

- SÁNCHEZ, A., SIERRA, D., LUENGO, C., CORRALES, J. C., MORALES, C. T., CONTRERAS, A., GONZALO, C. (2005): Influence of Storage and Preservation on Fossomatic Cell Count and Composition of Goat Milk. *Journal of Dairy Science*, 88, s. 3095–3100.
- SJAUNJA, L. O. (1984 a): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. II. Factors affecting milk analyses by infrared technique under laboratory conditions. *Acta Agriculture Scandinavica*, 34, s. 260–272.
- SJAUNJA, L. O. (1984 b): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agriculture Scandinavica*, 34, s. 273–285.
- SJAUNJA, L. O., PHILIPSSON, J., LUNDSTRÖM, K., SWENSSON, CH. (1984): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. IV. Factors affecting milk analyses in a routine system by automated apparatuses. *Acta Agriculture Scandinavica*, 34, s. 286–299.
- SLÁDEK, M.: VÝSLEDKY KVALITY NAKUPOVANÉHO MLÉKA V ROCE 2021 podle analýz bazénových vzorků. ČMSCH a.s., LRM Brno-Tuřany, Hradištko, 2022.
- SZIJARTO, L. F., HARDING, F., HILL, A. R., MELICHERCIK, J. (1990): Cooling systems for transport of unpreserved milk samples. *Journal of Dairy Science*, 73, s. 2299–2308.
- ZAJÁC, P., ČAPLA, J., VIETORIS, V., ZUBRICKÁ, S., ČURLEJ, J. (2015): Effect of storage on the major constituents of raw milk. *Potravinárstvo*, 9 (1), s. 375–381.
- ZAJÁC, P., ZUBRICKÁ, S., ČAPLA, J., ZELENÁKOVÁ, L., ŽIDEK, R., ČURLEJ, J. (2016): Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, 61, s. 239–244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.008>

**Korespondující autor:** prof. Ing. Oto Hanuš, PhD.  
Výzkumný stav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, e-mail: hanus.oto@seznam.cz

Přijato dne: 2. 2. 2023  
Lektorováno: 26. 3. 2023

## Izolace a identifikace divokých izolátů bakterií mléčného kvašení z luskovin a hodnocení jejich funkčních vlastností *in vitro* s ohledem na využití v biologické ochraně luskovin

Miloslava Kavková<sup>1</sup>, Olga Bazalová<sup>1</sup>, Jaromír Cihlář<sup>1</sup>,  
Andrea Bohatá<sup>2</sup>, Jana Lencová<sup>2</sup>, Petr Konvalina<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Fakulta zemědělská a technologická, Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích

### Isolation and identification of lactic acid bacteria from legumes and screening of its functional properties *in vitro* concerning the application in biological control of legumes

#### Abstrakt

Bakterie mléčného kvašení jsou významnou skupinou mikroorganismů, která, v rámci ochrany rostlin, posky-

tuje rostlinám řadu benefitů včetně posilování rezistentních mechanismů rostlin a přímého protektivního účinku vůči bakteriálním a fungálním patogenům. Protektivní účinek není samozřejmou vlastností druhu či izolátů bakterií mléčného kvašení, ale je podmíněn geny, expremací jejich produktů do substrátu, stabilitou metabolitů a spektrem jejich účinku. Screening izolátů laktobacilů izolovaných z nadzemních a kořenových částí luskovin ukázal na významně nižší produkci kyseliny mléčné a octové oproti vybraným kmenům ze siláží s verifikovaným antifungálním účinkem. Genetická analýza potvrdila u všech izolátů zastoupení genů kódující bakteriociny Třídě 2a a chitinázu. Přítomnost proteinu s chitinolytickou aktivitou (LACO chitin binding protein) o velikosti 22,19 kDa *in vitro* byla potvrzená u bezbuněčného supernatantu z většiny izolátů, pouze u třech izolátů nebyl protein detekován (A, C a G). Antifungální testy ukázaly, že frakce bezbuněčného supernatantu o velikosti 2–30 kDa má významný inhibiční účinek na růst mycelia pěti druhů fusárií, a to zejména z izolátů *L. plantarum* (B, J) a *L. pentosus* (G, H).

**Klíčová slova:** antifungální aktivita, charakterizace izolátů, *Fusarium* spp., laktobacili

#### Abstract

Lactic acid bacteria represent fermentative microorganisms that, under the application in plant protection, provide many benefits to plants, including induction and reinforcement of protective mechanisms and direct protection against bacterial and fungal pathogens. The protective effect of LAB is a complex of strain-specific traits conditioned by genes and its expression in a substrate, the stability of metabolites and the spectrum of its impact. The screening of strains of lactobacilli from the upper part and roots of legumes showed that the production of lactic and acetic acid was significantly lower compared with strains from silages with verified antifungal activity. Genetic analysis confirmed the presence of genes coding bacteriocins Class 2a and chitinases in all isolates from legumes. The protein (LACO chitin binding protein) 22,19 kDa with chitinolytic activity was detected in cell-free supernatants except for A, C and G isolates. The antifungal tests showed that a fraction of size 2–30 kDa of cell-free supernatants inhibited the mycelia growth of five *Fusarium* species significantly, especially those obtained from isolates *L. plantarum* (B, J) and *L. pentosus* (G, H).

**Keywords:** antifungal activity, characterisation of isolates, lactobacilli, *Fusarium* sp.

#### Úvod

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou známé především jako probiotika, mlékařské a pekařské kultury využívané v potravinářském a krmivářském průmyslu a ve farmacii, humánní a veterinární medicíně. Využití BMK

závisí na funkčních vlastnostech konkrétního kmene (případně kombinaci kmenů) BMK. Tyto vlastnosti jsou řízeny geny, jejichž exprese do metabolicky funkčních produktů je podmíněna řadou faktorů, které nejsou zcela známé (Scano a kol., 2021; Palla a kol., 2020). Z hlediska praktického využití BMK v ochraně rostlin vůči bakteriálním a fungálním patogenům rostlin, je významnou vlastností BMK antimikrobiální a antifungální aktivita. Za funkční metabolity s antimikrobiální a antifungální aktivitou jsou, na základě řady vědeckých studií, považovány zejména krátkořetězcové organické kyseliny a jejich fenylované formy, diacetyl acetoín, enzymy, proteiny a peptidy a produkce kyseliny indolactové (IAA) (Garcia-Cano a kol., 2019; Salas a kol., 2018; George a kol., 2018). Významným zdrojem BMK jsou, kromě mléka a mléčných výrobků, také tradiční fermentované substráty, ať už se jedná o potraviny rostlinného původu, jako je kvašené zelí, kimči, kvasy a kvásky, nebo siláže či senáže. Druhy BMK ale také přirozeně osidlují půdní prostředí, vyskytují se v kompostech, v silážích a jako součást fytoplánu a rhizoplánu rostlin (Fhoula a kol., 2013) i když v nižších počtech ( $1 \times 10^2$ - $10^6$  KTJ.  $1 \text{ g}^{-1}$ ) v porovnání s ostatními půdními mikroorganismy (Strafella a kol., 2021).

Současné výzkumy potvrzují, že pokud kmeny BMK pocházejí z konkurenčně bohatšího prostředí, je více pravděpodobné, že budou vykazovat antifungální a antimikrobiální účinky (Yu a kol., 2021). BMK se řadí mezi bakterie podporující růst a rezistentní mechanismy rostlin (PGPM) (Lamont a kol., 2017). Zpřístupňují a zlepšují rostlinám příjem živin, působí jako ochranná agens v rámci biologické ochrany, indukují obranné reakce rostlin na abiotický a biotický stres a také produkují látky, které stimulují růst rostlin (fytohormony) (Jaffar a kol., 2023). Využití BMK a jejich bioaktivních produktů v biologické ochraně rostlin v tritrofitickém systému rostlina-patogen-BMK je zmapováno zejména vůči bakteriálním patogenům (Daranas Boadella a kol., 2018); fungálním rostlinným patogenům (López-Seijas et al., 2020) i k posklizňové ochraně ovoce a zeleniny (Linarez-Morales a kol., 2018). Hlavní limity pro využití BMK jako živých funkčních buněk v biologické ochraně rostlin představuje především kmenová specifita a nízká konkurenční schopnost BMK v prostředí rostlin a půdy. Možností je využít v ochraně rostlin pouze samotné bioaktivní produkty BMK zpravidla ve formě bioaktivních fermentů (Bettiol a kol., 2008; Crisp a kol., 2006). Pro využití samotných metabolitů BMK ve fermentech je také klíčový výběr vhodného kmene, ale také nosného substrátu tak, aby nedocházelo k přílišné acidifikaci a neobsahoval zbytkové cukry. Fermenty by měly vykazovat funkční stabilitu a neměly by být zdrojem živiny pro nežádoucí mikroorganismy a vláknité houby. Antifungální efekt BMK vůči bakteriálním a fungálním patogenům luskovin byl testován na úrovni *in vitro* testů, skleníkových a polních pokusů na řadě leguminóz, jako např. podzemnice olejná, hrách, sója (Daranas Boadella a kol.,

2018; Świeca a kol., 2018). BMK jsou rovněž schopné detoxifikovat mykotoxiny, jenž fungální patogeni do rostlin produkují (Sadiq a kol., 2019; Perczak a kol., 2018). Aplikace BMK do luskovin poskytuje ochranu před patogenními mikroorganismy, ale také stimuluje klíčivost, příjem živin a růst rostlin (Limanska a kol., 2015; Świeca a kol., 2018). V naší studii jsme se zaměřili na charakterizaci izolátů BMK, konkrétně izolátů laktobacilů získaných z nadzemní i kořenové části leguminóz (hrách, sója, lupina). Charakterizace zahrnovala mapování genů kódující bakteriociny a chitinázy a jejich expresi *in vitro* v živném médiu pomocí proteomických metod. Bezbuňkové supernatanty laktobacilů izolovaných z luskovin byly testovány na antifungální aktivitu vůči pěti druhům fusárií, izolovaných ze stejných lokalit a porostů jako laktobacily.

## Materiál a metody

### Izolace a identifikace laktobacilů

Rostliny hrachu, lupiny a sóji v různých fázích vývoje byly celé odebírány z pokusných pozemků ZTF JU v Českých Budějovicích a ČZU v Praze. Mikrobiologické rozborů půdy a rostlin byly prováděny s cílem získat divoké izoláty BMK rostlinného původu a získat informace o četnosti jejich přirozeného výskytu na luskovinách. V tloučku byly homogenizovány zvláště kořeny, listy a stonky a 1 g homogenizovaných rostlinných pletiv byl naředěn ve fyziologickém roztoku a kultivován na MRS (MilliporeSigma, Německo) s vankomycinem (Getham Life Sciences, UK) (na 100 ml půdy bylo použito 0,5 ml sterilního zásobního roztoku o koncentraci 10 mg/ml). Kultivace probíhaly v 30 °C po dobu 5 dní. Morfologie buněk z kolonií byly hodnoceny mikroskopicky (Gramovo barvení). Z vybraných kolonií BMK byla izolována DNA. Zastoupené BMK ve fytoplánu bylo vyhodnoceno kvantitativně, jako počet KTJ.  $\text{g}^{-1}$  homogenizované hmoty. Jednotlivé kolonie vyizolovaných mikroorganismů byly mikroskopovány (Olympus BX 43, Japonsko) a zařazeny dle mikromorfologie buněk. Počet kolonie tvořících jednotek (KTJ) byl odečítán po 5 dnech. Počty BMK byly logaritmovány. Vzhledem k nestejnému počtu vzorků z hrachu, lupiny a sóji byly počty mikrobiálních jednotek náležející k BMK porovnávány neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem (Statistika Software, v.12.1.), a to jako koncentrace BMK na třech druzích rostlin, a porovnáván byl také rozdíl mezi nadzemní a kořenovou částí rostlin.

Následně byly sterilně odebrány reprezentativní kolonie mikroorganismů k analýze DNA (Kavková a kol., 2022a). Bakteriální DNA byla izolována pomocí DNeasy UltraClean Microbial Kit (Quiagen) dle instrukcí v manuálu. Gen pro 16S SSU ribozomální RNA byl amplifikován primery fD1 (5'-ccg aat tgc tgc aca aCA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') a rP2 (5'-ccc ggg atc caa gct tAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg a kol. 1991). PCR byla prováděna v 25  $\mu\text{L}$  reakčních

objemech [0.5 µL každého z pramerů (10 µM), 1 µL templátové DNA, 12.5 µL 2× PPP Taq MasterMix (TopBio), and 10.5 µL of ddH<sub>2</sub>O)]. Podmínky amplifikace byly následující: 95 °C/2 min; 35 cyklů (95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/60 s); 72 °C/8 min. PCR produkty byly separovány na barveném (GelRed®, Biotium, Fremont, QC, Canada) gelu 2% SeaKem agarosovém gelu (SeaKem®LE; Lonza, Rockland, ME, USA) po dobu 120 minut při 60V. Vizualizace PCR produktů byla provedena s použitím Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Frederick, MD, USA).

Před odesláním na sekvenaci byly PCR produkty ošetřeny 2 µL ExoSAP-IT™ podle instrukcí výrobce (ThermoFisher Scientific, Baltic UAB, Vilnius). Produkty byly sekvenovány u Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany) pomocí fD1 sekvenačního primeru. Identifikace studovaných bakterií byla provedena na základě homologií získaných sekvencí genu pro 16S SSU ribozomální RNA se sekvencemi uloženými v databázi NCBI pomocí BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

U izolátů *L. plantarum* byly hodnoceny funkční vlastnosti, jako je acidifikace substrátu, produkce kyseliny mléčné a octové, přítomnost genů zodpovědných za produkci bakteriocinů Třidy 2a a chitináz a dále exprese těchto genů v substrátu *in vitro* pomocí proteomických metod.

## Charakterizace laktobacilů

### Měření pH a produkce organických krátkořetězcových kyselin

Hodnoty pH byly stanoveny u bezbuněčných supernatantů získaných po 24 h kultivaci laktobacilů vyzolovaných z rostlin luskovin (Tabulka 3) v MRS+FGGM při 30 °C pomocí pH metru InoLab pH 720 a elektrody SenTix Sp (WTW, Německo).

### Bakteriociny

Přítomnost genů pro bakteriociny třídy 2a a chitinázu (ChiA) byla ověřena amplifikací pomocí pramerů uve-

dených v tabulce 1 (Kavková a kol., 2022a). PCR byla prováděna v 25 µL reakčních objemech [0.5 µL každého z pramerů (10 µM), 1 µL templátové DNA, 12.5 µL of 2× PPP Taq MasterMix (TopBio) a 10.5 µL ddH<sub>2</sub>O)]. Podmínky reakce byly nastaveny následovně: pre-denaturace při 95 °C 2 min, dále 35 cyklů po 95 °C 30 s, nasedání primerů 30 s při 44 °C (bakteriociny) / 46 °C (chitináza), extenze 72 °C 60 s. Závěrečná extenze 72 °C 8 min. PCR produkty byly separovány na 2 % SeaKem® LE agarosovém gelu (Lonza, Rockland, ME, USA) obarveném pomocí GelRed® (Biotium) při 70 V for 120 min. Výsledky byly vizualizovány pomocí GENE GENIUS Bio Imaging System (SYNGENE, USA).

### Detekce funkčních proteinů a peptidů

Extracelulární proteiny a peptidy byly izolovány z bezbuněčných supernatantů pomocí ultrafiltračních kolonek AMICON 30 MWO (Sigma Aldrich, USA) (Kavková a kol., 2022a). Profil extracelulárních peptidů a proteinů byl detekován podle Haider a kol., 2011 metodou Tricine-SDS-PAGE na 15 % a 12 % polyakrylamidovém gelu. Charakterizace produktů z bezbuněčných supernatantů probíhala na TimsTOFPro (Sandow a kol., 2019) (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) a Ultra-High-Performance Liquid Chromatography UltiMate 3000 nano UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s následným vyhodnocením v databázích.

### Antifungální testy

Významným patogenem s produkcí mykotoxinů jsou fusária. Infikují a decimují porosty luskovin zejména ve fázi klíčících rostlin a mladé porosty. Z půd a zrna luskovin bylo izolováno a pomocí molekulárních (Kavková a kol., 2022b) a morfologických metod (Samson a kol., 2011) identifikováno osm druhů fusárií. Pro účely testování antifungální aktivity bylo použito pět druhů uvedených v tabulce 2. Interakce mezi laktobacily a fusárií byly testovány modifikovanou metodou podle Demirba a kol., 2017 (Kavková a kol., 2022c). Za účelem testování byly izoláty fusárií kultivovány metodou přelivu vytemperovaným bramborovým agarem (PDA, Himedia, Indie), a to tak, že 1ml inokulum ve formě kapky obsahovalo 1.105 konidií ve fyziologickém roztoku. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány při 25 °C, 5 dní. Laktobacily byly kultivovány 24 h v MRS bujónu s FGGM (kvasničný extrakt, pepton, dextrosa) bujónu (Himedia, Indie), v 50 ml sterilních falkonách. Po kultivaci byly falkony s nakultivovanou kulturou centrifugovány při 13,600 ot/min po dobu 10 minut a přes mikrobiální stříkačkový filtr (0,22µl) (Filtratech, Francie) byl získán bezbuněčný superna-

**Tab. 1** Použité primery pro amplifikaci bakteriocinů třídy 2a a chitinázy

Použité primery:				
Forward	Reverse	Sekvence (5' to 3')	Očekávaná velikost produktu (bp)	Amplifikovaná oblast
BCgr1NSf	BCgr1R1K	GGT GGT AAA TAC TAT GGT AA	62	Bakteriocin Ila, Klast 1
		CC CCA GTT AAC AGA GCA		
BCgr2NSf	BCgr1R2K	ATG AAA AAG AAA KTA KTW AA	123	Bakteriocin Ila, Klast 2
		TT ACA ATA MAS ACC ATT TCC		
BCgr4NSf1K BCgr4NSf2D	BCgr4R1K	AAA ATA TTA TGG AAA TGG AGT	88, 159	Bakteriocin Ila, Klast 4
		TTA GCA CTT CCC TGG AAT A GAC ATT CCT GCA ATA CAA		
BCgr5NSf1K BCgr5NSf2D	BCgr5R	GAT TGG GGA AAA GCT ATT	69, 131	Bakteriocin Ila, Klast 5
		GGT GGA AAA TAC TAC GGT AA TT CCA ACC AGC DGC TCC		
chiFEMSF		GAT ATC GAC TGG GAG TTC CC	400	Chitinasa

**Tab. 2** Izoláty fusárií použité v rámci antifungálního testu *in vitro*

Značení izolátu	Druh	Původ
F3	<i>Fusarium proliferatum</i>	půda
D3	<i>Fusarium oxysporum</i>	půda
H1	<i>Fusarium avenaceum</i>	hrách zrna
FC	<i>Fusarium culmorum</i>	půda
L3	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	lupina zrna

**Tab. 3** Vybrané izoláty *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* a *Lacticaseibacillus paracasei* na charakterizaci antifungálních vlastností a aktivity

Izoláty	druh	původ
A	<i>L. plantarum</i>	Nadzemní a podzemní část leguminóz
B	<i>L. plantarum</i>	
C	<i>L. plantarum</i>	
D	<i>L. plantarum</i>	
E	<i>L. plantarum</i>	
F	<i>L. paracasei</i>	
G	<i>L. pentosus</i>	
H	<i>L. pentosus</i>	
J	<i>L. plantarum</i>	
CCDM 191	<i>L. plantarum</i>	Siláže
CCDM 196	<i>L. plantarum</i>	Charakterizace kmenů Kavková a kol. 2022a.
CCDM 1110	<i>L. plantarum</i>	Neznámého původu

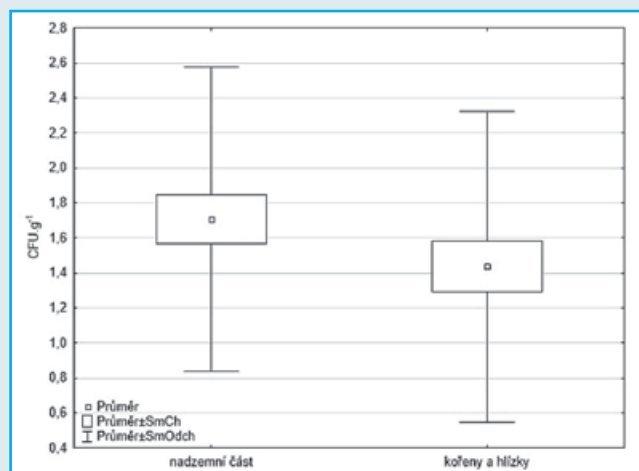
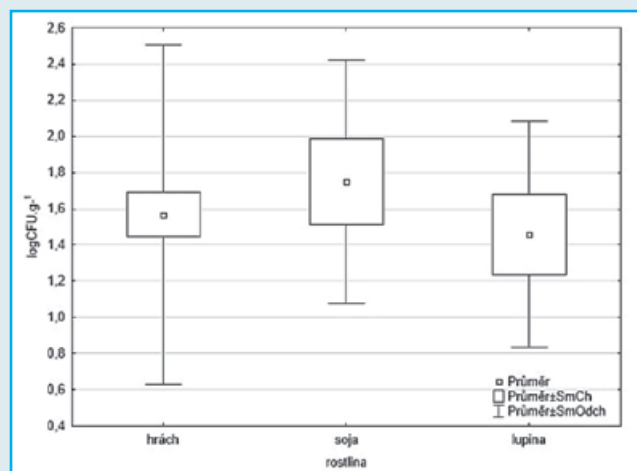
tant, který byl přes ultrafiltrační kolony AMICON 30 MWO (MERCK, USA) rozdělen na dvě frakce, filtrát s proteiny a peptidy menšími než 30 kDa a koncentrát s proteiny nad 30 kDa. Obě frakce byly použity k testování antifungálního účinku produktů laktobacilů vůči uvedeným pěti kmenům fusárií, a to tak, že každá frakce tvořila 20% podíl kultivačního média. Na každou misku s frakcí bezbuněčného supernatantu z laktobacilů byly přeneseny dva terčíky od každého jednoho druhu fusária vyříznuté korkovrtem z nakultivovaných kultur. Misky byly umístěny 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 z terčíků fusárií na čistém PDA představoval kontrolní variantu. Celé experimenty včetně kontrol byly opakovány třikrát včetně všech měření. Data byla zpracována v programu Statistica Soft. (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). Za faktory, které mají vliv na růst mycelia, byly brány jednotlivé izoláty a kmeny laktobacilů, izoláty fusárií a frakce bezbuněčného supernatantu laktobacilů vyšší a nižší než 30 kDa.

## Výsledky a diskuze

Počty BMK ( $\text{KTJ.g}^{-1}$ ) kolonizujících nadzemní části a kořeny a hlízky během růstového období byly vyhodnoceny u třech druhů luskovin, hrachu, lupiny a sóji. Maximální počty dosahovaly hodnot  $4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$  u nadzemních částí hrachu v době květu. Průměrné hodnoty koncentrace BMK dosahují do  $2 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ . I když hodnoty na obrázku 1 ukazují na vyšší počty BMK v nadzemních částech rostlin, hodnoty BMK, v porovnání s kořeny a hlízkami, nebyly statisticky významně rozdílné (Kruskall-Wallisův test,  $H_{(1,76)}=2,49$ ;  $p \leq 0,115$ ). Zastoupení BMK ve fytoplánu není významně ovlivněno ani druhem luskoviny, jak ukazuje Obr. 2 (Kruskall-Wallisův test,  $H_{(2,76)}=1,57$ ;  $p \leq 0,46$ ).

Koncentrace BMK v nadzemní a kořenové části luskovin odpovídají přirozenému výskytu BMK na rostlinách (Yu a kol., 2019). BMK jsou v přírodních ekosystémech součástí rozsáhlých mikrobiálních a fungálních komunit, kde si metabolity udržují pozici v uvedené koncentraci mezi pseudomonádami, sporetvornými bacily, klostridii a dalšími saprofyty a komenzály. Jejich podíl v bakteriálních komunitách různých rostlin se pohybuje od 0–5% (Miller a kol., 2019). Řada faktorů, jako

**Obr. 1** Rozdíl v počtech kolonií BMK v nadzemní a kořenové části luskovin. Data představují průměr a směrodatnou odchylku.**Obr. 2** Rozdíl v celkových počtech kolonií u hrachu, sóji a lupiny. Data představují průměr a směrodatnou odchylku.

**Tab. 4** Izoláty BMK získané z nadzemní a kořenové části luskovin (hrách, sója) na MRS s vankomycinem

Druh BMK	Počet izolátů	Část rostliny	Ostatní mikroorganismy	Houbové organismy
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	6	hlízky, kořen, list	<i>Clostridium arbusti</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Weizmannia coagulans</i> <i>Weissella ceti</i>	<i>Apiospora arundinis</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> <i>Metschnikowia sinensis</i> <i>Mucor pseudolusitanicus</i>
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	1	hlízky a kořen		
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	2	list		
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	1	list		
<i>Lactococcus lactis</i>	5	list		
<i>Lactococcus mesenteroides</i>	2	kořen a list		
<i>Lactococcus mesenteroides</i> ssp. <i>Jonggijbikimchi</i>	2	list		
<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>	1			

**Tab. 5** pH kultivačního média, experimentálního média PDA s přidavkem frakce (2-30 kDa) s metabolity laktobacilů a produkce kyselin v kultivačním médiu pro všechny testované izoláty a kmeny laktobacilů.

	pH MRS + FGGM	pH PDA + 20 %CFS	Kyselina mléčná mg/100 ml	Kyselina octová mg/100 ml
A	4,02	4,10	1342,080 ± 1,52 <sup>c</sup>	557,94 ± 0,23 <sup>c</sup>
B	4,05	4,13	1299,510 ± 1,23 <sup>c</sup>	563,565 ± 1,12 <sup>c</sup>
C	3,92	4,06	1331,789 ± 0,85 <sup>c</sup>	554,189 ± 0,85 <sup>c</sup>
D	3,94	4,06	1296,235 ± 0,78 <sup>c</sup>	568,253 ± 0,45 <sup>c</sup>
E	3,93	4,08	849,562 ± 1,32 <sup>d</sup>	558,877 ± 0,39 <sup>c</sup>
F	4,19	4,32	1289,687 ± 1,12 <sup>c</sup>	517,792 ± 1,13 <sup>c</sup>
G	4,07	4,12	1291,242 ± 0,38 <sup>c</sup>	618,808 ± 1,52 <sup>b</sup>
H	4,06	4,12	1257,656 ± 1,78 <sup>c</sup>	578,871 ± 0,41 <sup>c</sup>
J	3,88	3,98	1238,648 ± 1,56 <sup>c</sup>	573,299 ± 1,23 <sup>c</sup>
CCDM 191	3,89	3,95	1739,2 ± 0,22 <sup>b</sup>	640,97 ± 0,52 <sup>ab</sup>
CCDM 196	3,92	4,04	1715,7 ± 0,35 <sup>b</sup>	670,90 ± 0,68 <sup>ab</sup>
CCDM 1110	3,72	3,85	2147,5 ± 0,28 <sup>a</sup>	707,92 ± 0,23 <sup>a</sup>
Statistické parametry	F <sub>(11, 320)</sub> = 38,6; p ≤ 0,23, N = 12	F <sub>(11, 320)</sub> = 56,3; p ≤ 0,15, N = 12	F <sub>(11, 320)</sub> = 521,3; p ≤ 0,00E, N = 12	F <sub>(11, 320)</sub> = 206,7; p ≤ 0,001, N = 12

fenotypická fáze rostliny, rostlinné exudáty a půdní podmínky, hraje významnou roli při kolonizaci BMK nadzemních a podzemních částí rostlin (López de Felipe a kol., 2022; Yu a kol., 2019). Patrné je to zejména na kořenech hrachu (Obr. 1). Na základě sekvenace úseku 16S DNA bylo identifikováno 8 druhů BMK (Tabulka 4).

**Tab. 6** Zastoupení genů zodpovědných za produkci bakteriocinů Třidy 2a a chitinázy u izolátů *L. plantarum* z rostlin luskovin. Detekce LACO CBP (22,19 kDa) *in vitro* ve filtrátu laktobacilů (≤30 kDa) na 12% Tricine-SDS gelu.

<i>L. plantarum</i>	Klastr 1	Klastr 2	Klastr 4-1	Klastr 4-2	Klastr 5-1	Klastr 5-2	chitináza	LACO CBP
A	+	-	-	-	+	-	+	-
B	+	-	-	-	+	-	+	+
C	+	-	+	-	+	-	++	-
D	+	-	+	-	+	-	+	+
E	+	-	+	-	+	Více produktů	+	+
F*		+						
G*		-						
H*		++						
I	+	-	+	-	+	Více produktů	++	+
J	+	-	+	-	+	Více produktů	++	++
191	+	+	+	-	+	+	++	+
196	+	+	+	-	+	+	+	+
1110	+	-	+	-		Více produktů	+	++

\*jiné druhy laktobacilů, než *L. plantarum*

Nejvíce izolátů náleželo k druhu *Lactiplantibacillus plantarum* a *Lactococcus lactis*. Izoláty *L. plantarum* byly experimentálně testovány na přítomnost genů zodpovědných za produkci bakteriocinů Třidy 2a, chitinázy a na produkci antifungálních látek *in vitro*. U těchto izolátů byla také testována antifungální aktivita *in vitro* vůči pěti druhům fusárií izolovaných z luskovin.

Produkce organických krátkořetězcových kyselin je výsledkem fermentačního procesu BMK v substrátu. Tyto kyseliny a zejména jejich fenylované formy mají prokazatelný antimikrobiální a antifungální účinek (Sadiq a kol., 2019). Produkované kyseliny regulují také pH prostředí a kultivačního či aplikačního média, ovlivňují tím také složení mikrobiálních a fungálních konsorcií na rostlině. Mezi testovanými izoláty

a kmeny laktobacilů byly významní producenti kyseliny mléčné a octové. Jednoznačně nejvyšší produkce organických kyselin byla zaznamenána u kmene 1110 a kmenů CCDM 191 a 196 ze siláží (Tabulka 5). Izoláty laktobacilů z rostlin jsou významně nižšími producenty obou měřených kyselin, i když pH hodnoty nevykazují významnou variabilitu. Je tedy možné, že disponují jinými kyselinami či formami kyselin, které jsme izotachoforézou nenaměřili.

U všech izolátů *L. plantarum*, byly přítomné geny bakteriocinů třídy 2a (Tabulka 6), i když se zastoupení genů v jednotlivých klastrech mezi izoláty lišilo. Variabilita je patrná zejména mezi klastry 4-1 a 5-1.

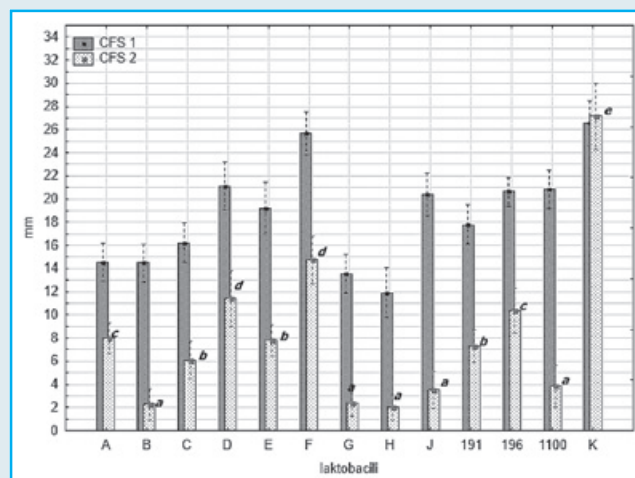
Geny zodpovědné za produkci chitinázy byly přítomné ve všech izolátech *L. plantarum*, zvlášť

silný signál byl u izolátů C a J. Expresí těchto genů byla ověřována pomocí Tricine-PAGE na 12 % polyakrylamidovém gelu (Scano a kol., 2021; Raveshot a kol., 2018). Na gelu byly zřetelné produkty v oblasti 20-25 kDa, které po izolaci na hmotnostním spektrofotometru byly potvrzeny jako LACO chitin-binding protein (CBP). V oblasti 2-5 kDa byly zřejmé peptidy, které odpovídají velikosti bakteriocinů. U izolátů ze siláží byly stejné analýzy provedeny v roce 2021 (Kavková a kol., 2022a). Analýza Tricine-SDS gelu (Tabulka 6) zachytila výskyt chitinázy i u izolátu H (*L. pentosus*), ale k expresi nedocházelo u izolátů G, C a A (*L. plantarum*) a zcela odlišné, prozatím neznámé spektrum proteinů se ukázalo u F (*L. paracasei*). Podmínky exprimace genů do jejich funkční formy (enzymy, peptidy) v nosných médiích nejsou zatím známy. Je to patrné zejména u izolátu C, kde signál při detekci genu pro chitinázu byl sice silný, ale k žádné expresi *in vitro* nedošlo a také výsledný inhibiční efekt vůči fusáriím byl nízký v porovnání s ostatními izoláty. Naopak, u izolátu J byly detekovány geny kódující chitinázu, došlo k expresi CBP a frakce filtrátu (2 – 30 kDa) významně inhibovala růst mycelia. Detekce genů zodpovědných za produkty s antifungální a antimikrobiální aktivitou u *L. pentosus* a *L. paracasei* vyžaduje jiné primery, než byly použity u druhů *L. plantarum*.

Růst mycelia fusárií *in vitro* ovlivňovaly všechny testované faktory i jejich kombinace (Tabulka 7). Testy ukázaly, že 20% podíl frakce  $\leq 30$ kDa je jednoznačně účinnější a významně inhibuje růst mycelia ve všech případech oproti koncentrátu, obsahujícímu proteiny  $\geq 30$  kDa (Tabulka 7, Obr. 3). Obecně, nejvyšší inhibiční účinek je prokazatelný u izolátů G a H náležejících k druhu *L. pentosus*, nejméně účinný byl supernatant izolátů F (*L. paracasei*). I když kmeny *L. plantarum* (191, 196) ze siláží produkují významné množství kyseliny mléčné a octové, byly u nich detekovány geny pro produkci bakteriocinů třídy 2a a exprimují chitinázy, jejich účinek byl významně nižší než u izolátů *L. pentosus* (G, H) a izolátů *L. plantarum* z luskovin (B, J). V rámci komplexu izolátů *L. plantarum* získaných z luskovin je zřejmé, že bez antifungálního testu s fusárií nelze izoláty z hlediska inhibičního účinku hodnotit, i když jsou popsány jejich profily z hlediska funkčních genů a proteinů. Antifungální aktivita je výsledkem mnoha faktorů a interakcí BMK a cíleného houbového organismu. Rozdíl v růstu mycelia u kontrolních variant a variant s 20% podílem bezbuněčného supernatantu 2-30 kDa činil u izolátu J a CCDM 1110 84 % a u izolátů B, G a H 93 % (Obr. 3). V rámci inhibičního efektu je třeba také zohlednit spektrum testovaných fusárií. Izoláty D3 (*F. proliferatum*) a F3 (*F. oxysporum*) jsou méně citlivé na přítomnost produktů laktobacilů než například *F. avenaceum*, které je ze skupiny testovaných fusárií nejcitlivější. Různá citlivost osmi druhů aspergilů na supernatanty *L. plantarum* byla zaznamenána ve studii Kavková a kol., 2022b. Testování antifungálního účinku na nativních izolátech z luskovin náležejícím k více druhům je vhodné zejména

**Tab. 7** Variabilita inhibičního účinku laktobacilů na radiální růst mycelia pěti druhů fusárií. Df – stupně volnosti, F – hodnota testového kritéria porovnávací proměnné, p – hladina významnosti odpovídající 95% pravděpodobnosti testu (Faktoriální ANOVA, Statistica 12.1.)

	DF	F	p
Izoláty laktobacilů	12	1165,61	0,0E
Izoláty fusárií	4	820,38	0,0E
Supernatant - frakce	1	14238,16	0,0E
Izoláty laktobacilů vs izoláty fusárií	48	28,39	0,0E
Izoláty laktobacilů vs. supernatant	12	189,67	0,0E
Izoláty fusárií vs. supernatant	4	18,3	0,004
Izoláty laktobacilů vs. izoláty fusárií vs. supernatant	48	14,17	0,0E



**Obr. 3** Růst mycelia fusárií na médiu PDA s 20% obsahem bezbuněčných supernatantů z izolátů laktobacilů, kultivovaných na MRS+FGGM 24 h. CFS1 – frakce s obsahem proteinů  $\geq 30$ kDa, CFS2- frakce s proteiny a peptidy o velikosti 2-30 kDa.

proto, že v rámci porostů se vyskytuje vždy více druhů včetně patotypů a ras, které mohou způsobovat obdobné symptomy (Gilbert a kol., 2022; Šišic a kol., 2018). Antifungální účinek BMK izolovaných v rámci vinařství byl úspěšně testován vůči *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rajčatech ve Španělsku (López-Seijas a kol., 2020) a kmeny BMK z tropického ovoce vykazovaly významnou antifungální aktivitu vůči fusáriím *in vitro* (Valencia-Hernández a kol., 2021). Druh *L. plantarum* je uváděn jako významný zástupce BMK vhodný nejen k regulaci fusárií, ale také jako detoxifikační agens mykotoxinů, která fusária produkují (Agriopoulou a kol., 2020). K detoxifikaci mykotoxinů dochází jednak přímo prostřednictvím buněk BMK, fixací do buněčné stěny (Vieco-Saiz a kol., 2019) či působením metabolitů BMK (Nunes a kol. 2021).

## Závěr

Izoláty *L. plantarum* (B, J) z luskovin, které vykazovaly významné inhibiční schopnosti, disponují geny pro produkci bakteriocinů a chitinázy. Všechny izoláty

*L. plantarum*, kromě A a C, produkovaly CBP *in vitro*. Růst mycelia fusárií byl také významně inhibován frakcí bezbuněčného supernatantu (2-30 kDa) druhu *L. pentosus* (G, H), kde CBP byl detekován *in vitro* pouze u izolátu H (*L. pentosus*). Produkce kyseliny mléčné a octové byla u všech izolátů z luskovin významně nižší, než u kmenů ze siláží (191,196) a kmene 1110, i když pH substrátů se významně mezi kmeny nelišilo. Zjištění, že frakce bezbuněčného supernatantu o velikosti 2-30 kDa má významné inhibiční účinky v porovnání s koncentrátem  $\leq 30$  kDa nebo nefiltrovaným médiem posunuje aplikační možnosti spíše k využití metabolitů v rámci ochrany luskovin než k aplikaci samotných buněk. Předmětem dalšího výzkumu zůstává řada dalších úkolů, jako například vhodné kultivační medium stimulujič produkci funkčních proteinů a peptidů, forma filtrace a nejvhodnější způsob a doba aplikace do porostů luskovin.

### Poděkování:

Príspevek vznikl za podpory projektu MZe ČR Země QK22010255 a MZe-RO1422

### Literatura:

- AGRIOPOULOU, S., STAMATELOPOULOU, E., VARZAKAS, T. (2020): Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods* 9 (2):137, s. 1–24.
- BETTIOL, W., SILVA, H.S., REIS, R.C. (2008): Effectiveness of whey against zucchini squash and cucumber powdery mildew. *Scientia Horticulturae*, 117 (1), s. 82–84.
- CRISP, P., WICKS, T.J., TROUP, G., SCOTT, E.S. (2006): Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew. *Australasian Plant Pathology* 35 (5), s. 487–493.
- DARANAS BOADELLA, N., ROSSSELO, G., CABREFIGA J., DONATI, I., FRANCÉS, J., BADOSA, E., SPINELLI, F., MONTESINOS, E., BONATERRA, A. (2019): Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of applied biology* 174, s. 92–105.
- DEMIRBAŞ, F., İSPIRLI, 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.
- DUAR, R.M., LIN, X.B.; ZHENG, J., MARTINO, M.E., GRENIER, T., PÉREZ-MUÑOZ, M.E., LEULIER, F.; GÄNZLE, M.; WALTER, J. (2017): Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Rev.*, 41 (1), s. S27–S48.
- FHOULA, I., NAJJARI, A., TURKI, Y., JABALLAH, S., BOUDABOUS, A., OUZARI, H. (2013): Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed Research International*, s. 1–14.
- GARCIA-CANO, I., RICHA-MENDISA, D., ORTEGA-ANAYA, WANG, K., KOSMERI, E. (2019): Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, s. 5243–5257.
- GEORGE, F., DANIEL, C., THOMAS, M., SINGER, E., GUILBAUD, A., TESSIER, F.J., REVOL-JUNELLES, A.-M., BORGES, F., FOLIGNÉ, B. (2018): Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* 9:2899.
- GILBERT, S. EDEL-HERMANN, V., GAITHERON, E., GAUTHERON, N., SOL, J.-M., CAPELLE, R., BARDON-DEBATS, A., LAMBERT, C., STEINBERG, C. (2022): First report of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens* and *Fusarium solani* causing root rot on pea in France. *Plant Diseases* s.1297.
- 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.
- CHOI, S.; BAEK, M., CHUNG, M.-J.; LIM, S.; YI, H. (2021): Distribution of bacteriocin genes in the lineages of *Lactiplantibacillus plantarum*. *Scientific Reports*, 11, 20063.
- JAFFAR, N.S.; JAWAN, R.; CHONG, K.P. (2023): The potential of lactic acid bacteria in mediating the control of plant diseases and plant growth stimulation in crop production – A mini review. *Front. Plant Sci.* 13:1047945.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J., DRÁB, V.; BAZALOVÁ, O.; DLOUHÁ, Z. (2022a): The Interactions among Isolates of *Lactiplantibacillus plantarum* and Dairy Yeast Contaminants: Towards Biocontrol Applications. *Fermentation* 8, s. 1–14.
- KAVKOVÁ, M., DRÁB, V., CIHLÁŘ, J., BAZALOVÁ O., DLOUHÁ, Z. (2022b): Identifikace druhů *Aspergillus* spp. z mlékařských matric a provozů a jejich regulace pomocí kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*. *Mlékařské listy* 192, 33 (3), s. 7–16.
- KAVKOVÁ, M.; HORÁČKOVÁ, Š.; DRÁB, V.; CIHLÁŘ J., BĀR, L. (2022c): Antifungální aktivita kvasinek vůči kontaminantům rodu *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. *Mlékařské listy* 195, 33 (6) s. 17–24.
- LAMONT, J.R., WILKINS, O., BYWATER-EKERGARD, M., SMITH, D.L. (2017): From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biol. Biochem.* 111, s. 1–9.
- LEPŠ, J. A ŠMILAUER, P. (2016): Biostatistika. Nakladatelství Jihočeské university. s. 414.
- LIMANSKA, N. IVANYTSIA, T., BASIUL O., KRYLOVA K., BISCOLA, V., CHOBERT J.M., IVANYTSIA, V., HAERTLE, T. (2013): Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1587–1585.
- LIMANSKA, N., KOROTAEVA, N., BISCOLA, V., IVANYTSIA, T., MERLICH, A. (2015): Study of the Potential Application of Lactic Acid Bacteria in the Control of Infection Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Pathol Microb.*, 6, 292, s. 3–9.
- LINARES-MORALES, J.R., GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N., RIVERA-CHAVIRA, B.E., PÉREZ-VEGA, S.B., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V. (2018): Biocontrol Processes in Fruits and Fresh Produce, the Use of Lactic Acid Bacteria as a Sustainable Option. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, s. 1–13.
- LÓPEZ-SEIJAS, J., GARCÍA-FRAGA, B., DA SILVA, A., D., SIEIRO, C. (2020): Wine Lactic Acid Bacteria with Antimicrobial Activity as Potential Biocontrol Agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Agronomy*, 10, s. 25–31.
- LÓPEZ DE FELIPE, F.; DE LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R. (2022): Molecular Responses of Lactobacilli to Plant Phenolic Compounds: A Comparative Review of the Mechanisms Involved. *Antioxidants*, 11, s. 1–18.
- MILLER, E.R.; KEARNS, P.J.; NICCUM, B.A.; O'MARA SCHWARTZ, J.; ORNSTEIN A.; WOLFE B.E. (2019): Establishment limitation constrains the abundance of lactic acid bacteria in the Napa cabbage phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* 85:e00269-19.
- MINERVINI, F. a kol. (2018): Wheat endophytic lactobacilli drive the microbial and biochemical features of sourdoughs. *Food Microbiol.* 70, s. 162–171.
- NUNES, V. M.; MOOSAVI, M; KHANEGHAH, A. M.; OLIVEIRA, C. A. (2021): Innovative modifications in food processing to reduce the levels of mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 38, s. 155–61.
- PALLA, M., CRISTANI, C., GIOVANNETTI, M., AGNOLUCCI, M. (2020): Large genetic intraspecific diversity of autochthonous lactic acid bacteria and yeasts isolated from PDO tuscan bread sourdough. *Appl. Sci.* 10, s. 1–11.
- PERCZAK, A. a kol. (2018): The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 69 (1), s. 32–45.
- ŚWIECA, M., KORDOWSKA-WIATER, M., PYTKA, M., GAWLIK-DZIKI, U., BOCHNAK, J., ZŁOTEK, U. (2018): *Lactobacillus plantarum* 299V improves the microbiological quality of legume sprouts and effectively survives in these carriers during cold storage and *in vitro* digestion. *PLoS ONE*, 13, s. e0207793.
- SADIQ, F.A., TIAN, B., ZHAO, J., ZHANG, H., CHEN E. (2019): Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 18, s. 1403–1436.

- SALAS, M.L., THIERRY, A., LEMAÎTRE, M., GARRIC, G., HAREL-OGER, M., CHATEL, M., LÊ, S., MOUNIER, J. (2018): Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, s. 1–18.
- 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.
- SANDOW, J.J.; INFUSINI, G.; DAGLEY, L.F.; LARSEN, R.; WEBB, A.I. (2019): Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timsTOF Pro. *bioRxiv*, doi:10.1101/657908.
- SCANO, P., PISANO, M.B., MURGIA, A., COSENTINO, S., CABONI, P. (2021): GC-MS Metabolomics and Antifungal Characteristics of Autochthonous *Lactobacillus* Strains. *Dairy*, 2, s. 326–335.
- STRAFELLA, S.; SIMPSON, D.J.; YAGHOUBI KHANGHAHI, M.; DE ANGELIS, M.; GÄNZLE, M.; MINERVINI, F.; CRECCHIO, C. (2021): Comparative Genomics and In Vitro Plant Growth Promotion and Biocontrol Traits of Lactic Acid Bacteria from the Wheat Rhizosphere *Microorganisms*, 9, s. 1–78.
- ŠIŠIĆ, A; BAČANOVIĆ-ŠIŠIĆ J, KARLOVSKY P, WITWER R, WALDER F, CAMPIGLIA E, A kol. (2018): Roots of symptom-free leguminous cover crop and living mulch species harbor diverse *Fusarium* communities that show highly variable aggressiveness on pea (*Pisum sativum*). *PLoS ONE* 13 (2): e0191969
- VALENCIA-HERNÁNDEZ, L., LÓPEZ-LÓPEZ, K., GÓMEZ-LÓPEZ, E.D., SERNANCOCK, L., AGUILAR C. N. (2021): In-vitro assessment for the control of *Fusarium* species using a lactic acid bacterium isolated from yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel Moran)). *Journal of Integrative Agriculture*. 20, s. 159–167.
- VIECO-SAIZ, N., BELGUESMIA, Y., RASPOET, R., AUCLAIR, E., GANCEL, F., KEMPF, I., DRIDER I. (2019): Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology* 10:57.
- WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 172 (2), s. 697–703.
- YU, A. O.; GOLDMAN, E.A.; BROOKS, J.T.; GOLOMB, B.L.; YIM, I.S.; GOTCHEVA, V.; ANGELOV, A.; KIM, E.B.; MARCO, M.L. (2021): Strain diversity of plant-associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *Microbial biotechnology* 14 (5), s.1990-2008.

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

Přijato do tisku: 13. 3. 2023  
Lektorováno: 14. 4. 2023

## “CO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

### OBOHACOVÁNÍ MLÉČNÝCH PRODUKTŮ

#### Chemické složení a nutriční význam včelího pylu, plástového pylu a mateří kašičky a jejich role ve funkčních fermentovaných mléčných výrobcích

Darwish, A.M.G. et al. (2023). Chemical profiling and nutritional evaluation of bee pollen, bee bread, and royal jelly and their role in functional fermented dairy products. *Molecules*, 28(1): 227.

Cílem práce bylo sledovat nutriční hodnotu, chemické složení a biochemickou charakteristiku včelího pylu, plástového pylu a mateří kašičky a studovat možnosti aplikace při obohacování funkčních fermentovaných mléčných výrobků. Byly sledovány účinky na startovací mlékařské kultury a fyzikálně-chemická a senzorycká kvalita produktů. Ve včelích produktech bylo identifikováno celkem 46 sloučenin, včetně flavonoidů, mastných kyselin a peptidů, které by mohly být látkami s potenciálními léčivými účinky. Nejvyšší obsah bílkovin a sacharidů (22,57 a 26,78 g/100 g) vykazoval plástový pyl. Tento obsah pokryje 45,14 a 53,56 % jejich doporučené denní dávky, se značným množstvím esenciálních aminokyselin threoninu a lysinu (59,50 a 42,03 %). Včelí pyl, plástový pyl a mateří kašičku lze považovat za zdroj železa, protože 100 g může pokrýt 141, 198,5 a 94,94 % doporučené denní dávky. Bylo zjištěno, že včelí pyl má nejvyšší obsah fenolů a flavonoidů (105,68 a 43,91 µg/g) a vykazoval synergický efekt, když byl smíchán s mateří kašičkou, což vedlo ke zvýšení antioxidační aktivity, zatímco plástový pyl vykazoval s mateří kašičkou synergický efekt v případě proteolytické aktivity.

Tento článek je dostupný v plné verzi na: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/1/227>

#### Vývoj inovativních návrhů obohacení vitamínu D u dvou typických italských čerstvých sýrů: Burrata a Giuncata

Santanatoglia, A. et al. (2023). Development of innovative vitamin D enrichment designs for two typical Italian fresh cheeses: Burrata and Giuncata. *Molecules*, 28(3): 1049.

Cílem tohoto výzkumu bylo vyvinout inovativní sýry obohacené vitamínem D3. Byly studovány dva tradiční italské sýry (Giuncata a Burrata). Pro tento vývoj byla provedena analýza texturních vlastností a chemického složení. Pro výrobu Guincaty bylo vitamínem D3 obohaceno mléko, u Burraty byla složka s vitamínem D3 po promíchání