sekretolytickou aktivitu (Lane a kol., 2010). Kmeny, které produkují mycocin (killer toxin), inhibovaly výskyt mikrobiálních patogenů a kvasinek (Golubev a kol., 2013). *K. marxianus* kmen QKM-4 byl úspěšně testován vůči toxigenním plísním rodu *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., s ohledem na produkci těkavých látek (VOCs) (Alasmar a kol., 2020). Oba druhy kvasinek byly geneticky upraveny tak, aby produkovaly protektivní látky vůči bakteriálním a fungálním patogenům s cílem potenciálního využití v posklizňové ochraně ovoce (Curto a kol., 2013). V našem experimentu jsme testovali inhibiční účinek *K. lactis* a *K. marxianus* na růst mycelia aspergilů a penicilií. Kmeny *K. lactis* KL6A a *K. marxianus* KM8A byly izolovány z kontaminovaného mlékárenského prostředí, ostatní sbírkové kmeny pocházely z mléčných výrobků. Všechny kmeny

inhibovaly významně růst jak aspergilů, tak penicilií ve srovnání s kontrolami (Tabulky 7 a 8, Obrázek 5 a 6). Inhibice aspergilů kmene *K. lactis* a *K. marxianus* dosahovala 52 % u kmene *K. lactis* KL6A a kmene *K. marxianus* CCDM 258 po 72 hodinách kultivace. Kmen *K. lactis* 1054 významně inhiboval růst penicilií (77 %).

Porovnáme-li všechny testované kmeny kvasinek z lediska inhibice růstu mycelia aspergilů a penicilií, je patrné, že nejvíce inhiboval růst mycelia druh *W. Anomallus*, a to kmeny KV4, KV3 a penicilia inhiboval také kmen CCDM 605. Inhibice dosahovaly 70-74 % oproti kontrolnímu růstu ve sledovaném období 72 h. Ostatní druhy kvasinek, *Kazachstania* sp. a *Kluyveromyces* sp. inhibovaly aspergily a penicilia méně (40-50 %), ale kmen *K. lactis* CCDM 1054 významně inhiboval růst penicilií (77 %). Tento kmen také nejvíce snižoval pH v kultivačním bujónu YPD a produkoval největší množství kyseliny mléčné jak v MEA, tak v YPD. Kmen *K. lactis* obsahující gen pro *ldh* (laktátdehydrogenasa) metabolizuje glukózu na kyselinu mléčnou (Bianchi a kol., 2001), která působí fungisticky. V kultivačním médiu YPD také kmen CCDM 1054 navyšoval obsah kyseliny sorbové ve srovnání s kontrolou (Tab. 9). V literatuře není zatím takovýto jev popisován. V MEA médiu byly hodnoty kyselin a pH (5,4)

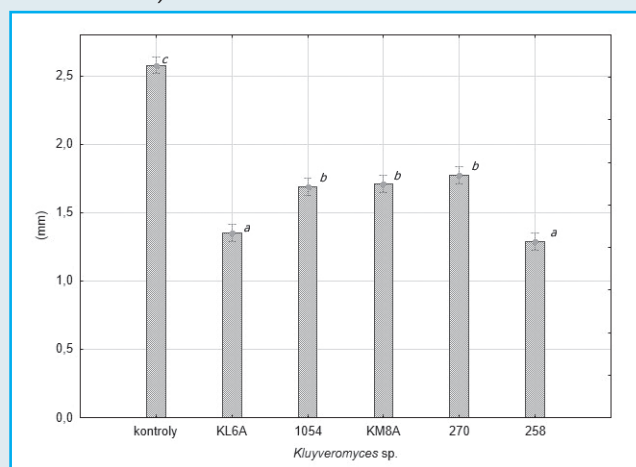
**Tab. 7** Variabilita inhibičního účinku *Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus* na radiální růst mycelia osmi druhů aspergilů

Faktor	Df	F	p
<i>Aspergillus</i> sp.	7	334,86	0,00E*
<i>Kluyveromyces</i> sp.	5	55,904	0,00E*
<i>Aspergillus</i> x <i>Kluyveromyces</i> sp.	35	16,102	0,00E*

F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.)

Index\* označuje statisticky významné odlišnosti při  $p \leq 0,05$ .

**Obr. 5** Inhibiční účinek pěti kmenů/izolátů *Kluyveromyces* sp. na radiální růst mycelia osmi druhů aspergilů. Sloupce představují průměrné hodnoty třech opakování experimentu a s.e.m. (Faktoriální ANOVA, Statistica Soft.2.1.) Významné rozdíly v inhibičním účinku jsou označeny indexovými hodnotami (PostHoc Tukey test signifikance, Statistica Soft. v 12.1.)



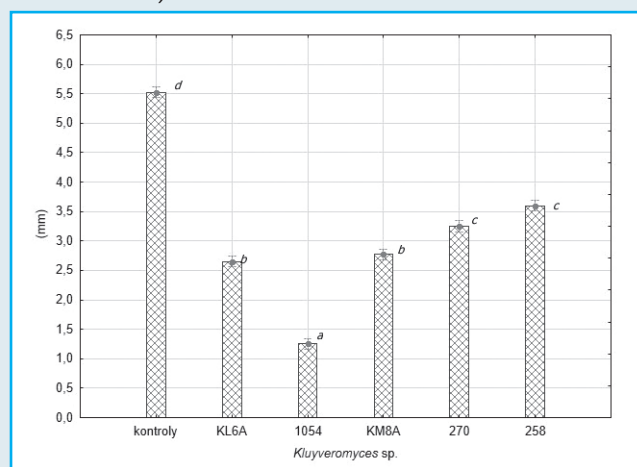
**Tab. 8** Variabilita inhibičního účinku *Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus* na radiální růst mycelia pěti druhů penicilií

Faktor	Df	F	p
<i>Penicillium</i> sp.	4	35,26	0,00E*
<i>Kluyveromyces</i> sp.	5	237,03	0,00E*
<i>Penicillium</i> x <i>Kluyveromyces</i> sp.	20	24,88	0,00E*

F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.)

Index\* označuje statisticky významné odlišnosti při  $p \leq 0,05$ .

**Obr. 6** Inhibiční účinek pěti kmenů/izolátů *Kluyveromyces* sp. na radiální růst mycelia pěti druhů penicilií. Sloupce představují průměrné hodnoty třech opakování experimentu a s.e.m. (Faktoriální ANOVA, Statistica Soft.2.1.) Významné rozdíly v inhibičním účinku jsou označeny indexovými hodnotami (PostHoc Tukey test signifikance, Statistica Soft. v 12.1.)



nižší než u YPD (6,5) a také YPD je pro kvasinky nutričně bohatší (Tabulka 9). Kyselina sorbová je používána jako konzervant s fungistatickým účinkem. V rozdílném množství je ale také zastoupená v základní receptuře syntetických médií YPD a MEA (Tabulka 9). Profil extracelulárních proteinů a peptidů ukázal, že kmeny *K. pseudohumilis* CCDM 3302 a *K. humilis* CCDM 3305, které inhibovaly aspergily a penicilia, produkovaly nejen peptidy, ale i proteiny ve spektru 25-50 kDa, které mohou odpovídat například chitinázám (Thery a kol., 2019). Obdobný profil se také ukázal u kmene *K. lactis* CCDM 1054.

## Závěr

Všechny testované kmeny a izoláty rodu *Wickerhamomyces* sp., *Kazachstania* sp. a *Kluyveromyces* sp. významně potlačovaly růst mycelia u aspergilů a penicilií oproti kontrolním variantám. Nižší hodnoty celkové inhibice jsou důsledkem interakcí *A. flavus* a *A. niger*, které nereagovaly na přítomnost kvasinek tak citlivě, jako ostatní testované druhy aspergilů. Také druhy penicilií se vzájemně lišily v reakci na přítomnost kvasinek. Kmeny *K. humilis* CCDM 3305 a *K. pseudohumilis* CCDM 3302 a *K. lactis* CCDM 1054, které inhibovaly aspergily a penicilia nejvíce, produkovaly do kultivačního média vyšší množství kyseliny mléčné a sorbové. Také spektrum extracelulárních proteinů a peptidů bylo odlišné než u ostatních kmenů. Vybrané kmeny (CCDM 3305, CCDM 3302, CCDM 1054) s antifungálním účinkem představují možné protektivní agens do kvasů či jiných potravin, i když je nutné ještě další testování s ohledem na podmínky prostředí a matrice, ve kterých by kvasinky či jejich metabolické produkty byly použity.

## Poděkování

Príspevek vznikl za podpory projektu MZe ČR Země QK1910036 a QK1910024 a Mze -RO1422.

## Literatura

- ALASMAR, R., UL-HASSAN, R., ZEIDAN, R., AL-THANI, R., AL-SHAMARY, N., ALNAIMI, H., MIGHELI, Q., JAOU, S. (2020): Isolation of a Novel *Kluyveromyces marxianus* Strain QKM 4 and Evidence of Its Volatile Production and Binding Potentialities in the Biocontrol of Toxicogenic Fungi and Their Mycotoxins. *ACS Omega*, 5, s.17637–17645.
- CARBONETTO, B., NIDELET, T., GUEZENEC, S., PEREZ, M., SEGOND, D. (2020): Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms*, 2020, 8 (2), s.1–20.
- CODA, R., CASSONE, A., RIZZELLO, C.G., NIONELLI, L., CARDINALI, G., GOBETTI, M. (2011) Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiol.* 33, s. 243–251.

**Tab. 9** Naměřené hodnoty vybraných organických kyselin s potenciálním konzervačním účinkem a pH u kultur kvasinek po 24 h kultivaci ve dvou kultivačních médiích

Organické kyseliny		ITP mg.100 mL <sup>-1</sup>				CE ppm		pH	
		mléčná		octová		sorbová			
Kultivační medium		YPD	ME	YPD	ME	YPD	ME	YPD	ME
Druh kvasinky	Kmen								
<i>W. anomalus</i>	CL8	71,8	40,2	34,9	14,4	17,2	74,3	5,28	4,96
	KV4	30,4	8,5	36,5	13,7	8,6	72,5	5,38	4,82
	WA2	68,3	45,9	34,9	8,3	36,5	71,2	5,14	4,49
	CCDM 605	28,5	8,6	30,3	12,6	25,5	70,3	5,72	4,88
	KV3	30,7	8,7	29,0	9,3	21,2	72,2	5,28	5,00
<i>K. pseudohumilis</i>	3300	30,2	8,5	34,4	12,4	15,6	72,2	5,34	4,87
	3302	30,8	11,1	30,2	21,3	23,4	72,4	5,83	4,83
<i>K. humilis</i>	3305	30,6	11,3	33,9	17,7	16,3	70,5	5,37	4,68
<i>K. barnettii</i>	3301	31,9	8,7	34,8	18,4	16,4	72,2	4,37	4,6
<i>K. unisporea</i>	3304	82,3	7,3	32,5	10,8	18,2	69,6	4,67	4,41
	CCDM 2010	32,1	9,3	34,3	11,6	20,5	75,3	5,34	4,90
<i>K. lactis</i>	KL6A	31,9	10,6	32,4	15,2	7,0	71,6	5,36	4,86
	CCDM 1054	66,5	62,8	28,6	15,4	21,9	68,7	4,42	4,99
<i>K. marxianus</i>	KM8A	26,7	45,9	30,1	8,3	12,5	71,2	5,47	4,71
	CCDM 258	28,5	8,5	31,5	15,6	17,5	73,2	5,28	4,82
	CCDM 270	27,6	8,7	35	15,6	15,7	73,2	5,51	4,85

ITP – hodnoty měřené izotachoforeticky, CE – hodnoty měřené kapilární elektroforézou, YPD (kvasničný extrakt, pepton, dextrosa) a ME (malt extrakt) – růstová média pro kvasinky

- CURTO, P., LUFRANO, D., PINTO, C., CUSTÓDIO, V., GOMES, A.C., TREJO, S.A., BAKÁS, L., VAIRO-CAVALLI, S., FARO, C., SIMÕES I. (2014): Establishing the Yeast *Kluyveromyces lactis* as an Expression Host for Production of the Saposin-Like Domain of the Aspartic Protease Cirsin. *Applied and environmental biology*. 80, s.86–96.
- DEMIRBAŞ, F., ŞİRLI, H., KURNAZ, A.A., YILMAZ, M.T., DERTLI, E. (2017): Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs, *LWT – Food Science and Technology*, 79, s.361–366.
- DE SOUZA, M.L., PASSAMANIZ, F.R.F., DA SILVA ÁVILA, C.L., BATISTAZ, L.R., SCHWAN, R.R., TERREIRA SILVA, C. (2017): Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. *Acta scientiarum*, 39(3) s.349–358.
- FREIMOSER, F.M., RUEDA-MEJIA, M.P., TILOCCA, B., MIGHELI, Q. (2019): Biocontrol yeast: mechanism and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35:154 s.1–19.
- GARCIA, M.V., COPETTI, M.V. (2019): Alternative methods for mould spoilage control in bread and bakery products. *International food Research Journal*, 26 (3) s. 737–749.
- GARNIER, L., VALENCE F., MOUNIER, J. (2017): Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms*, 5, 42, s. 1–33.
- GOKTAS, H., DERTLI, E., SAGDIC, O. (2020): Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplements. *LWT – food science and technology*, 136, s.1–9.
- GOLUBEV W.I. (2013): A *Kluyveromyces lactis* mycocin active at neutral pH. *Microbiology*, 82(3) s. 295–299.
- HAIDER, S.R., REID, H., SHARP, B.L. (2012): Tricine-SDS-PAGE. *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 869, s. 86–91.
- HONG, S-H., SONG, Y-S., SEO, D-J., KIM, K-Y., JUNG, W-Y. (2017): Antifungal activity and expression patterns of extracellular chitinase and b-1,3-glucanase in *Wickerhamomyces anomalus* EG2 treated with chitin and glucan. *Microbial pathogenesis*, 110, s.159–164.
- HUA, S.S.T., SARREAL, S.B.L., CHANG, P-K., YU, J. (2019): Transcriptional Regulation of Aflatoxin Biosynthesis and Conidiation in *Aspergillus flavus* by *Wickerhamomyces anomalus* WRL-076 for Reduction of Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 81, s.18–22.

- HUA, S.S.T., BECK, J.J., SARREAL, S.B.L., GEE, W. (2014) The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, s. 1–9.
- JACQUES, N., SARILAR, V., URIEN, C., LOPES, M. R., MORAIS, C. G., UETA-NABARO, A. P. T., (2016): Three novel ascomycetous yeast species of the Kazachstaniacalade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 66, s. 5192–5200.
- LEPŠ, J. A ŠMILAUER, P. (2016): Biostatistika. Nakladatelství Jihočeské university. s.414.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J.; DRÁB, V., BÁR, L. (2021): Differentiation of *Penicillium roqueforti* from Closely Related Species Contaminating, Cheeses and Dairy Environment. *Fermentation* 7, s.1–16.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J., DRÁB, V.; BAZALOVÁ, O., DLOUHÁ, Z. (2022): The Interactions among Isolates of *Lactiplantibacillus plantarum* and Dairy Yeast Contaminants: Towards Biocontrol Applications. *Fermentation*, 8, s.1–14.
- KOWALSKA, J., KRZYMIŃSKA, J., TYBURSKI, J. (2022): Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement-A Short Review. *Agriculture*, 12, s. 1–15.
- 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.
- LANE, M.M., MORRISSEY J.P. (2010): *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal biology reviews*, 24, s. 17–26.
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J.C; ANDERSEN, B. (2010): *Food and Indoor Fungi*; CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, 390 s. ISBN 978-90-70351-82-3.
- MATEVOSYAN, L., BAZUKYAN, I., TRCHOUNIAN, A. (2020): Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC microbiology*, 102 (19) s.1–8.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie (2011): Úřední věstník Evropské unie, L295/1.
- ORO, L., FELIZIANI, E., CIANI, M., ROMANAZZI, G., COMITINI, F. (2018): Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 265, s. 18–22.
- PEREZ, M.F., CONTRERAS, L., GARNICA, N.M., FERNANDEZ-ZENOFF, M.V., FAROAS, M.E., SEPULVEDA, M. (2016): Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. *PLoS ONE* 11(10): e0165590.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, s. 6241–6246.
- STIELOW J. B., LÉVESQUE C. A., SEIFERT K. A., MEYER W., IRINY L., SMITS D., RENFURM R., VERKLEY G. J., GROENEWALD M., CHADULI D., LOMASCOLO A., WELTI S., LESAGE-MEESSEN L., FAVEL A., AL-HATMI A. M., DAMM U., YILMAZ N., HOUBRAKEN J., LOMBARD L., QUAEDVLIEG W., BINDER M., VAAS L. A., VU D., YURKOV A., BEGEROW D., ROEHL O., GUERREIRO M., FONSECA A., SAMERPITAK K., VAN DIEPENINGEN A. D., DOLATABADI S., MORENO L. F., CASAREGOLA S., MALLETT S., JACQUES N., ROSCINI L., EGIDI E., BIZET C., GARCIA-HERMOSO D., MARTÍN M. P., DENG S., GROENEWALD J. Z., BOEKHOUT T., DE BEER Z. W., BARNES I., DUONG T. A., WINGFIELD M. J., DE HOOG G. S., CROUS P. W., LEWIS C. T., HAMBLETON S., MOUSSA T. A., AL-ZAHRANI H. S., ALMAGHRABI O. A., LOUIS-SEIZE G., ASSABGUI R., MCCORMICK W., OMER G., DUKIK K., CARDINALI G., EBERHARDT U., DE VRIES M., ROBERT V. (2015): One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, 35, 242–263.
- SALAS, M.L., MOURNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A. A COTON, E. (2017): Antifungal microbial agents for food biopreservation – a review. *Microorganisms*, 37 (5), s. 1–29.
- SYROKOU, M.K., PARAMITHIOTIS, S., KANAKIS, C.D., PAPADOPOULOS, G.K., TARANTILIS, P.A., SKANDAMIS, P.N., BOSNEA, L., MATARAGAS, M., DROSINOS, E.H. (2022): Effect of Dough-Related Parameters on the Antimold Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Strains and Mold-Free Shelf Life of Bread. *Applied Science*, 12, s.1–12.
- TAY, S-T., LIM, S-L., TAN H-W. (2014): Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 439 (14), s.1–11.
- UDOVICKI, B., AUDENAERT, K., DE SAEGER, S., AND RAJKOVIC, A. (2018): Overview on the Mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004-2016. *Toxins*, 10, s. 279.
- URIEN, C., LEGRAND, J., MONTALENT, P., CASAREGOLA, S. A. SICARD, D. (2019): Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour. *Frontiers in Microbiology*, 201, s. 1–17.
- VIEIRA, J. (2022): Susceptibility of airborne fungi to the mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian Journal of Health Review*, 5, s.19824–19829.
- WANG, Y., WU, J, L.V. M., SHAO, Z., HUNGWE, M., WANG, J., BAI, X., XIE, J., WANG, Y., GENG, W. (2021): Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications, Food Industry. *Frontiers in Bioengineering. Biotechnology*, 9 s.1–19.

**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 dne: 7. 11. 2022  
Lektorováno: 27. 11. 2022

## MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY ZALOŽENÉ NA PCR VYUŽITELNÉ PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI MIKROORGA- NISMŮ V MLÉKÁRENSTVÍ

Jaromír Cihlář, Olga Bazalová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Tábor

PCR-based molecular-genetic methods  
suitable for the detection and identification  
of microorganisms in the dairy industry

### Abstrakt

Identifikace, klasifikace a detekce mikrobiálních organismů je nedílnou součástí úkonů prováděných ve sbírkách, i při výzkumu v potravinářské mikrobiologii. Rychlá detekce a identifikace nežádoucích mikroorganismů, nebo kontrola čistoty používaných mikrobiálních kultur, je zásadní pro udržení kvality a bezpečnosti potravin. Tradiční metody v potravinářské mikrobiologii jsou závislé na kultivaci studovaných