

Produkce a degradace biogenních aminů pivovarsky významnými mikroorganismy

Bc. Jana Žáková

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Žáková**
Osobní číslo: **T15384**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Produkce a degradace biogenních aminů pivovarsky významnými mikroorganismy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Obsah biogenních aminů a polyaminů v pivu, jejich hlavní zdroje
2. Nutriční význam biogenních aminů a polyaminů v pivu
3. Mikroorganismy v produkci piva a jejich dekarboxylázová aktivita
4. Význam volby kvasničného kmene pro výrobu piva

II. Praktická část

1. Skríníng produkce/degradace biogenních aminů u vybraných kmenů pivovarsky významných mikroorganismů v různých médiích
2. Zpracování a vyhodnocení výsledků, formulace závěrů

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:


- [1] **BASAŘOVÁ, G. a kol. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. 904 s. ISBN 978-80-7080-734-7.**
- [2] **IZQUIERDO-PULIDO, M. L. a kol. Biogenic Amines in European Beers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996, vol. 44, no. 10, s. 3159 3163. ISSN 0021-8561.**
- [3] **KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. Journal of The Institute of Brewing. 2003, vol. 109, no. 2, s. 123 128. ISSN 0046-9750.**
- [4] **KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. Chemical Papers. 2005, vol. 59, no. 1, s. 70 79. ISSN 0931-7597.**
- [5] **PRADENAS, J. a kol. Occurrence of Biogenic Amines in Beers from Chilean Market. Food Control. 2016, vol. 70, s. 138 144.**
- [6] **SLOMKOWSKA, A., AMBROZIAK, W. Biogenic Amine Profile of the Most Popular Polish Beers. European Food Research and Technology. 2002, vol. 215, no. 5, s. 380 383.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Eva Lorencová, Ph.D.**
Ústav technologie potravin


Datum zadání diplomové práce: **3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017


doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŽÁKOVÁ JANA

Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 8.5.2017

Žáková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá produkcí a degradací biogenních aminů (BA) a polyaminů (PA) vybranými kmeny pivovarských kvasinek a laktobacilů. Izoláty byly získány od Ústavu pivovarského a sladařského v Praze. Byl proveden screening produkce a degradace biogenních aminů a polyaminů kvasinkami a laktobacily za podmínek *in vitro*, současně byl sledován vliv přídavku různých BA, PA a aminokyselin v několika variantách kultivačních médií. Stanovení bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s předkolumnovou derivatizací dansylchloridem.

Zástupci rodu *Lactobacillus* obecně disponují dekarboxylázovou aktivitou, a proto mohou představovat vážně riziko tvorby toxických množství BA/PA v pivu. To potvrzuje i analýzou zjištěná mohutná produkce tyraminu po kultivaci testovaných kmenů laktobacilů v živných médiích, která kolísala okolo 250 mg/l a místy dosahovala až 532 mg/l. Tyrozindekarboxylázovou aktivitu vybraných kmenů laktobacilů značně podpořila i přítomnost tyrozinu coby prekurzoru tohoto BA. Nedostatek živin v nutričně chudých minerálních médiích však vedl k degradaci tyraminu testovanými kmeny laktobacilů, kdy jeho množství byly některé kmeny schopné snížit o téměř 120 mg/l.

Na rozdíl od laktobacilů nepatří kvasinky mezi abundantní producenty. Byly zjištěny maximální přírůstky tyraminu do 23 mg/l, histaminu do 13 mg/l a putrescinu do 12 mg/l. Naopak nejvyšší úbytky se u tyraminu pohybovaly do 20 mg/l, u histaminu do 35 mg/l a u putrescinu do 12 mg/l. Pro potvrzení produkční/degradační schopnosti testovaných kmenů by bylo vhodné další experimenty navazující na tuto práci doplnit molekulárními metodami a stanovením po kultivaci kmenů v reálné matici.

Klíčová slova: biogenní aminy, polyaminy, kvasinky, pivo

ABSTRACT

This thesis is dealing with the production and degradation of biogenic amines (BA) and polyamines (PA) by selected strains of brewing yeasts and lactobacilli. The isolates were provided by Research Institute of Brewing and Malting in Prague. The screening of production and degradation of BA and PA by brewing yeasts and lactobacilli was carried out at *in vitro* conditions, the influence of medium type and various supplements (BA, PA, amino acids) was observed. BA and PA were determined by high performance liquid chromatography with UV detection with precolumn derivatisation by dansyl chloride.

Generally, the representatives of the genus *Lactobacillus* are able to decarboxylase amino acids to BA and PA. Therefore, their presence can be considered hazardous for the safety of beer. This statement was confirmed by a significant production of tyramine detected after the cultivation of lactobacilli strains in nutrient media. Mentioned production fluctuated around 250 mg/l, at maximum 532 mg/l. The presence of tyrosine considerably contributed the tyrosinedecarboxylase activity of these microorganisms. However, the lack of nutrients in nutritionally poor mineral media led to the degradation of tyramine by *Lactobacillus* strains tested almost about 120 mg/l.

Compared to lactobacilli, the yeasts are not classified as abundant producers of BA/PA. The maximum detected increments of tyramine was up to 23 mg/l, histamine up to 13 mg/l and putrescine up to 12 mg/l at maximum. By contrast, the highest decreases of tyramine were up to 20 mg/l, up to 34 mg/l of histamine and up to 12 mg/l of putrescine. To confirm the production/degradation capability of tested strains, it would be appropriate realize complementary molecular analysis and detection of BA/PA concentrations after the cultivation in real matrix in further experiments subsequent to this work.

Keywords: biogenic amines, polyamines, yeast, beer

Ráda bych poděkovala vedoucí práce paní Ing. Evě Lorencové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce a za její pomoc při vyhodnocování výsledků. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Ludmile Zálešákové, Ing. Olze Vlčkové a Bc. Veronice Kučabové za spolupráci a pomoc v laboratořích při měření praktické části.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VÝSKYT V POTRAVINÁCH.....	14
1.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	15
1.2 FYZIOLOGICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ PŮSOBNÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	17
2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V PIVU	20
2.1 VLIV SUROVIN NA OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V PIVU.....	22
2.2 VLIV TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA NA OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	25
2.3 OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V PIVU VE SPOTŘEBNÍCH OBALECH.....	28
3 MIKROORGANIZMY V PRODUKCI PIVA A JEJICH DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA.....	30
3.1 KVASINKY.....	32
3.1.1 Metabolismus kvasinek a jejich dekarboxylázová aktivita.....	33
3.1.2 Význam volby kvasničného kmene pro výrobu piva.....	36
3.2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	38
3.2.1 Metabolismus bakterií mléčného kvašení a jejich dekarboxylázová aktivita.....	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	42
4 CÍL PRÁCE	43
5 MATERIÁL	44
5.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	44
5.2 ROZTOKY CHEMIKÁLIÍ A POMOCNÉ LÁTKY	45
5.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	45
6 METODIKA	46
6.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	46
6.2 SCREENING DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY A SCHOPNOSTI DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ KMENY KVASINEK A LAKTOBACILŮ	47
6.2.1 Příprava živných médií, inokulace a kultivace kmenů.....	49
6.2.2 Stanovení obsahu biogenních aminů a polyaminů.....	50
7 VÝSLEDKY	51
7.1 MINERÁLNÍ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ AMINOKYSELINAMI.....	51
7.2 MINERÁLNÍ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ TYRAMINEM.....	53
7.3 MINERÁLNÍ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ TYRAMINEM A KVASNIČNÝM EXTRAKTEM	55
7.4 MINERÁLNÍ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ VYBRANÝMI BA	56
7.5 MINERÁLNÍ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ VYBRANÝMI BA A KVASNIČNÝM EXTRAKTEM	61
7.6 ŽIVNÉ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ AMINOKYSELINAMI	65
7.7 ŽIVNÉ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ TYRAMINEM	66
7.8 ŽIVNÉ MÉDIUM SUPLEMENTOVANÉ VYBRANÝMI BA.....	68
8 DISKUZE	73

9	ZÁVĚR.....	78
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
11	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	85
12	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	86
13	SEZNAM TABULEK	88
14	SEZNAM PŘÍLOH	89

ÚVOD

Nedílnou součástí procesu výroby potravin a nápojů představuje v dnešní společnosti monitoring cizorodých a zdraví škodlivých látek. Mezi látky představující potenciální riziko pro zdraví spotřebitelů řadíme i biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) (Rodriguez et al, 2014). BA a PA představují nízkomolekulární organické dusíkaté sloučeniny vznikající zejména mikrobiální dekarboxylací aminokyselin či aminací a transaminací aldehydů a ketonů (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013).

Přestože mají BA a PA v živých organizmech z fyziologického hlediska nezastupitelnou úlohu, obecně je jejich výskyt v potravinách považován za nežádoucí. Přítomnost těchto dusíkatých sloučenin slouží jako indikátor kvality a čerstvosti potravin, jelikož nasvědčuje nežádoucí mikrobiální kontaminaci a kažení. Vysoká množství BA a PA mohou navíc vykazovat přímé toxické působení na organismus (Russo et al., 2010).

Významnější koncentrace BA a PA lze zaznamenat v potravinách vyrobených procesem fermentace, jako rizikové se tak jeví sýry, zelí, masné výrobky, víno či pivo (Linares et al., 2011). Vzhledem k vysoké konzumaci piva na celém světě, a zejména v České republice, by měla být kontrole BA a PA v tomto nápoji věnována dostatečná pozornost (Pradenas et al., 2016).

Koncentraci aminů v pivu ovlivňuje především kvalita použitých surovin a technologie výroby (Roig-Sagués et al., 2009). Za nejrizikovější fázi bývá označována fermentace, neboť mladina představuje nutričně bohaté prostředí vhodné pro množení kulturních i kontaminujících mikroorganismů vykazujících dekarboxylázovou aktivitu (Priest a Stewart, 2006). Mezi takové patří zejména bakterie mléčného kvašení, aminogenní potenciál však mohou vykazovat i určité kmeny kvasinek (Halász et al., 1994).

Většina studií přikládá hlavní význam tvorby BA a PA v pivu bakteriím mléčného kvašení, tato práce se však snaží objasnit i úlohu kvasinek při produkci nebo naopak degradaci těchto dusíkatých substancí. Pro účely této studie byly použité kmeny kvasinek a laktobacilů získány od Ústavu pivovarského a sladařského v Praze. Screening byl prováděn za podmínek *in vitro*, současně byl sledován vliv přídatku různých BA, PA a aminokyselin v několika variantách kultivačních médií. K naplnění cílů práce bylo po derivatizaci vzorků dansylchloridem využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Jelikož testování probíhalo za laboratorních podmínek, umožnilo nám získat všeobecný přehled o schopnostech vybraných mikroorganismů degradovat či produkovat BA a PA. Je však třeba brát v úvahu, že v reálném prostředí mladiny by mohly metabolickou aktivitu kvasinek a laktobacilů ovlivnit další faktory jako přítomnost chmele či CO₂.

České ani evropské legislativní předpisy obsah BA a PA v pivu nijak neregulují, a to i přes zdravotní rizika, která mohou z jejich nadměrné konzumace vyplývat (Česká republika, 1997a; Evropská Unie, 2005). Proto by měli výrobci tohoto alkoholického nápoje iniciativně sledovat a řídit koncentrace cizorodých látek, k čemuž jim může být nápomocná i znalost zastoupení mikroorganismů a jejich vlastností (Bokulich a Bamforth, 2013).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VÝSKYT V POTRAVINÁCH

Kvalita, bezpečnost a zdravotní nezávadnost potravin jsou v dnešní společnosti považovány za samozřejmou součást jakosti daného produktu. Z tohoto důvodu dochází v potravinářském průmyslu k monitorování přítomnosti cizorodých a zdraví škodlivých látek, mezi které patří i BA a PA (Rodriguez et al, 2014).

BA a PA tvoří v nízké koncentraci přirozenou součást potravin. Mohou být detekovány jak v nezpracovaných potravinách a surovinách jako součást buněčných struktur, tak i ve výrobcích již zpracovaných a skladovaných (Rodriguez et al., 2014). Celkové množství vytvořených BA a PA však závisí na mnoha faktorech, mezi které patří zejména kvalita a povaha potravin a přítomných mikroorganismů, délka a podmínky skladování, hygiena a zvolená technologie výroby (Velíšek, 2002).

Z důvodu toxikologických rizik BA a PA pro lidské zdraví pamatují na jejich limity v potravinách i právní předpisy. Prvotní legislativní předpis, platný do roku 2002, zahrnoval povolená množství histaminu a tyraminu pro vybrané fermentované i nefermentované potraviny. Do těchto kategorií byly začleněny ryby a rybí výrobky, pivo, víno, sýry, kojenecká výživa a další (Česká republika, 1997a).

Nynější české první předpisy obsah BA a PA v potravinách nijak neregulují. Současná platná evropská legislativa upravuje pouze hodnoty histaminu v produktech rybolovu skrze Nařízení komise (ES) č. 2073/2005. Stanovuje limit histaminu na 100 mg/kg ryb, kdy ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže může být limit překročen do 200 mg/kg. Pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku a jsou vyrobené z ryb spojovaných s vysokým obsahem histidinu, je povolený limit 200 mg/kg, z čehož u dvou vzorků z devíti může být koncentrace překročena až do 400 mg/kg (Evropská Unie, 2005).

U ostatních skupin potravin je koncentrace jednotlivých BA a PA pouze doporučená. Toxická dávka sumy BA a PA je stále předmětem výzkumu. Obecně se uvádí široké rozmezí od 100 do 800 mg/kg, hodnoty jsou však závislé na typu aminů a potraviny, kvalitě surovin, technologii výroby i individuálních nežádoucích zdravotních účincích. Významnější koncentrace BA a PA se vyskytují v potravinách vyrobených procesem fermentace jako sýry, masné výrobky, víno a pivo (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013; Halász et al., 1994; Linares et al., 2011; Silla-Santos, 1996).

Sýry jsou vzhledem k vysokému obsahu bílkovin, volných aminokyselin a enzymů vhodným prostředím pro tvorbu BA a PA – hlavními zástupci jsou potom tyramin, histamin, kadaverin, putrescin a tryptamin (Mayer, Fiechter a Fischer, 2010). V čerstvém mase je obsah BA poměrně nízký, při dlouhodobějším skladování a při fermentaci však stoupá - nejčastěji je detekován histamin, kadaverin a tyramin (Bover-cid et al., 2000). Ryby patřící do čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae* (tuňák, makrela, treska) způsobují nejčastější alimentární intoxikaci zvanou scombroid syndrom, který je způsoben příjmem vysokých dávek histaminu (Bělohávková a Fuchs, 2005). Víno může obsahovat dokonce až 20 různých BA a PA, ve významnějších koncentracích se v něm vyskytuje histamin, tyramin, putrescin a kadaverin následovaný spermidinem, sperminem či agmatinem (Landete et al., 2005; Smit, Toit a Toit, 2008).

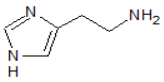
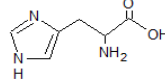
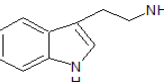
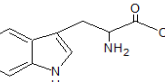
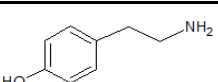
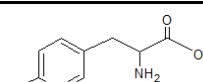
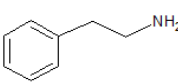
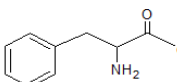

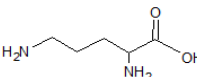

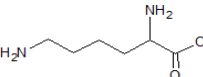

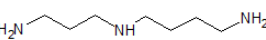
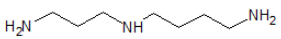

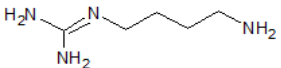
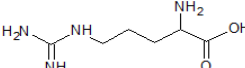
1.1 Struktura a vlastnosti biogenních aminů a polyaminů

BA jsou nízkomolekulární organické dusíkaté sloučeniny vznikající dekarboxylací aminokyselin či aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Tyto biologicky aktivní látky lze charakterizovat jako produkty metabolické činnosti mikroorganismů, rostlin i živočichů. Ke vzniku BA dochází v důsledku přirozené enzymatické aktivity surového materiálu nebo mikrobiální dekarboxylace aminokyselin. Ta ovšem závisí na mnoha faktorech, jako je množství a dostupnost aminokyselin, přítomnost dekarboxylázy pozitivních mikroorganismů či vhodné podmínky pro jejich růst a množení (Spano et al., 2010; Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013; Karovičová a Kohajdová, 2005).

Decarboxylace aminokyselin je uskutečňována buď reakcemi závislými na pyridoxal-5-fosfátu, který plní funkci kofaktoru dekarboxyláz, nebo reakcemi na něm nezávislými. Při účasti kofaktoru reaguje karbonylová skupina pyridoxal-5-fosfátu s aminokyselinami za vzniku Schiffových bází, které následně podstupují dekarboxylaci na odpovídající BA. Při reakcích nezávislých na účasti kofaktoru plní jeho funkci pyruvoylový zbytek, který je kovalentně vázán k aminoskupině fenylyalaninového zbytku na enzymu (Shalaby, 1996; Smit, Toit a Toit, 2008).

V současné době je známo přibližně 40 BA (Fialová et al., 2013), mezi potravinářsky nejvýznamnější však patří 9 z nich (viz Tab. 1).

Tab. 1 V potravinách významné BA a PA a jejich prekurzory (Shukla, Kim a Kim, 2011)

BA/PA		Prekurzor	
Název	Strukturní vzorec	Název	Strukturní vzorec
Histamin		Histidin	
Tryptamin		Tryptofan	
Tyramin		Tyrozín	
Fenyletylamin		Fenylalanin	
Putrescin		Ornitin	
Kadaverin		Lyzin	
Spermin		Spermidin	
Spermidin		Putrescin	
Agmatin		Arginin	

Vznik BA probíhá působením příslušných dekarboxyláz na prekurzor. Z histidinu působením histidindekarboxylázy vzniká histamin, z tyrozinu působením tyrozindekarboxylázy tyramin atd. Poněkud složitější situace nastává v případě ornitinu, putrescinu, spermidinu a argininu. Ornitin může vznikat z glutaminu i argininu, arginin však zároveň slouží jako prekurzor pro agmatin. Ornitin a agmatin pak mohou konvertovat na putrescin, který slouží jako prekurzor pro spermin i spermidin (Shukla, Kim a Kim, 2011; Halász et al., 1994).

Dříve tvořily BA ucelenou skupinu, v roce 1990 však došlo k odloučení skupiny tzv. polyaminů, a to z důvodu specifického fyziologického účinku a tvorby odlišnou metabolickou dráhou – při jejich syntéze probíhají reakce katalyzované syntázami (Dračková et al., 2009). PA jsou bazické sloučeniny s alifatickou strukturou, které se stejně jako BA

vyskytují v živých organizmech. Mezi PA lze zařadit kromě sperminu a spermidinu také putrescin, kadaverin a agmatin (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007).

Přestože mají BA a PA v živých organizmech z fyziologického hlediska nezastupitelnou úlohu, obecně je jejich přítomnost v potravinách nežádoucí. Vysoká množství těchto látek totiž mohou vykazovat přímé toxické působení na organismus, případně mohou reagovat s léčivy s psychotropním účinkem. Především ale slouží jako indikátor kvality a čerstvosti potravin, jelikož jejich přítomnost nasvědčuje nežádoucí mikrobiální kontaminaci a kažení (Tang et al., 2009).

BA a PA však nelze odepřít jednu důležitou vlastnost – v nízkých koncentracích mají v potravinářství nezastupitelnou úlohu díky své schopnosti dodávat výrobkům typickou chuť a aroma (Karovičová a Kohajdová, 2005).

1.2 Fyziologické a toxikologické působení biogenních aminů a polyaminů

BA a PA se účastní důležitých fyziologických pochodů, a to jak na buněčné, tak i na tkáňové a orgánové úrovni (Spano et al., 2010). Eukaryotické buňky BA přirozeně syntetizují, jelikož slouží jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů (Spano et al., 2010). V lidském organismu se podílejí na regulaci tělesné teploty, krevního tlaku či příjmu nutrientů (Karovičová a Kohajdová, 2005). Některé BA plní funkci neurotransmiterů, tedy přenašečů nervových vzruchů na synapsích (Spano et al., 2010).

Histamin, tryptamin, fenyletylamin a tyramin jsou řazeny mezi biologicky aktivní aminy s psychoaktivními nebo vazoaktivními účinky. Psychoaktivní aminy působí na neurotransmitery, čímž ovlivňují nervový systém. Vazoaktivní aminy působí na systém vaskulární (Shalaby, 1996). Histamin je považován za lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, reguluje sekreci žaludečních šťáv, účastní se při anafylaktickém šoku a alergických reakcích. Tyramin naopak krevní tlak zvyšuje, reguluje kontrakci hladkého svalstva, působí dokonce jako antioxidant (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008; Velíšek, 2002). Tryptamin představuje lokální tkáňový a rostlinný hormon, ovlivňuje krevní tlak, peristaltiku střev a psychiku (Velíšek, 2002)

PA jsou nezbytné pro růst, obnovu a metabolismus každého orgánu v těle, neboť se účastní buněčné proliferace a diferenciace. Jsou nezbytné pro udržení vysoké metabo-

lické aktivity normálně fungujícího imunologického systému ve střevech. Podílí se na stabilizaci membrán a proteosyntéze (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007; Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, Silla-Santos, 1996). I když dokáže každá buňka PA syntetizovat, lidský organismus přesto z části spoléhá na určitý příjem PA z potravy (Silla-Santos, 1996). S přibývajícím věkem klesá aktivita ornitindekarboxylázy, která se na biologické syntéze PA v organismu účastní, proto by měli zejména starší lidé dbát na dostatečný příjem PA ve stravě (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007).

Putrescin, spermidin a spermin inhibují oxidaci polynenasycených mastných kyselin, čímž přispívají ke zpomalení procesu stárnutí buněk. Tento účinek souvisí s počtem aminoskupin obsažených v daném PA (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008). Spermin a spermidin stabilizují hydroperoxid a zhasí singletový kyslík, čímž působí při akutních i chronických zápalech protizánětlivě. Rovněž se podílí na vývoji střevní tkáně (Kalač a Glória, 2009). Kadaverin, putrescin a agmatin stabilizují biologicky významné makromolekuly (nukleové kyseliny), subcelulární struktury (ribozomy) a stimulují buněčné dělení (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008).

Z důvodu důležitých fyziologických úloh BA a PA může vést jejich nedostatek k různým poruchám organismu, stejně tak i nadbytek však může zdraví jedince ohrozit (Linares et al., 2011). U citlivých osob mohou vést nadměrná množství BA a PA k toxickému působení projevující se bolestí hlavy, zvracením, hypertenzí, těžkými alergickými záchvaty provázenými dušností, vyrážkou a v extrémním případě i šokem a ztrátou vědomí (Russo et al., 2010).

Rovnováha koncentrace BA v buňkách je dána nejen jejich biosyntézou a degradací, ale také různými formami příjmu a exkrece (Halász et al., 1994). Lidský organismus je schopen do určité míry exogenní či endogenní aminy degradovat, a to díky působení specifických enzymů. Detoxikace se účastní především monoaminoxidáza (MAO), diaminoxidáza (DAO) a polyaminoxidázy (PAO) (Rodriguez et al., 2014). Koncové metabolity degradačních reakcí jsou poté snadno vylučovány močí (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008). Detoxikační kapacita je ovšem velice individuální záležitost a závisí na mnoha faktorech jako věk či zdravotní stav jedince (Shukla, Kim a Kim, 2011). Zhoršená činnost detoxikačního systému je zaznamenána u osob s genetickými predispozicemi, dýchacími obtížemi, osob se zvýšeným krevním tlakem či deficitem kobalaminu, jako inhibitor slouží také etanol (Juneja a Sofos, 2009). Etanol zpomaluje odbourávání BA z organismu, čímž zvyšuje jejich toxicitu (Russo et al., 2010).

S ohledem na výše uvedené detoxikační mechanismy můžeme u zdravých jedinců považovat množství sumy BA a PA do 100 mg/kg (mg/l) potravin za bezpečné (Linares et al., 2011; Silla-Santos, 1996). Shukla, Kim a Kim (2011) uvádí, že v potravinách lze tolerovat koncentraci histaminu 50–100 mg/kg, tyraminu 100–800 mg/kg a fenyletylaminu 30 mg/kg. Pro spermin a spermidin byla stanovena akutní toxicita při 600 mg/kg potravin, toxické účinky putrescinu a tryptaminu byly zaznamenány při 2000 mg/kg potravin (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013; Spano et al., 2010). V alkoholických nápojích je vzhledem k obsahu etanolu za toxickou považována koncentrace 25–40 mg/l tyraminu a 8–20 mg/l histaminu (Silla-Santos, 1996; Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013).

Nejznámější potravinové intoxikace způsobené BA se vztahují právě na histamin a tyramin, jejichž účinky může zesilovat kadaverin a putrescin (Mayer, Fiechter a Fischer, 2010). Potravinami kontaminovanými histaminem jsou obvykle ryby z čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae*. Dalšími potravinami, které mohou obsahovat toxikologicky rizikové množství histaminu, jsou zejména špenát, lilek, banány, červená vína, pivo a sýry. Po požití stravy s vyšším obsahem histaminu může dojít ke vzniku tzv. scombroid syndromu, který se projevuje především exantémem, erytremem, nauzeou, průjmem, zvracením, tachykardií, palpitací, hypotenzí až šokem připomínajícím analyfaktickou reakci (Bělohávková a Fuchs, 2005; Olšovská et al., 2014).

Tyramin disponuje schopností interagovat s inhibitory MAO, tedy psychofarmaky, čímž je následně zvýšeno riziko vzniku hypertenze, silné bolesti hlavy, nevolnosti, výkyvů srdečního rytmu, krvácení do mozku, mrtvice či selhání srdce. Tyramin představuje vazomotoricky aktivní amin způsobující rozšíření zornic a cév víček, slzení, slinění a zrychlení dechu. Jako rizikové potraviny z hlediska tyraminové otravy se jeví sýry, ryby, masné výrobky i pivo (Shalaby, 1996; Olšovská et al., 2014).

Z hlediska toxikologických rizik byla prokázána i souvislost mezi hladinou BA a PA v buňkách a onkologickými onemocněními. PA podporují růst a množení buněk, což se může nepříznivě projevit při růstu nádorů. Příjem PA z potravy by tedy měl být u onkologických pacientů omezován a pečlivě hlídán. BA a PA navíc disponují schopností reagovat s dusitany za vzniku potenciálně karcinogenních nitrosaminů, např. záhřevem může být způsobena přeměna putrescinu na N-nitrosopyrrolidin a kadaverinu na a N-nitrosopiperidin (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008).

2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V PIVU

„Pivem je pěnivý nápoj vyrobený z kvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, který vedle kvasným procesem vzniklého alkoholu (etylalkoholu) a oxidu uhličitýho obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu; slad lze do výše jedné třetiny hmotnosti celkového extraktu původní mladiny nahradit extraktem, zejména cukru, obilného škrobu, ječmene, pšenice nebo rýže; u pív ochucených může být obsah alkoholu zvýšen přidávkem lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů“. Tuto definici piva udává právní předpis, který upravuje oblast potravin. Jedná se o prováděcí vyhlášku č. 335/1997 Sb. k zákonu č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích v platném znění. Dále vyhláška zahrnuje také Členění piva na druhy, skupiny a podskupiny, Označování piva, Požadavky na jakost a Uvádění do oběhu (Česká republika, 1997b).

Z chemického hlediska představuje pivo složitou disperzní soustavu tvořenou více než 2000 sloučeninami. Ačkoliv některé složky piva pocházejí přímo ze vstupních surovin a v pivu přetrvávají beze změny, velká část je výsledkem biochemických změn probíhajících při základních technologických operacích, tj. rmutování, chmelovaru, kvašení a skladování (Kosař a Procházka, 2003; Vaněk, 2004).

Základní složku piva tvoří až z 92 % voda, která slouží jako rozpouštědlo pro ostatní organické i anorganické substance. Ty mají zásadní vliv na chuť a vůni piva a souhrnně jsou nazývány jako látky extraktivní. Dohromady tvoří 2–6 % a jejich hlavní součást představují sacharidy. Z nich jsou nejvýznamněji zastoupeny dextriny, v menším měřítku lze zaznamenat také oligosacharidy jako maltózu a maltotriózu. Další zástupci sacharidů, mezi které řadíme pentózy a β -glukany, zvyšují viskozitu piva (Kosař a Procházka, 2003). Obsah dusíkatých látek kolísá mezi 6–9 %, přítomny jsou jak vysokomolekulární, tak i nízkomolekulární substance. Přítomnost vysokomolekulárních sloučenin kladně ovlivňuje plnost a pěnivost, nízkomolekulární pak představují běžné aminokyseliny. Kromě nich jsou v pivu přítomné polyfenoly, hořké látky z chmele, fytoestrogeny, barviva ve formě melanoidinů, glycerol či heterocyklické látky (Hardwick, 1995). Pivo obsahuje všechny vitamíny skupiny B – pyridoxin, riboflavin, kyanokobalamin, kyselinu pantoténovou, kyselinu listovou, tiamin, biotin a niacin (Bamforth, 2003).

Z anorganických látek lze jmenovat především oxid uhličitý, který vzniká jako přirozený produkt kvašení a je zodpovědný za říz piva. Při kvašení vzniká také oxid siřičitý

a při stáčení se do piva dostává kyslík, jehož přítomnost je ze sensorického hlediska nežádoucí (Kosař a Procházka, 2003). Pivo obsahuje více než 30 minerálních látek a stopových prvků pocházejících ze sladu a varní vody. Z nejvýznamněji zastoupených minerálních látek lze jmenovat draslík, sodík, hořčík, vápník, fosforečnany, chloridy, sírany a dusičnany (Bamforth, 2003).

Nelze opomenout ani obsah etanolu, který ovlivňuje plnost piva a jehož množství závisí na koncentraci extraktu původní mladiny a stupni prokvašení. V pivu jsou obsaženy také vyšší alkoholy, acetaldehyd, estery, organické kyseliny, mastné kyseliny, sirné sloučeniny a těkavé aminy (Hardwick, 1995). Energetická hodnota výčepního piva je stanovena asi na 1500 kJ/l a je dána obsahem alkoholu, sacharidů a proteinů (Kosař a Procházka, 2003).

Mnohé studie zabývající se konzumací piva prokazují, že se v přiměřených dávkách uplatňují pozitivní zdravotní účinky. Konzumace nízkých dávek alkoholu snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, vysoký obsah vody v pivu zabraňuje dehydrataci organismu. Významný je i obsah antioxidantů, tedy polyfenolických látek (katechin, epikatechin), selenu a vitamínu C (Bamforth, 2003; Vaněk, 2004).

Na druhou stranu patří pivo mezi komodity disponující zvýšeným obsahem BA a PA. Je zároveň dle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) pátý nejkonzumovanější nápoj na světě. Česká republika patří dokonce podle průzkumů k zemím s nejvyšší konzumací piva (Pradenas et al., 2016). Z tohoto důvodu je nezbytná nejen minimalizace vzniku cizorodých látek, ale také kontrola jejich přítomnosti. Nežádoucí složky hrají v pivu významnou roli z toxikologického i technologického hlediska a ovlivňují bezpečnost i kvalitu tohoto nápoje (Olšovská et al., 2014).

Koncentrace BA a PA v pivu je ovlivňována z části kvalitou použitých surovin, především však technologickými operacemi jako rmutování, fermentace či skladování (Halász et al., 1994; Roig-Sagués et al., 2009; Kalač a Glória, 2009). Z hlediska obsahu těchto dusíkatých látek pocházejících ze surovin lze za rizikový považovat především slad a chmel. Nejvýznamnějším zdrojem však zůstává proces fermentace, během kterého dochází k signifikantní dekarboxylaci a vzniku BA a PA (Slomkowska a Ambroziak, 2002). Jejich koncentrace ovšem závisí na typu a podmínkách fermentace – např. spontánně kvašená piva vykazují obecně nejvyšší obsah těchto substancí (Pradenas et al., 2016). Celkový obsah BA a PA v pivu souvisí také s hygienickou úrovní pivovaru. Přítomnost mikroorga-

nizmů s dekarboxylázovou aktivitu – bakterií mléčného kvašení a bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, může indikovat závažnou kontaminaci provozu. Mléčné bakterie (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) jsou významnými producenty tyraminu a histaminu, zatímco např. *Enterobacter* spp. nebo *Escherichia coli* jsou zodpovědné především za produkci kadaverinu a putrescinu (Slomkowska a Ambroziak, 2002; Izquierdo-Pulido et al., 1996a). Tyto bakterie patří v pivovarském prostředí k nejobávanějším, neboť kromě toho, že produkují BA a PA, jsou nejčastější příčinou sensorických vad (zákal, nepříjemná chuť či vůně) a kažení (Asano et al., 2007). Typ a koncentrace BA a PA v pivu je tedy výsledkem kvality vstupních surovin, pivovarnických technik a hygienických podmínek (Tang et al., 2009).

2.1 Vliv surovin na obsah biogenních aminů a polyaminů v pivu

Základními surovinami pro výrobu piva jsou slad, chmel, pivovarské kvasinky a voda. Mezi pomocné přísady, zajišťující kvalitní finální výrobek, řadíme např. enzymatické preparáty, barvicí prostředky, sladidla či stabilizační přípravky (Basařová et al., 2010; Hornsey, 2013). Obsah BA a PA v pivu ovlivňují použité odrůdy ječmene, proces sladování, kvalita chmele i použité pivovarské kvasnice, přesto jsou však pivovarské suroviny pouze omezeným zdrojem těchto biologicky aktivních látek (Izquierdo-Pulido, Marine-Font a Vidal-Carou, 1994).

Slad

Slad má největší vliv na chuť, plnost a barvu piva. Jedná se o naklíčená a posléze osušená obilná zrna, nejčastěji z ječmene. Při procesu sladování, který sestává z máčení, klíčení a hvozdění ječmene, dochází v obilném zrně k tvorbě enzymů, aromatických a barevných látek nezbytných pro výrobu určeného druhu piva (Hornsey, 2013).

Ječný slad je ze všech pivovarských surovin považován za nejvýznamnější zdroj BA a PA v pivu. V ječmeni samotném se přirozeně vyskytuje tyramin, putrescin, spermin, spermidin a agmatin. V průběhu sladování ječmene se zvyšuje obsah BA a PA, neboť dochází ke štěpení přítomných bílkovin na nízkomolekulární sloučeniny a volné aminokyseliny, které slouží jako prekurzory (Glória a Izquierdo-Pulido, 1999). Mírný nárůst koncentrace histaminu, kadaverinu a fenyletylaminu v průběhu sladování zaznamenal Izquierdo-Pulido, Marine-Font a Vidal-Carou (1994), obsah putrescinu, sperminu, spermidinu a agmatinu se zvyšoval až o 3–5,5 mg/kg/den.

První fází sladování ječmene je máčení, které zajišťuje řízeným způsobem navýšení obsahu vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a klíčení zrna. Během máčení dochází také k odstranění lehkých nečistot a nežádoucích látek. Příjem vody zrnem je závislý na době máčení, teplotě vody, době odležení ječmene, pohybu zrna ve vodě, velikosti zrna, odrůdě ječmene a také na ročníku (Priest a Stewart, 2006). Konečný obsah vody v zrně se u světlých sladů volí 42–45 %, u tmavých 45–48 %. Máčení je považováno za nejdůležitější úsek výroby sladu, který rozhoduje o jeho budoucí kvalitě (Kosař a Procházka, 2003).

Cílem klíčení je aktivace a syntéza enzymů společně s požadovaným stupněm rozluštění zrna. Dochází k částečnému štěpení vysokomolekulárních látek, především škrobu a bílkovin, zvyšování obsahu jednodušších cukrů, zejména sacharózy, fruktózy a glukózy, které jsou spotřebovány pro výživu zárodku a výstavbu nových buněk. Mezi enzymy podílející se na klíčení patří především α - a β -amylázy, proteázy a hemicelulázy (Chládek, 2007).

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu. Záměrem hvozdění je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu, zastavit životní a lušticí pochody v zrně a vytvořit aromatické a barevné látky charakteristické pro různé druhy sladu (Hornsey, 2013). Přestože byla dříve výroba sladu nedílnou součástí pivovarů, v dnešní době již většina provozoven nakupuje hotový slad ze specializovaných sladoven (Basařová et al., 2010).

Ječný slad je průkazně hlavním zdrojem putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu, na konečné množství BA ve sladu má však zásadní vliv intenzita klíčení, teplota a odrůda ječmene (Kalač a Křížek, 2003). Poměrně široké rozmezí koncentrací BA ve sladu v závislosti na odrůdě ječmene prokázal Halász, Baráth a Holzapfel (1999). Tyramin byl detekován v rozmezí 87–189 mg/kg, putrescin v rozsahu 76–210 mg/kg, obsah sperminu kolísal od 63 do 196 mg/kg a spermidinu od 101 do 274 mg/kg. Obsah agmatinu dosahoval dokonce až 310 mg/kg. Vyšší hodnoty putrescinu (61–84 mg/kg), tyraminu (24 mg/kg) a histaminu (17 mg/kg) uvádí také Kalač, Hlavatá a Křížek (1997). Izquierdo-Pulido, Marine-Front a Vidal-Carou (1994) stanovili obsah putrescinu v ječném sladu přibližně na 40 mg/kg. Romero et al. (2003) porovnával obsah BA a PA ve sladu a kukuřiči použité jako surogát. Byla prokázána vyšší hladina putrescinu, sperminu a spermidinu ve sladu než v surogátu, pravděpodobně kvůli sladovacím teplotám (18–20 °C) optimálním pro dekarboxylázy. Kadaverin, histamin a tyramin byly detekovány pouze ve sladu.

Chmel

Chmel tvoří usušené chmelové hlávky samičích rostlin chmele evropského (*Humulus lupulus* var. *europaeus*), v pivovarnictví se ale používají také chmelové výrobky – granulky a extrakty. Jako jedna ze základních surovin se chmel podílí na chemickém složení a organoleptických vlastnostech finálního výrobku. Mezi nejdůležitější složky chmele patří chmelové pryskyřice, třísloviny, silice a ostatní látky (Priest a Stewart, 2006).

Chmelové pryskyřice, mezi které řadíme humulon a lupulon, dodávají pivu hořkost. Tyto hořké látky ovlivňují pěnivost, působí baktericidně a konzervačně. Třísloviny chrání pryskyřice před oxidací, podporují srážení bílkovin a zároveň ovlivňují chuť, říz a plnost piva. Silice zase udělují pivu charakteristické aroma (Basařová et al., 2010).

Chmel obsahuje nižší koncentrace BA a PA než slad, podle Ercan, Bozkurt a Soy-sal (2013) se v něm však vyskytují významné hladiny fenyletylaminu, tyraminu, putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu. Kalač, Hlavatá a Křížek (1997) stanovili několikanásobně vyšší koncentrace histaminu (53 mg/kg) a tyraminu (228 mg/kg) v chmelovém extraktu oproti sušenému chmelu a chmelovým granulím. V sušeném chmelu a chmelových granulích se hodnoty histaminu pohybovaly mezi 4–8 mg/kg a tyraminu mezi 10–16 mg/kg. Přestože by mohl chmel představovat významný zdroj BA a PA v pivu, vzhledem k nízkému množství používaném v technologickém procesu je jeho vliv na kvalitu finálního produktu a množství aminů v pivu téměř zanedbatelný (Kalač, Hlavatá a Křížek, 1997; Slomkowska a Ambroziak, 2002).

Voda

Další surovinou pro výrobu piva je tzv. varní voda. Složení vody významným způsobem ovlivňuje chuť výsledného produktu, a proto záleží na jejích parametrech. Za nevhodnou je považována tvrdá voda. Je proto doporučeno sledovat obsah vápenatých a hořečnatých solí. Voda pro výrobu piva by také neměla obsahovat žádné alkalické uhličitany, železo, mangan, chlor či oxidy dusíku. Všeobecně závazným parametrem je samozřejmě splnění požadavků vody pitné (Bamforth, 2003). Tato surovina není zdrojem žádných BA a PA (Kalač a Křížek, 2003).

Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky zajišťují kvašení mladiny, čímž ovlivňují chemické složení piva, jeho trvanlivost a organoleptické vlastnosti. Za jeden z nejdůležitějších biochemic-

kých znaků pivovarských kvasinek se považuje schopnost zkvašovat sacharidy za tvorby etanolu a oxidu uhličitého (Chládek, 2007). V pivovarnictví se využívá nejčastěji dvou druhů – *Saccharomyces pastorianus* a *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* jsou zodpovědné za svrchní kvašení piva, kdy je většina kvasinek vynesena k hladině mladiny, naopak *Saccharomyces pastorianus* jsou zodpovědné za spodní kvašení mladiny, a to ve formě sedimentu na dně kvasné nádoby (Basařová et al., 2010).

Vědecké závěry, zda jsou kvasinky schopné dekarboxylace aminokyselin, a tím i produkce BA a PA, se různí. Vlastnosti pivovarských kvasnic vzhledem k obsahu těchto látek v pivu jsou blíže specifikovány v kapitole 3.1.

2.2 Vliv technologie výroby piva na obsah biogenních aminů a polyaminů

Výroba piva zahrnuje technologické procesy skládající se z přípravy mladiny, kvašení, zrání piva a závěrečných úprav. Jedná se o sled složitých mechanických, fyzikálně-chemických a biochemických procesů (Hardwick, 1995).

Základní meziprodukt pro výrobu piva je mladina, která se vyrábí ve varně pivovaru ze sladu, chmele a vody. Cílem přípravy mladiny je převést v optimálním množství extraktivní látky ze sladu a chmele do roztoku, zajistit dostatek živin pro kvasinky a požadovanou hořkost finálního výrobku. Technologické operace výroby mladiny zahrnují šrotování sladu, vystírání, rmutování, scezování a vyslazování mláta, chmelovar a chlazení mladiny (Priest a Stewart, 2006).

Očištěný a navážený slad podléhá šrotování, které zajišťuje mechanickou dezintegraci sladových zrn, čímž je dosaženo vzniku sladového šrotu. Šrotování může probíhat za sucha, za mokra nebo za zvlhčování vodní parou, tzv. kondicionání (Bamforth, 2003). Následuje proces vystírání, který představuje smíchání sladového šrotu s nálevem vody o požadované teplotě. Vystírání se provádí ve vystírací kádi opatřené míchadlem (Hardwick, 1995).

Dalším krokem výroby mladiny je rmutování, které zajišťuje převedení extraktu surovin do roztoku. V jeho průběhu dochází k zahřívání vystírky na teploty vhodné pro působení enzymů, které zabezpečují degradaci škrobu a bílkovin na zkvasitelné cukry, dextriny a polypeptidy nezbytné pro fázi kvašení (Hornsey, 2013).

S ohledem na obsah BA a PA je rmutování podstatným krokem pivovarského procesu. Již při sladování ječmene přechází 35–40 % bílkovin do rozpustné nízkomolekulární formy, v průběhu rmutování navíc díky teplotní aktivaci exopeptidáz vzrůstá množství volných aminokyselin a rozpustného dusíku nezbytného pro metabolismus kvasinek (Kosař a Procházka, 2003). Tento krok je tedy významný z pohledu nárůstu obsahu prekurzorů BA a PA, které mohou být později využity kvasinkami či kontaminující mikroflórou schopnou dekarboxylace (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999). Kromě možných pozdějších negativních dopadů však může dojít během samotného rmutování ke snížení hladiny již přítomných BA/PA. Kalač a Křížek (2003) uvádí, že došlo během této technologické fáze k úbytku putrescinu a agmatinu. Halász, Baráth a Holzapfel (1999) dospěli k obdobným výsledkům, a to prokázáním snížení obsahu histaminu. Romero et al. (2003) zase zaznamenal dramatický pokles sperminu a spermidinu. Významným faktorem je pravděpodobně působení vyšších teplot v kombinaci s termolabilní povahou sloučenin (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999).

Následujícím krokem výroby piva je kvašení mladiny, jehož cílem je řízená přeměna sacharidů na alkohol a oxid uhličitý za současného vytváření vhodných organoleptických vlastností piva. Fermentaci zajišťují čisté pivovarské kultury záměrně a vhodně aplikované do mladiny. Prvním stupněm je hlavní kvašení mladiny, které probíhá v otevřených kvasných kádích nebo v uzavřených tancích. Druhá fáze fermentace představuje dokvašování a zrání piva uskutečňované v prostorách ležáckých sklepů, neboť pivo stále obsahuje nezkašené cukry, málo oxidu uhličitého a má nevyrovnanou chuť (Hornsey, 2013; Priest a Stewart, 2006).

Z hlediska tvorby BA a PA je právě fermentace považována za nejkritičtější technologický krok. Během hlavního kvašení a dokvašování piva může vznikat z toxikologického hlediska významné množství tyraminu, histaminu či kadaverinu (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013; Kalač et al., 2002). Obsah BA a PA je ovlivněn i typem a podmínkami fermentace mladiny, přičemž svrchně kvašená piva a spontánně kvašená piva vykazují mírně zvýšené hladiny těchto dusíkatých látek (Pradenas et al., 2016). Podle Izquierdo-Pulido et al. (1996a) u spontánně kvašených piv dosáhla hladina kadaverinu 10 mg/l, tyraminu 21,3 mg/l a histaminu 5,8 mg/l. Za původce BA a PA v pivu však nejsou označovány kvasinky (Kalač a Křížek, 2003; Slomkowska a Ambroziak, 2002). Zda pivovarské kvasnice vůbec disponují schopností produkce BA a PA nebylo dosud potvrzeno, a zůstává tak předmětem výzkumu. Většina dostupné literatury, která se zabývala studiem

kvasnic pro výrobu vína, totiž významnou produkci BA a PA neuvádí (Smit, Toit a Toit, 2008). Nepochybně je však přítomnost BA a PA spjatá s činností kontaminujících bakterií mléčného kvašení (Izquierdo-Pulido et al, 1996a).

Na výskyt a vitalitu mikroorganismů mají bezpochyby vliv kultivační podmínky prostředí. Během fermentace dochází činností kulturních kvasinek ke specifickým biochemickým reakcím. Tyto děje vedou ke snížení pH a podílu kyslíku, nárůstu obsahu oxidu uhličitého a růstových faktorů jako vitamínů či aminokyselin (Basařová et al., 2010). Nové podmínky prostředí mohou podpořit změnu zastoupení kvasinek směrem k fakultativně anaerobním druhům a aktivitu kontaminujících mikroorganismů. Za specifické kontaminující organizmy jsou považovány jakékoliv organizmy, které nebyly záměrně přidávány a které jsou schopny přežít a množit se v daném prostředí (Izquierdo-Pulido et al., 1995). Mezi bakterie, které se mohou účastnit fermentace piva a produkce BA a PA, řadíme zástupce rodu *Pediococcus*, zejména *Pediococcus damnosus* a zástupce rodu *Lactobacillus* (dále jen *Lb.*), např. *Lb. brevisimilis* a *Lb. brevis*. Tyto grampozitivní bakterie mléčného kvašení jsou zodpovědné především za produkci tyraminu a histaminu. Ke kontaminaci však může dojít i gramnegativními bakteriemi, které disponují schopností produkce kadaverinu a putrescinu (Romero et al., 2003; Kalač a Křížek, 2003).

Nárůst tyraminu, histaminu a kadaverinu v průběhu fermentace uvádí Kalač, Hlavatá a Křížek (1997), kteří zaznamenali nárůst tyraminu a histaminu i v průběhu skladování hotového produktu. Romero et al. (2003) navíc zaznamenal přímou úměru mezi obsahem BA a koncentrací etanolu. Tuto závislost vysvětluje prodlouženým fermentačním procesem, při kterém tak mohou mikroorganismy z kontaminovaných surovin či fermentačního tanku déle dekarboxylovat dostupné aminokyseliny. Kromě toho mohou nízké přídavky alkoholu (do 4 %) podporovat dekarboxylázovou aktivitu enzymů (Glória a Izquierdo-Pulido, 1999; Kalač a Křížek, 2003)

Závěrečné úpravy odleželého piva zahrnují filtraci, pasteraci, stabilizaci a balení. Filtrace zajišťuje odstranění mikroorganismů, které by při přetrvání mohly znehodnotit finální výrobek, kalických částic a prodloužení trvanlivosti. Stabilizace je uskutečňována pomocí různých látek jako tanin či kyselina askorbová a zajišťuje prodloužení záruky. Poslední krok představuje stáčení piva do cisteren či menších spotřebitelských obalů (Chládek, 2007; Basařová et al., 2010).

Z dosud získaných poznatků tak můžeme vyvodit, že zdrojem putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu je slad, zatímco tyramin, histamin a kadaverin jsou tvořeny během hlavní fáze fermentace, a to především díky činnosti kontaminujících mikroorganismů (Kalač et al., 2002).

2.3 Obsah biogenních aminů a polyaminů v pivu ve spotřebních obalech

Obsah BA a PA v pivu coby konečném produktu je předmětem řady studií napříč mnoha státy. V Íránských pivech byly detekovány velmi nízké hodnoty (< 10 mg/kg) histaminu, tyraminu a fenyletylaminu, stejně jako kadaverinu a putrescinu (Aflaki et al., 2014). Vzorčky polských piv obsahovaly průměrně 16 mg/l celkových BA a PA, přičemž největší zastoupení tvořil spermin, spermidin a putrescin (Slomkowská a Ambroziak, 2002). Na vzorky španělských piv se zaměřil výzkum Izquierdo-Pulido et al. (1996b), který sledoval vliv pivovaru na úroveň obsahu BA a PA. Ve všech pivech byl detekován tyramin (2–32 mg/l), agmatin (> 8mg/l) a putrescin (2–6 mg/l). Ostatní BA se vyskytovaly v nízké koncentraci pod 2 mg/l. Vliv pivovaru na obsah BA byl v této studii vyloučen, což poukazuje na výbornou sanitaci provozoven.

V průběhu skladování piva však může obsah BA a PA vzrůstat. (Buňka et al., 2012; Kalač et al., 2002; Izquierdo-Pulido et al., 1996a). Rozdílem koncentrace BA v českých pivech ihned po koupi a těsně před datem minimální trvanlivosti se zabýval Buňka et al. (2012). Ve více než 25 % testovaných piv na konci doby minimální trvanlivosti přesáhly hladiny BA a PA toxikologicky významných 100 mg/l, přičemž k nejvýraznějšímu nárůstu došlo u tyraminu, putrescinu a kadaverinu. Také Anli et al. (2006) uvádí nárůst obsahu tyraminu, kadaverinu, putrescinu a histaminu v průběhu 6 týdenního skladování. Doporučuje navíc uchovávání piva za chladnějších podmínek, neboť při zvýšených teplotách zaznamenal významnější produkci BA a PA. Sledování vývoje BA a PA během skladování se věnoval i Kalač et al. (2002), který zaznamenal vytvoření histaminu z počáteční nulové koncentrace na 2 mg/l během 8 dní a nárůst tyraminu o 7,4 mg/l v průběhu 12 týdnů. Potvrdil také riziko produkce BA a PA v lahvovém pivu inokulovanými laktobacily, které způsobily nárůst tyraminu, histaminu a putrescinu. Izquierdo-Pulido, Mariné-Font a Vidal-Carou (2000) dokonce navrhli, že obsah tyraminu v pivu koreluje s velikostí kontaminace *Pediococcus* spp. Z výsledků studií vyplývá, že nízká úroveň mikrobiálního statusu pivovaru a případná nedostatečnost pasteračního procesu může

představovat riziko z hlediska tvorby BA a PA v pivu (Anli et al., 2006; Buňka et al., 2012; Kalač et al., 2002).

3 MIKROORGANIZMY V PRODUKCI PIVA A JEJICH DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA

V pivovarnictví je aktivita mikroorganismů detekována v každé fázi výroby. Záměrně se uplatňuje při fermentaci a pomáhá výrobku definovat jeho sensorické charakteristiky. Z důvodu fermentované povahy piva je většina mikrobiální činnosti považována za žádoucí, část však může z hlediska kvality výrobku představovat hrozbu. Znalost zastoupení mikroorganismů včetně rizik, která s sebou nesou, tak umožňuje jejich kontrolu a řízení (Bokulich a Bamforth, 2013).

Mikrobiální kontaminace ječmene ovlivňuje výnos sladu, aktivitu amyláz, diastatickou mohutnost, abnormální fermentaci, nežádoucí chuť a vůni piva či celkový obsah BA a PA (Van Nierop et al., 2006; Glória a Izquierdo-Pulido, 1999). Mikrobiologický status ječmene je podmíněn předsklizňovými i posklizňovými faktory. Velké množství bakterií, kvasinek a plísní pochází z půdy, vegetace, vzduchu i zvířat, jejich přítomnost je úzce spjata s přírodními činiteli. Rovněž je nezbytné ječmen po sklizni uchovávat v takových podmínkách, které minimalizují další mikrobiální růst (Justé et al., 2011). Převládající druhy bakterií na ječmeni tvoří *Pantoea agglomerans* a *Xanthomonas campestris*, kromě nich lze detekovat také *Rathayibacter iranicus*, *Lactobacillus* spp. nebo *Pseudomonas fluorescens*. Z kvasinek se nejčastěji vyskytují *Debaryomyces hansenii*, *Pichia angusta* či *Rhodotorula mucilaginosa*. Mezi nejvýznamnější kontaminanty ječmene však patří plísně. Plísně jsou schopné produkce endo-xylanáz, β -glukanáz a proteináz, které umožňují rozklad vysokomolekulárních látek na nízkomolekulární (Van Nierop et al. 2006). Způsobují tak nárůst obsahu prekurzorů BA a PA nezbytných pro metabolismus dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů (Glória a Izquierdo-Pulido, 1999). Ze zástupců plísní lze jmenovat především *Fusarium* spp., *Aspergillus* či *Penicillium*, pro něž je kromě enzymatické aktivity charakteristická i produkce mykotoxinů (DON, T-2 toxin, aflatoxin atd.). Mykotoxiny znamenají nejen vážné zdravotní riziko pro člověka, ale také mohou inhibovat růst kvasinek během fermentace mladiny, a negativně tak ovlivňovat technologický proces (Bokulich a Bamforth, 2013; Justé et al., 2011).

Máčení a klíčení ječmene pro výrobu sladu podporuje mikrobiální aktivitu, a může tak ovlivnit kvalitu hotového piva. Především máčení představuje kritickou etapu výroby sladu, neboť díky vyšší aktivitě vody dochází k proliferaci bakterií, kvasinek i plísní. Limitující dostupnost kyslíku navíc podporuje rozvoj bakterií mléčného kvašení, které byly

v ječmeni zastoupeny původně minoritně (Justé et al., 2011). V průběhu klíčení mohou mikroorganismy z ječmene soutěžit se zárodkem o kyslík, příp. produkovat hormony a kyseliny, což vede k inhibici klíčení a snížení aktivity alfa-amylázy (Bokulich a Bamforth, 2013).

Přestože rmutování snižuje mikrobiální zatížení sladu, termotolerantní druhy, zejména homofermentativní bakterie mléčného kvašení, mohou tento proces přežít. To má své výhody, neboť díky okyselení rmutu dojde k lepší extrakci a zkvasitelnosti látek, zvýšení stability pěny a zlepšení barvy. Acidifikace prostředí kyselinou mléčnou navíc potlačuje rozvoj nežádoucí mikroflóry, k čemuž přispívají i inhibiční peptidy, tzv. bakteriociny (Vaughan, O'Sullivan a Sinderen, 2005). Nevýhody mikrobiálního růstu ovšem tkví např. v produkci BA a PA dekarboxyláza pozitivními mléčnými bakteriemi, v produkci nitrosaminů způsobené *Bacillus* spp. nebo kyseliny máselné vzniklé metabolismem klostridií. Při povaření sladiny s chmelem dochází k částečné sterilaci mladiny, přídavek chmele dokonce přirozeně inhibuje grampozitivní bakterie působením izokyselin (Bokulich a Bamforth, 2013).

Pro účely fermentace pivovarskými kvasnicemi musí dojít ke zchlazení a provzdušnění mladiny. Ta představuje nutričně bohaté prostředí s vyšším pH (~5,5) vhodné také pro množení kontaminujících mikroorganismů (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Escherichia*) a divokých kvasinek (Priest a Stewart, 2006). Znečištění pivovarských surovin některými zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* pochází ze surovin či prostředí pivovaru a v počátečních fázích fermentace bývá spojováno s přítomností BA a PA, stejně je tomu i při kontaminaci mléčnými bakteriemi (Vaughan, O'Sullivan a Sinderen, 2005). Divoké kvasinky, které do mladiny proniknou společně s ušlechtilými kvasnicemi během provzdušňování, bývají zodpovědné za abnormální průběh fermentace, vyšší obsah alkoholu, zákal a vznik nežádoucích pachů a příchutí (Priest a Stewart, 2006). Zda jsou stejně jako bakterie mléčného kvašení zodpovědné za produkci BA a PA není stále zcela zřejmé (Caruso et al., 2002).

Hotové pivo představuje mikrobiálně stabilní prostředí, a to vzhledem k nízkému pH (~ 4) a teplotě, vysoké koncentraci alkoholu (~ 5 %) a CO₂, přítomnosti α -hořkých kyselin z chmele a omezenému množství živin. Navzdory těmto faktorům však může docházet k rozvoji specifických druhů mikroorganismů, které mohou pivo nepříznivě ovlivnit (Bamforth, 2003). Patří mezi ně především divoké kvasinky a bakterie mléčného kvašení, které provází výrobu piva již od samotného počátku. Mikrobiální kontaminanty piva

tak mohou pocházet ze surového materiálu nebo pivovarského prostředí, kde často perzistují ve formě biofilmu (Priest a Stewart, 2006). K sekundární kontaminaci z prostředí může dojít při samotné výrobě i závěrečných úpravách, kdy všechny druhy kontaktu s neutěšněnými nádobami a lahvemi představují riziko. Vysoce náchylné jsou také produkty, které nebyly ošetřeny pasterací nebo byly ošetřeny průtokovou pasterací, a hrozí tak post-pasterační kontaminace (Vaughan, O'Sullivan a Sinderen, 2005).

3.1 Kvasinky

Pojem kvasinky je používán obvykle v laboratorních souvislostech, kvasnice naopak představují spíše aktivní biomasu provozních kvasinek. Obecně však kvasinky představují jednobuněčné houby, které taxonomicky spadají do domény *Eukaryota*, říše *Fungi*, třídy *Ascomycetes*, čeledi *Saccharomycetaceae* a podčeledi *Sacchyromycoideae* (Basařová et al., 2010; Kosař a Procházka, 2003). V současné době je uznáváno 10 druhů *Saccharomyces*: *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. cerevisiae*, *S. dairensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. servazzii* a *S. unisporus*. V pivovarnictví se setkáváme se dvěma druhy kvasinek. Oba druhy patří do skupiny tzv. *Saccharomyces sensu stricto*, která představuje komplex druhů kvasinek využívaných ve fermentačním průmyslu (Tenge, 2009).

V pivovarnictví se používají výhradně čisté pivovarské kultury s dobře definovanými vlastnostmi, které zaručují výrobu standardních produktů. Při výrobě piva se setkáváme s dělením na kvasinky svrchního kvašení a spodního kvašení. Za svrchní kvašení bývá zodpovědný druh *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, který je využíván pro výrobu speciálních druhů piv a umožňuje fermentaci při 18–22 °C po dobu 4 až 6 dní. Tyto kvasinky jsou vynášeny k hladině mladiny, kde tvoří hustou pěnu. Pro spodní kvašení je využíváno metabolické aktivity druhu *Saccharomyces pastorianus* (známé také jako *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* či *Saccharomyces carlsbergensis*). Na rozdíl od kvasinek svrchního kvašení se uplatňuje při výrobě ležáků. Fermentace probíhá 7–15 °C po dobu dvou týdnů, po jejím ukončení kvasinky sedimentují na dno nádoby (Priest a Stewart, 2006; Bamforth, 2003; Ferreira et al., 2010).

Druhy pivovarských kvasinek se však liší v mnoha dalších parametrech, na jejichž základě jsou pro pivovarnictví vybírány. Jedná se v první řadě o tvorbu senzorycky aktivních látek a rychlost rozmnožování i fermentace, ale i míru prokvašení, využívání živin, schopnost sporulace či vliv na konečné pH a pěnivost produktu (Bendová a Kahler, 1981).

Vzhledem k výše zmíněným proměnlivým vlastnostem jednobuněčných hub mohou při výrobě piva představovat jisté potíže tzv. „divoké“ nebo „cizí“ kvasinky. Tyto kvasinky jsou v podstatě jakékoli kvasinky jiné než kulturní, v ojedinělých případech tak lze označit i kvasinky kulturní, které však nebyly úmyslně aplikovány (Priest, 2006). Divoké kvasinky lze rozdělit do dvou kategorií, a to na kvasinky rodu *Saccharomyces* a kvasinky jiných rodů tzv. non-*Saccharomyces*. Mezi ně patří především rody *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Filobasidium*, *Rhodotorula* a *Zygosaccharomyces* (Matoulková, Kopecká a Kubizniaková, 2013).

Divoké kvasinky lze detekovat téměř v jakékoli fázi výroby piva, nicméně nejčastěji se uplatňují při hlavním kvašení. Od kulturních se liší tvarem i fyziologií, snadněji tvoří spory a mohou být zodpovědné za pomalý průběh fermentace, vyšší koncentrace alkoholu, tvorbu zákalu i nežádoucí příchutě a aroma. Divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* představují při výrobě piva větší hrozbu než ostatní rody, neboť jsou schopné růst za anaerobních podmínek, konkurovat kulturním kvasinkám a v případě nedokonalé filtrace či pasteurace přežít ve finálním produktu (Bendová a Kahler, 1981; Matoulková, Kopecká a Kubizniaková, 2013).

3.1.1 Metabolismus kvasinek a jejich dekarboxylázová aktivita

Základním smyslem jakékoli látkové přeměny je využít přítomné živiny k zisku energie nezbytné pro přežití a růst. V pivovarském průmyslu je metabolismu kvasinek využíváno pro svou schopnost přeměny zkvasitelných cukrů na alkohol a oxid uhličitý za vzniku širokého spektra vedlejších produktů (Bamforth, 2005). Jako hlavní zdroj energie využívají sloučeniny uhlíku, dusíku, enzymy a kyslík. Metabolismus kvasinek je ovlivňován složením mladiny, přítomností zdrojů výživy jako aminokyselin, peptidů, lipidů, vitamínů, růstových faktorů a iontů Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , vlastnostmi kvasnic i podmínkami procesu (Bendová a Kahler, 1981). Může být inhibován přítomností nitrátů a nitritů, obsahem alkoholu nad 6 %, vysokým osmotickým tlakem či dezinfekčními prostředky (Kosař a Procházka, 2003).

Metabolismus sacharidů

Kvasinky získávají největší množství energie ze sacharidů, kterých je v mladině obsaženo až 90 %. Jsou schopné využívat jednoduché cukry (glukózu, fruktózu, manózu, galaktózu), disacharidy (sacharózu, maltózu) a některé trisacharidy (rafinózu, maltotriózu).

Nejdříve dochází ke zkvašování monosacharidů a sacharózy (ta je rozštěpena vně buňky invertázou), neboť jednoduché cukry mohou být transportovány do buňky přímo. Až poté následuje maltóza a maltotrióza, které vyžadují aktivní transport přes buněčnou membránu (Priest a Stewart, 2006). V buňce vstupují jednoduché cukry do metabolické dráhy glykolýzy, která probíhá podle Embden-Meyerhof-Parnasova schématu. Toto schéma udává přeměnu monosacharidů na kyselinu pyrohroznovou, která představuje klíčovou složku buněčného metabolismu. Od pyruvátu může metabolická dráha postupovat dvěma různými směry – aerobním a anaerobním. V aerobním prostředí vstupuje pyruvát do citrátového cyklu, v anaerobním dle Gay-Lussacovy rovnice dochází ke vzniku pивovarsky významných komponent – oxidu uhličitého a etanolu. Při běžném postupu kvašení mladiny jsou pouze 2 % extraktu zpracována v aerobním cyklu. Během této fáze jsou kvasinky schopné syntetizovat zásobní uhlovodíky – glykogen a trehalózu (Bamforth, 2005; Kosař a Procházka, 2003).

Metabolismus lipidů

Lipidy jsou důležité složky buněčné stěny a charakteristické součásti intracelulárních organel. Přispívají k mnoha různým procesům, jako je buněčná signalizace, zásobování energií a buněčná smrt. Kvasinky mohou lipidy získat buď z vnějších zdrojů, syntézou *de novo* nebo hydrolyzou lipidů. K degradaci dochází metabolickou dráhou zvanou β -oxidace. Jelikož mladina obsahuje velmi nízké hodnoty lipidických složek, není jejich metabolismus pro pивovarský proces příliš významný (Bendová a Kahler, 1981).

Metabolismus dusíkatých látek

Obsah dusíkatých látek v mladině je zcela zásadní pro správný průběh fermentačního procesu. Tyto složky jsou nezbytné pro životaschopnost, růst a metabolismus buněk, tvorbu nových proteinů, enzymů, závisí na nich stupeň prokvašení i příjem sacharidů kvasinkami. Mladina obsahuje asi 5 % dusíkatých látek. Jejich hlavními zdroji jsou aminokyseliny a peptidy, které jsou vytvářeny již v průběhu sladování a rmutování z proteinů ječmene (Priest a Stewart, 2006).

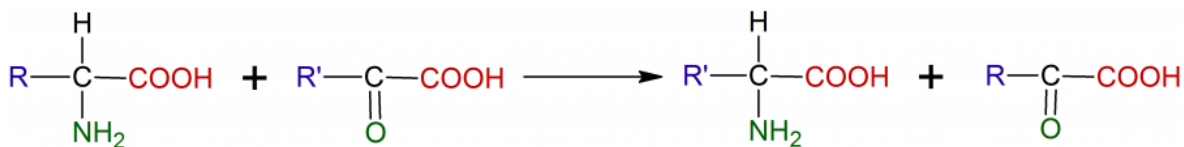
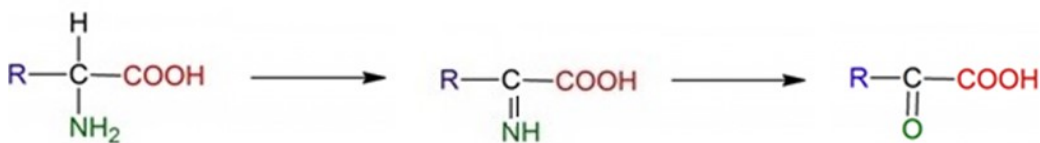
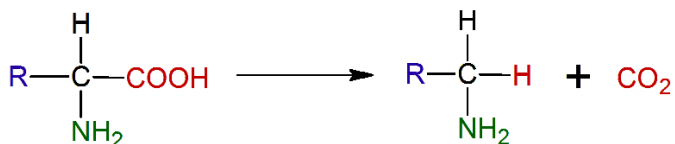
Aminokyseliny nepronikají do buněk prostou difuzí, jejich příjem je regulován specifickými transportními enzymy. Z tohoto důvodu jsou aminokyseliny využívány kvasinkami v různém pořadí a podle rychlosti transportu je lze dělit do čtyř skupin:

- Sk. A: glutamin, kys. glutamová, asparagin, kys. asparagová, serin, treonin, lyzin
- Sk. B: valin, metionin, leucin, izoleucin, histidin

- Sk. C: glycin, fenylalanin, tyrozin, tryptofan, alanin
- Sk. D: prolin

Z počátku dochází k poměrně rychlému transportu aminokyselin ze skupin A a B do buňky specifickými permeázami, teprve poté následuje transport dusíkatých látek ze skupiny C permeázami nespecifickými. Prolin představuje velmi charakteristickou aminokyselinu, která často není do metabolismu kvasinek zapojena. Příjem aminokyselin kvasinkami však závisí na celé řadě faktorů jako množství celkového dusíku, rychlost absorpce, kompetitivní inhibice aminokyselin nebo kmen kvasinek (Bamforth, 2005; Bendová a Kahler, 1981).

Po průniku dusíkatých látek do buňky může docházet k transaminaci, která umožňuje odstranění aminoskupiny a její využití pro syntézu aminokyseliny nové (Obr. 1). Nelze opominout ani deaminaci, jejímž výsledným produktem jsou keto-kyseliny. Ty mohou být zadržovány v buňkách kvasinek, dokud nevznikne potřeba je využít pro opětovnou syntézu aminokyselin (Obr. 2). Volné aminokyseliny však mohou působit také jako prekurzory pro vznik nežádoucích BA a PA. K jejich formaci dochází prostřednictvím dekarboxylace (Obr. 3) (Tenge, 2009; Bamforth, 2005).

Obr. 1. *Transaminace*Obr. 2. *Deaminace*Obr. 3. *Dekarboxylace*

Vědecké závěry, zda jsou kvasinky schopné dekarboxylace aminokyselin, se různí. Costantini et al. (2009) dospěl k názoru, že čistá kvasinková kultura *Saccharomyces cerevisiae* používaná pro výrobu vína není schopná produkce BA a PA. Přestože původní výsledky napovídaly opak, jejich vznik byl přičítán kontaminujícím mikroorganismům. Caruso et al. (2002) uvádí zanedbatelnou produkci histaminu, putrescinu, kadaverinu a tryptaminu (< 4 mg/l) různými druhy kvasinek, přičemž nejvyšší koncentrace celkových BA a PA (15 mg/l) byla zaznamenána u druhu *Brettanomyces bruxellensis*, zvýšené hodnoty BA (12 mg/l) byly detekovány také u druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Produkci agmatinu a etanolaminu tímto druhem uvádí i Baumlisberger et al. (2015), naopak druhy *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica* prokázaly výraznou schopnost degradace BA, a mohou se tak jevit jako vhodné fermentační kultury. Dekarboxylázovou aktivitu pivovarských kvasinek sledoval i Halász et al. (1994), který prokázal vyšší zastoupení spermidinu (79–189 mg/100g), putrescinu (25–55 mg/100g) a kadaverinu (13–28 mg/100g).

3.1.2 Význam volby kvasničného kmene pro výrobu piva

Základním předpokladem pro výrobu kvalitního piva s požadovanými vlastnostmi je správný výběr kvasnic a péče o jejich dokonalý fyziologický stav. Kvasinky totiž ovlivňují svou činností průběh kvašení mladiny, složení piva, jeho trvanlivost a sensorické vlastnosti (Bendová a Vernerová, 1986).

Pro splnění kýžených charakteristik výrobku není výběr kvasničné kultury jen na základě spodní a svrchní fermentace dostačující, protože i jednotlivé kmeny se mohou ve svých schopnostech lišit. Jedná se především o rychlost rozmnožování, míru a rychlost zakvašování mladiny, využití jednotlivých cukernatých a dusíkatých látek, flokulaci a číření piva a tvorbu vedlejších kvasných produktů a aromatických složek (Bendová a Pardonová, 1975).

Rychlost rozmnožování kvasinek je významná především pro zachování biologické čistoty kvasného procesu a dostatečné rozkvašení mladiny. Je však nutné brát v úvahu, že v procesu výroby piva není cílem získat biomasu kvasnic, nýbrž dosáhnout vhodného poměru aerobní a anaerobní fáze pro jejich propagaci. Z tohoto důvodu se jeví jako vhodná koncentrace kyslíku v mladině 6–8 mg/l, přesto je nutné respektovat nároky jednotlivých kmenů (Bendová a Pardonová, 1975). Další charakteristikou je rychlost úbytku zkvasitelného extraktu mladiny, která je závislá na enzymovém vybavení buňky a schopnosti adaptace kmene na podmínky prostředí (Bendová a Vernerová, 1986). Aktivitu a syntézu en-

zymů ovlivňuje vnitrobuněčný obsah aminodusíku, který se se stářím buněk a navyšujícím se počtem vedení kvasnic snižuje (Bendová a Pardonová, 1975). Stupeň prokvašení pak závisí především na složení mladiny a technologickém postupu. Významnou specifitou kmenů je i schopnost flokulace a sedimentace na dně kvasné nádoby (Bendová a Vernerová, 1986)

Vlastnosti kvasnic jsou zodpovědné za chuť, aroma a stabilitu piva, proto je nutné výše uvedené charakteristiky doplnit o senzoricou analýzu. Produkce vedlejších metabolitů a buketních látek, která se uplatňuje především ve fázi hlavního kvašení, závisí na genetických předpokladech jednotlivých kmenů (Basařová, Bláha a Veselý, 2003). Senzoricky aktivní substance mohou být rozděleny do pěti hlavních skupin: látky obsahující síru, organické kyseliny, vyšší alkoholy, karbonylové látky a těkavé estery (Škach a Slabý, 2009).

Mezi hlavní sirné sloučeniny produkované kvasinkami patří dimetylsulfid, sirovodík, oxid siřičitý a merkaptany. Oxid siřičitý chrání pivo před negativním vlivem rozpuštěného kyslíku svými antioxidačními a redukčními vlastnostmi, jeho zvýšená koncentrace má proto příznivý vliv na fyzikálně-chemickou stabilitu piva, oddaluje tvorbu nebiologických zákalů při skladování a podporuje čerstvou chuť (Basařová a Novák, 2004). Obsah oxidu siřičitého v pivu se pohybuje mezi 15–20 mg/l. Je známo, že jeho obsah zvyšuje zásadité pH mladiny a vyšší koncentrace sirných aminokyselin. Dominantní vliv má především typ použitého kmene kvasnic (Basařová, Bláha a Veselý, 2003).

Jednotlivé kmeny kvasinek se mohou lišit také ve schopnosti tvořit etanol, oxid uhličitý a organické kyseliny. Čím intenzivnější je rozmnožovací a fermentační schopnost kvasnic, tím víc se spotřebovávají ústojné látky z mladiny, a tím víc se vytvoří organických kyselin. Organické kyseliny zvyšují koncentraci vodíkových iontů v prostředí, čímž ovlivňují koagulaci bílkovin, vylučování hořkých látek z chmele a biologickou stabilitu piva (Bendová a Pardonová, 1975).

Kvasničné kmeny mohou také tvořit různé koncentrace vyšších alifatických a aromatických alkoholů. Ty způsobují tvrdší chuť piva, snižují pěnivost a způsobují bolest hlavy. Ze zástupců alifatických alkoholů lze jmenovat především 2-metylbutanol a 3-metylbutanol, z aromatických pak tyrozol a tryptofol vyvolávající chuťové změny piva (Bendová a Pardonová, 1975). Rozdílná tvorba vyšších alkoholů v závislosti na kvasničném kmene umožňuje výrobu piv s odlišným aromatem (Bendová a Vernerová, 1986).

Jednotlivé kmeny se mohou lišit i v produkci acetoinu a diacetylu. Množství těchto aromatických látek je však ovlivňováno i složením mladiny, dávkou kvasnic, teplotou kvašení a technologickým procesem (Bendová a Vernerová, 1986). U některých kmenů kvasinek byly zjištěny enzymy typu reduktáz, které jsou schopné degradovat určité mladinové karbonylové sloučeniny způsobující v pozdějších fázích starou chuť piva. Jsou známy dva enzymové systémy kvasinek, a to alkoholdehydrogenáza, která katalyzuje redukce pentanalu a pentenalu, a aldoreduktáza specifická pro 3-metylbutanal a pentanal. Závislost tvorby acetaldehydu na kvasničném kmeni nebyla prokázána (Basařová a Novák, 2004).

V senzoricím profilu piva hraje klíčovou roli produkce těkavých esterů (Škach a Slabý, 2009). Hlavní podíl tvoří etylacetát, který může v nadměrných množstvích způsobovat nepříjemně nahořklou až ovocnou příchut'. Tvoří se ale i další acetáty a etylestery kyseliny octové jako izoamylacetát a fenyletylacetát, etylkapronan, etylkaprylan a etylkaprinan, přičemž poslední dva estery mohou rozrušovat pěnu (Bendová a Pardonová, 1975).

Volba optimálního pivovarského kmene kvasnic pro konkrétní podmínky a cíle fermentace je vždy velmi důležitým strategickým rozhodnutím, které může ovlivnit nejen uplatnění výrobku na trhu, ale i ekonomiku jeho výroby (Škach a Slabý, 2009). Kmeny českých i zahraničních sbírek pivovarských kvasinek jsou uchovávány ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze. Aby mohly být kmeny ze sbírky správně využívány, je nutné znát jejich vlastnosti, a proto jsou jejich znaky a technologické charakteristiky pečlivě sledovány. Přesto je stanovení profilu kvasničného kmene problematické, protože kmen, který se dobře osvědčí v jednom pivovaru, se nemusí ujmout v jiném. Na základě laboratorních zkoušek totiž nelze simulovat speciální provozní podmínky (Bendová a Vernerová, 1986).

3.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení tvoří heterogenní skupinu mikroorganizmů, které spojují podobné morfoloické, metabolické a fyziologické charakteristiky. Jedná se o grampozitivní, mikroaerofilní až fakultativně anaerobní mikroby, nejčastěji nepohyblivé a nesporující. Pro tuto skupinu je charakteristický růst v kyselém prostředí a produkce kyseliny mléčné jako výsledek fermentace sacharidů. Hlavní představitelé této skupiny jsou rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Pod-

le fermentačních drah je lze dělit na homofermentativní a heterofermentativní bakterie (Šilhánková, 2008).

Bakterie mléčného kvašení se přirozeně vyskytují v trávicím a urogenitálním traktu lidí i zvířat a také na rostlinách a rostlinných materiálech. Tato přirozená flóra tak umožňuje spontánní fermentaci těchto materiálů. Díky svým vlastnostem jsou bakterie mléčného kvašení záměrně aplikovány v potravinářských technologiích jako starterové kultury pro fermentované potraviny. V nich se podílí kromě produkce kyseliny mléčné také na vývoji aroma, chuti a konzistence. Umožňují prodloužení trvanlivosti potravin snížením $\text{pH} < 4$, zabráněním vývoji nežádoucích bakterií, produkcí bakteriocinů a tvorbou nízkého redox potenciálu (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004).

V pivovarnictví jsou bakterie mléčného kvašení považovány za kontaminanty, do procesu výroby jsou zaneseny již z rostlinných surovin a často přetrvávají v pivovarských provozech v podobě biofilmu. Mezi rizikové a často se vyskytující bakterie řadíme představitele rodů *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Bakterie mléčného kvašení představují pro pivovarský průmysl nebezpečí především z hlediska kažení piva, které je uskutečňováno prostřednictvím acidifikace, tvorby zákalu, produkce diacetylu či slizu a tvorby BA a PA (Bokulich a Bamforth, 2013).

3.2.1 Metabolismus bakterií mléčného kvašení a jejich dekarboxylázová aktivita

Bakterie mléčného kvašení mají vysoké požadavky na živinové složení prostředí, ve kterém se vyskytují. V přírodě získávají nutrienty z rozkládajících se organických materiálů, které představují velmi bohaté zdroje. Mléčné bakterie samy o sobě nejsou schopné syntetizovat růstové faktory jako aminokyseliny a vitamíny, a tak jsou závislé na externích zdrojích. V pivovarském průmyslu je pro ně tedy vhodným prostředím právě mladina, která jim poskytuje dostatečné množství živin. Pro svůj růst a metabolismus využívají i aktivity kvasinek v procesu fermentace, neboť ty jsou schopné přirozené produkce růstových faktorů a stimulují tak rozvoj mléčných bakterií. Utlumujícím činitelem může být obsah hořkých látek z chmele, přesto si však na ně byly některé bakterie schopné vytvořit rezistenci (Šilhánková, 2002; Vaughan, O'Sullivan a Sinderen, 2005).

Metabolismus sacharidů

Glykolýza probíhá za anaerobních podmínek a jejím výsledkem je vznik energetických sloučenin ATP a vedlejších metabolitů. Homofermentativní bakterie mléčného kva-

šení, stejně jako všechny sacharolytické mikroorganismy, metabolizují sacharidy Embden-Meyerhof-Parnasovou dráhou až na pyruvát. Tato dráha umožňuje následnou přeměnu kyseliny pyrohroznové na laktát jako jediný produkt fermentace glukózy. Tento typ kvašení poskytuje až dvakrát více energie než heterofermentativní. Mezi homofermentativní bakterie patří zástupci rodů *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a některé laktobacily (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004).

Heterofermentativního metabolismu využívají zástupci rodů *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Lactobacillus*. Jelikož postrádají enzym aldolázu, uplatňují fosfoketolázovou metabolickou dráhu, na jejímž konci stojí kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina propionová, oxid uhličitý a etanol (Šilhánková, 2002).

Metabolismus dusíkatých látek

Bakterie mléčného kvašení mají vysoké nutriční požadavky, a to zejména na obsah dusíku. Vyžadují exogenní zdroje aminokyselin nebo peptidů, které vzniknou hydrolýzou proteinů. Na rozdíl od kvasinek mají bakterie mléčného kvašení k dispozici proteázy, tudíž si jsou schopné zajistit dostatečné množství dusíkatých látek ve vhodné nízkomolekulární podobě. Vzhledem k povaze mladiny i piva jsou bakterie mléčného kvašení považovány za nebezpečné kontaminanty, neboť prokazatelně disponují dekarboxylačními mechanismy (Manca de Nadra, 2007). Je však nutné zmínit, že produkce BA a PA je především kmenovou specifikací daných mikroorganismů (Spano et al., 2010).

Výsledkem činnosti bakterií mléčného kvašení, především laktobacilů a pediokoků, je přítomnost BA a PA v pivu (Glória a Izquierdo-Pulido, 1999; Olšovská et al., 2014). Totéž tvrdí i Sohrabvandi, Morazavian a Rezaei (2012), kteří označují laktobacily za původce tyraminu a histaminu v lahvovém pivu. K nárůstu tyraminu, histaminu a kadaverinu v důsledku činnosti kontaminujících mikroorganismů může dojít zejména v průběhu fermentace mladiny (Kalač, Hlavatá a Křížek, 1997). Dekarboxylázová aktivita bakterií mléčného kvašení je však obecně spojována s širokým spektrem fermentovaných potravin, nejen s pivem. Během výroby asijské miso pasty byla zaznamenána tyrozin-dekarboxylázová aktivita *Lb. bulgaricus*, produkce histaminu byla spojována s *Lb. sanfrancisco* (Shukla, Kim a Kim, 2011). Bakterie mléčného kvašení příslušící rodům *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Oenococcus* se podílí na tvorbě BA a PA ve víně, za hlavní producenty tyraminu, histaminu a fenyletylaminu byl označen *Lb. brevis* a *Lb. hilgardii* (Baumlisberger et al., 2015). Významná produkce histaminu ve vinném

rmutu však byla zaznamenána i u některých kmenů oenokoků. Schopnost tvorby histaminu, tyraminu a putrescinu by tedy neměla být přisuzována celému rodu, nýbrž jen některým druhům až kmenům. Například *Lb. buchneri* a *Lb. curvatus* se považují za histidin-dekarboxyláza pozitivní, kdežto *Lb. brevis* a *Lactococcus lactis* jsou schopné vytvářet tyramin (Russo et al., 2010). Některé bakterie jsou za určitých podmínek dokonce schopné dekarboxylovat více různých aminokyselin (Smit, Toit a Toit, 2008).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části diplomové práce bylo stanovit, zda jsou vybrané kmeny kvasinek a laktobacilů získané od Ústavu pivovarského a sladařského v Praze schopné produkce nebo naopak degradace BA a PA za podmínek *in vitro*.

Dílčími cíli práce bylo provést screening dekarboxylázové aktivity kvasničných kmenů a laktobacilů a schopnosti degradace BA a PA těmito mikroorganismy. Současně byl sledován vliv přídavku různých BA a PA do odlišných kultivačních prostředí na degradaci těchto dusíkatých látek a přídavku aminokyselin na produkci BA a PA.

Neméně významným dílčím cílem diplomové práce bylo zpracování a vyhodnocení výsledků získaných laboratorním měřením.

K naplnění cílů práce bylo po derivatizaci vzorků dansylchloridem využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

5 MATERIÁL

5.1 Kultivační média

MALT bujón

Bujón byl připraven smícháním 10 g MALT Broth (HiMedia Laboratories, Indie) s 500 ml destilované vody. Médium bylo rozplněno do zkumavek po 5 ml a následně vysterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

MRS bujón

Médium bylo připraveno smícháním 27,5 g MRS Broth (HiMedia Laboratories, Indie) s 500 ml destilované vody. Bujón byl rozplněn do zkumavek po 7 ml a vysterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

MALT agar

Pevná kultivační půda byla připravena smísením 10 g MALT Broth (HiMedia Laboratories, Indie) a 7,5 g agarózy (HiMedia Laboratories, Indie) s 500 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a sterilně rozplněno do Petriho misek po 12 ml.

MRS agar

Pevná kultivační půda byla připravena smísením 27,5 g MRS Broth (HiMedia Laboratories, Indie) a 7,5 g agarózy (HiMedia Laboratories, Indie) s 500 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a sterilně rozplněno do Petriho misek po 12 ml.

Minerální médium

Základ média byl připravený smícháním 20 ml roztoku pufru KH_2PO_4 , 80 ml roztoku pufru $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 2 ml roztoku stopových prvků, 10 ml roztoku $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml roztoku $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 ml roztoku $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 ml roztoku NaCl . Směs byla doplněna destilovanou vodou do objemu 1000 ml, rozplněna do zkumavek po 5 ml a 7 ml a sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Kultivační média se suplementy

Bylo připraveno několik variant kultivačních médií suplementovaných BA a PA (tyramin, histamin, putrescin) a aminokyselinami (arginin, histidin, tyrozin, fenylalanin), viz kapitola 6.2.1.

5.2 Roztoky chemikálií a pomocné látky

1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, USA)

Aminokyseliny a biogenní aminy (Sigma-Aldrich, USA)

Dansylchlorid (Merck, Německo)

Dusík v tlakové nádobě (Linde, ČR)

Heptan (Sigma-Aldrich, USA)

L-prolin (Merck, Německo)

Kyselina chloristá (Merck, Německo)

5.3 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy A&D GH-200 EC (Mettler Toledo, ČR)

Autokláv 135 S H+P VARIOKLAV H+P (Labortechnik AG, Německo)

Automatické mikropipety (Biohit a Nichyrio, Finsko)

Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Box laminární BIO IIA, typ Biohazard (TELSTAR, Česká republika)

Digitální váha KB800-2- (Kern & Sohn GmbH, Německo)

Laboratorní sklo a plasty

Laboratorní třepačka LT2 (Kavalier, Votice, Česká republika)

Odstředivka EBA 20 (Hettich ZENTRIFUGEN, Německo)

pH metr - pH510 (Eutech Instruments, Nizozemsko)

Vortex Reax top (Heidolph, Německo)

6 METODIKA

6.1 Použité mikroorganismy

Pro monitoring dekarboxylázové aktivity a degradace BA a PA bylo použito celkem 16 kmenů kvasinek, které byly poskytnuty Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Praze (Research Institute of Brewing and Malting; RIBM). Jednalo se o kulturní i divoké pivovarské kvasinky náležící do druhů *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailli* a *Candida* sp.

Do screeningu bylo zahrnuto také 8 vzorků laktobacilů z procesu výroby piva a náležící do druhů *Lb. brevis* a *Lb. buchneri*. Kmeny byly získány od Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze. Přehled použitých kmenů kvasinek a laktobacilů je uveden v tabulce 2. Všechny vzorky byly hluboce zamrazeny a uchovávány při -80 °C v MRS/MALT médiu.

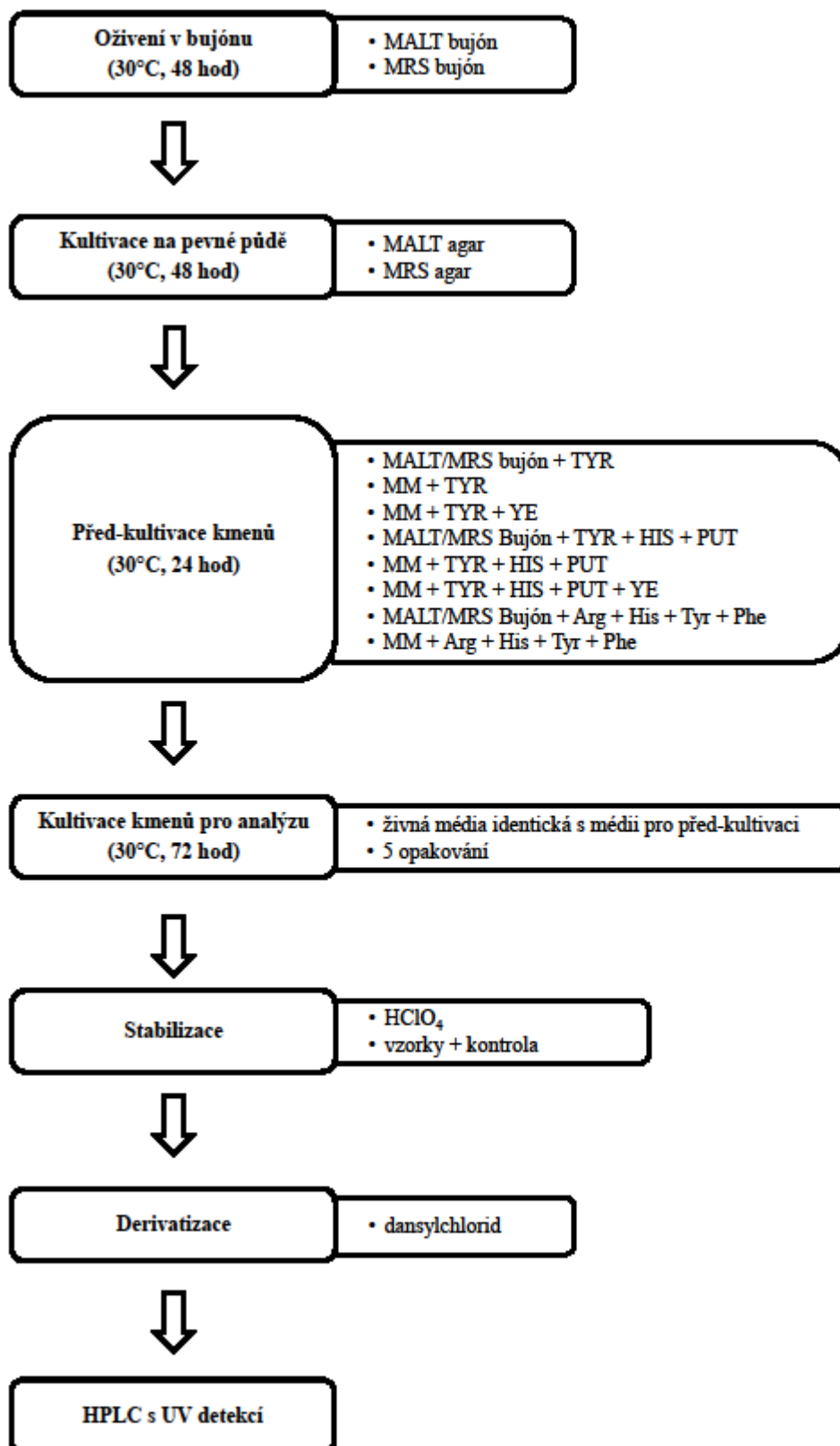
Tab. 2 Přehled kmenů použitých kvasinek a laktobacilů

Druh	Označení kmene	Druh	Označení kmene
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIBM 15	<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	RIBM BS 197/Z
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIBM 18	<i>Candida</i> sp.	RIBM Spk 76
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIBM 32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S-04
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIBM 95	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	W-34/70
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIBM 96	<i>Lactobacillus buchneri</i>	RIBM 2-9
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	RIBM 149	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 2-20
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	RIBM 150	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 2-72
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	RIBM 151	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 2-98
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	RIBM 153	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 2-111
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	RIBM A10	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 2-67
<i>Pichia membranifaciens</i>	RIBM BS 196	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 2-93
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	RIBM T5	<i>Lactobacillus brevis</i>	RIBM 70

6.2 Screening dekarboxylázové aktivity a schopnosti degradace biogenních aminů a polyaminů kmeny kvasinek a laktobacilů

V rámci experimentu byl proveden screening dekarboxylázové aktivity a schopnosti degradace BA a PA vybranými kmeny kvasinek a laktobacilů z procesu výroby piva. Monitoring byl prováděn za podmínek *in vitro* v živných médiích a nutričně chudých minerálních médiích. Tato média byla v různých obměnách suplementována tyraminem, kombinací několika biogenních aminů – konkrétně tyraminem, histaminem a putrescinem a nakonec i souborem aminokyselin – argininem, histidinem, tyrozinem a fenylalaninem (viz kapitola 5.1). Trendy v produkčním/degradačním chování vybraných kmenů byly sledovány a následně porovnávány.

Kultivace jednotlivých kmenů probíhala samostatně. Následně byly vzorky centrifugovány, stabilizovány, podrobeny derivatizaci dansylchloridem a analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích s UV detekcí. Zjednodušené schéma průběhu experimentu je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4. Schéma metodiky skrínungu dekarboxylázové aktivity a degradace BA a PA in vitro. TYR – tyramin, HIS – histamin, PUT – putrescin, YE – kvasničný extrakt, MM – minerální médium, Arg – arginin, His – histidin, Tyr – tyrozin, Phe – fenylalanin

6.2.1 Příprava živných médií, inokulace a kultivace kmenů

Pro zajištění dostatečné vitality kmenů bylo ze zmražených vzorků kvasinek a laktobacilů odebráno 500 μ l buněčné suspenze a přeneseno do živných bujónů MALT (pro kvasinky) a MRS (pro laktobacily) připravených dle postupů uvedených v kapitole 5. Inokulace probíhala za aseptických podmínek v laminárním boxu. Takto připravené vzorky byly kultivovány 48 hodin při 30 °C.

Po oživení kultur v tekutém médiu byl mikrobiologickou kličkou namočenou ve vortexované buněčné suspenzi proveden křížový roztěr kvasničných kultur na MALT agar a kultur laktobacilů na MRS agar. Inokulace probíhala v laminárním boxu, plotny byly následně kultivovány za obdobných podmínek.

Samotný experiment zahrnoval předběžnou kultivaci a kultivaci vitálních kmenů v dekarboxylačních médiích s různými suplementy. V rámci předběžné kultivace byla z pevných živných půd odebrána mikrobiologickou kličkou čistá kolonie daného kmene a resuspendována v novém tekutém médiu. Každý kmen byl přenesen celkem do 8 typů kultivačních půd:

- MALT/MRS bujón s 0,7 g/l tyraminu
- Minerální médium s 0,7 g/l tyraminu
- Minerální médium s 0,7 g/l tyraminu a 1 g/l kvasničného extraktu
- MALT/MRS bujón s 0,7 g/l BA (tyramin, histamin a putrescin)
- Minerální médium s 0,7 g/l BA (tyramin, histamin a putrescin)
- Minerální médium s 0,7 g/l BA (tyramin, histamin a putrescin) a 1 g/l kvasničného extraktu
- MALT/MRS bujón se 3 g/l aminokyselin (arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin)
- Minerální médium se 3 g/l aminokyselin (arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin)

pH kultivačních půd bylo upraveno na hodnotu 6,8–7,0 přidávkem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol/l. Inokulovaná média byla kultivována 24 hodin při 30 °C. Po uplynutí této doby bylo z každé kultivační půdy odebráno 100 μ l vortexované buněčné suspenze a přeneseno v 5 opakováních do identických médií. Tato média pak byla kultivována po dobu 72 hodin při 30 °C. Nezaočkovávaná média sloužila jako kontrola (n=6).

Po kultivaci byla provedena centrifugace buněčných suspenzí (3 421x g; 22±1 °C; 20 minut) a stabilizace vzorků smísením 750 µl supernatantu a 750 µl kyseliny chloristé o koncentraci 1,2 mol/l. Tímto způsobem byly připraveny i kontroly. Stabilizované vzorky byly uchovávány při -18 °C a posléze podrobeny derivatizaci.

6.2.2 Stanovení obsahu biogenních aminů a polyaminů

Pomocí kapalinové chromatografie s předkolonovou derivatizací dansylchloridem byla sledována produkce a degradace vybraných BA a PA – tyraminu, histaminu, putrescinu, fenyletylaminu, kadaverinu, tryptaminu, sperminu a spermidinu.

Ze vzorků získaných kultivací byl odebrán 1 ml do derivatizační nádoby, vialky. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptadiaminu) v koncentraci 500 mg/l, 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1–11,2 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu, který byl rozpuštěn v koncentraci 5 g/l v acetonu. Poté byly vzorky dobře utěsněny a třepány v temnu po dobu 20 hodin na třepáče. Po uplynutí této doby bylo ke každému vzorku přidáno 200 µl roztoku prolinu a směs byla opět 1 hodinu protřepávána v temnu. Následně byly vzorky zředěny 3 ml heptanu a 3 minuty intenzivně ručně protřepávány. Po odebrání 1 ml oddělené heptanové vrstvy s obsahem BA a PA do vialky byly vzorky při teplotě 60 °C odpařeny pod proudem dusíku a suchý odparek byl nakonec zředěn 1,5 ml acetonitrilu.

Derivatizované vzorky byly následně filtrovány přes filtr s porozitou 0,22 µm a nánášeny na chromatografickou kolonu pro separaci a analýzu BA a PA. Všechny separace probíhaly na koloně Agilent Zorbax Eclipse C18 s parametry 50 × 3,0 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies), chromatografický systém byl dále tvořen autosamplrem (LabAlliance SHLA84000), binární pumpou, odplyňovačem, UV/VIS-DAD detektorem a termostatem kolon (Agilent Technologies).

7 VÝSLEDKY

Monitoring dekarboxylázové aktivity a degradace BA a PA byl proveden u 16 kmenů kvasinek a 8 kmenů laktobacilů za podmínek *in vitro* v živných a minerálních médiích. Nutričně bohaté prostředí MALT média, vhodné pro kvasinky, je tvořeno sladovým extraktem a peptonem. Sladový extrakt slouží mikroorganizmům jako zdroj sacharidů a uhlíku, pepton představuje zdroj peptidů, dusíku a uhlíku. Laktobacily byly kultivovány v MRS médiu, které je charakteristické obsahem proteózopeptonu, dextrózy, hovězího extraktu a kvasničného extraktu. Obdobně jako u kvasinek, i toto médium představuje bohatý zdroj sacharidů, peptidů, uhlíku a dusíku – látek nezbytných pro dostatečnou metabolickou aktivitu a růst mikroorganizmů. Naopak minerální médium představuje nutričně chudé prostředí s limitujícím obsahem zdrojů uhlíku a dusíku. Mikroorganizmy v něm mohou využít zdroje energie z vlastní autolyzované biomasy nebo z dodaných suplementů.

Různé varianty médií byly zvoleny především za účelem stanovení potenciální dekarboxylázové aktivity a možných změn chování kvasinek a laktobacilů v závislosti na dostupných zdrojích nutrientů. Důležitým cílem bylo tedy jednak otestovat vybrané kmeny na schopnost produkce BA/PA, kdy u laktobacilů byla produkce očekávána (viz kapitola 3.2.1.), zatímco u kmenů kvasinek by se v případě produkce > 10 mg/l jednalo o negativní parametr v rámci volby vhodného kmene. Dále jedním ze záměrů experimentu bylo zjistit, zda budou některé kvasinky schopné využít tyramin, putrescin anebo histamin jako zdroj dusíku a jejich koncentraci v různě suplementovaných médiích, zvláště těch nutričně chudších, snižovat.

Kmeny kvasinek, které v živných médiích neprodukovaly významné množství BA/PA a v minerálním médiu naopak měly tendence obsah BA/PA snižovat, by mohly být doporučeny pro fermentaci piva a pro delší ležení piva v ležáckých tancích, kdy by hypoteticky mohlo docházet k úbytku BA/PA, které mají predispozice produkovat hlavně zástupci rodu *Lactobacillus*.

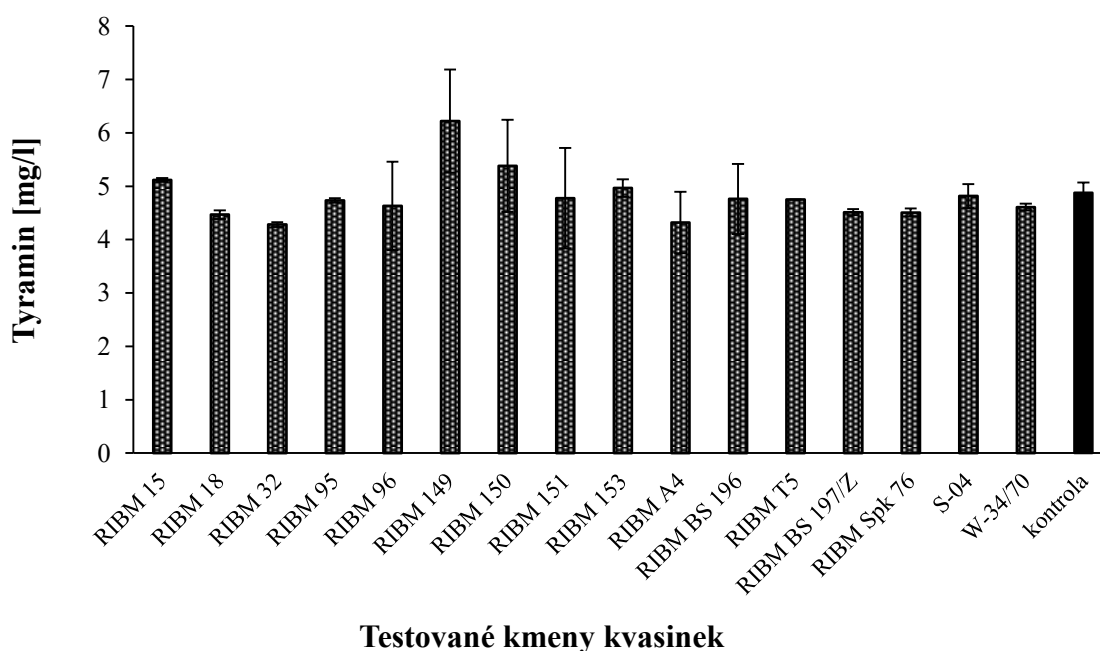
7.1 Minerální médium suplementované aminokyselinami

V rámci experimentu byla testována produkce či degradace BA v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami v koncentraci 3 g/l zahrnující arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin. Předmětem pokusu bylo stanovit, zdali dostatečné množství prekur-

zorů významně ovlivní produkci BA, anebo je pouze limitujícím faktorem, jak tvrdí Silla-Santos (1996).

Po 72 hodinové kultivaci laktobacilů v nutričně chudém prostředí nebyl detekován tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin ani histamin. K podobným výsledkům vedla i analýza média po kultivaci kvasinek, kdy nebyla zaznamenána přítomnost fenyletylaminu, kadaverinu ani tryptaminu. Byly však naměřeny nízké hladiny putrescinu do 4,1 mg/l a histaminu do 2,3 mg/l. Po kultivaci všech testovaných mikroorganismů, tedy kvasinek i laktobacilů, byl detekován spermin v koncentraci do 3,6 mg/l a spermidin do 5,1 mg/l (Příloha PI).

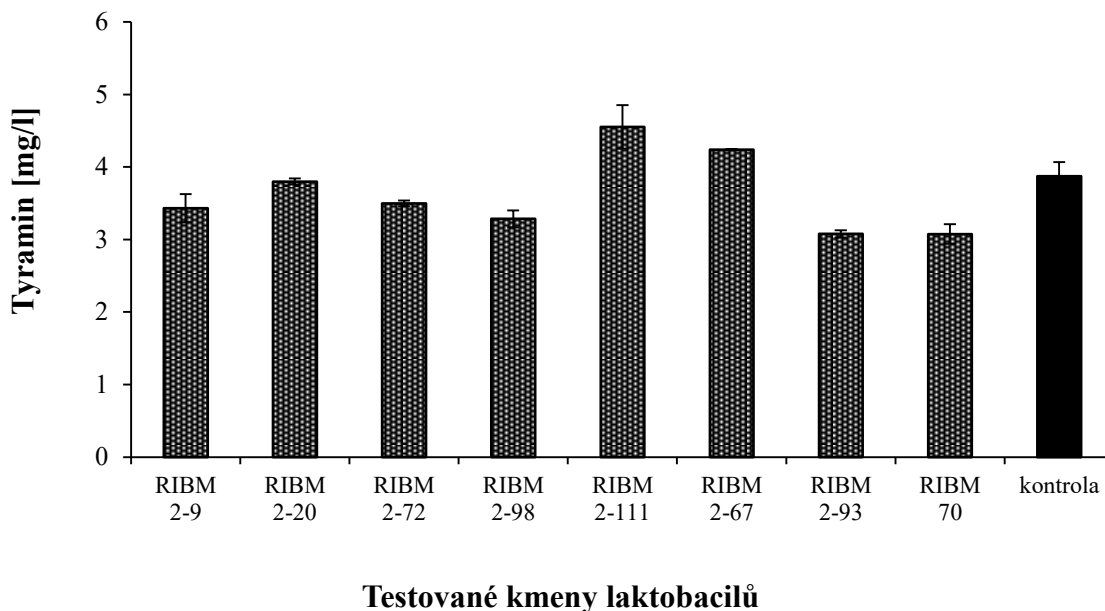
Velmi vyrovnané výsledky v porovnání s kontrolou poskytla analýza tyraminu po kultivaci kvasinek, naměřená data vykazovala odchylku v řádech desetin. Slabý nárůst koncentrace do 1,4 mg/l byl zaznamenán pouze u kmene RIBM 149, naopak degradaci o 0,5 mg/l vykazoval kmen RIBM 32. Vzhledem k malým přírůstkům/úbytkům tyraminu a stanoveným směrodatným odchylkám však nelze tyto hodnoty považovat za významné (Obr. 5).



Obr. 5 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami

Ke stejným závěrům lze dospět i v případě laktobacilů, kdy byl detekován shodný obsah tyraminu v porovnání s kontrolou, opět kolísající v řádech desetin (Obr. 6). Získané

výsledky dokazují, že v nutričně chudém prostředí, byť se zdroji aminokyselin, nedochází k významnější metabolické aktivitě mikroorganismů vedoucí k produkci nebo degradaci BA a PA.



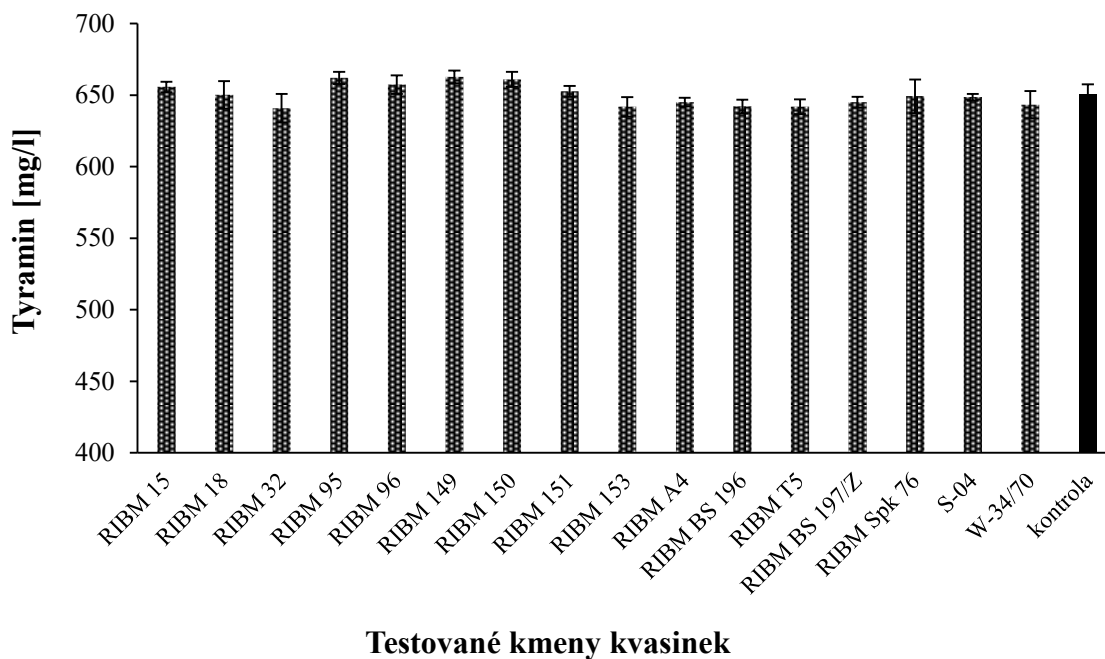
Obr. 6 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami

7.2 Minerální médium suplementované tyraminem

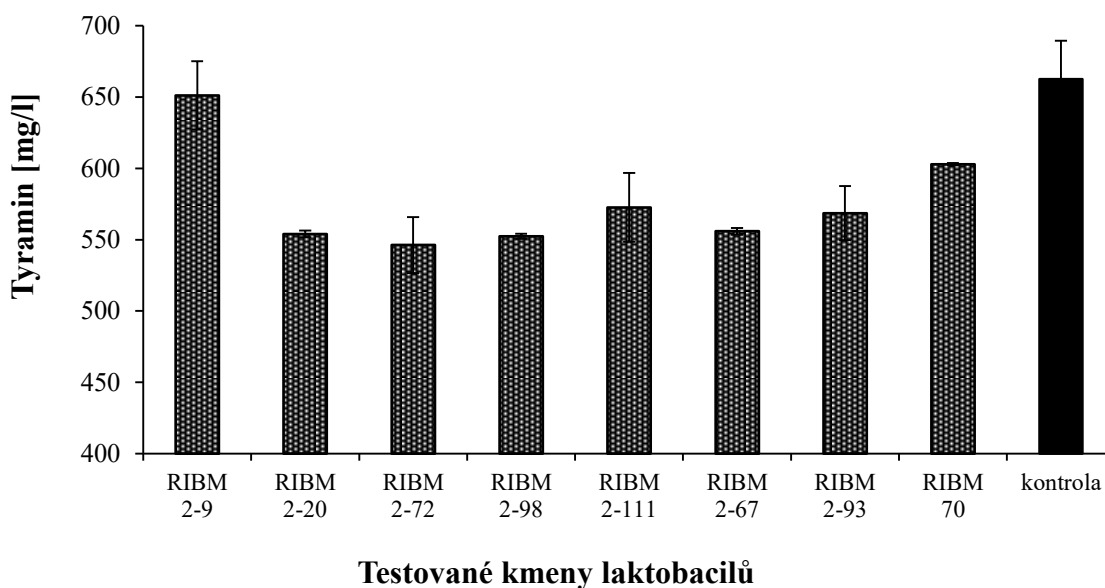
V minerálním médiu s přidáním tyraminu nebyl po kultivaci kvasinek a laktobacilů detekován tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin ani histamin. V případě laktobacilů nebyla zaznamenána ani přítomnost sperminu a spermidinu. Po kultivaci vybraných kvasničných kultur však byly detekovány hladiny těchto PA do 2,5 mg/l (Příloha PII). Lze usuzovat, že nutričně chudé prostředí minerálního média neprospívalo dekarboxylázové aktivitě testovaných kmenů.

Během kultivace laktobacilů v minerálním médiu došlo k mírnému poklesu koncentrace přidaného tyraminu. Jelikož médium neposkytovalo testovaným mikroorganismům dostatečné množství nutrientů, využily pravděpodobně suplementovaný tyramin jako zdroj dusíku pro svou metabolickou aktivitu, a jeho množství tak byly schopné snižovat. Jak je patrné z obrázku 8, nejnižší stupeň odbourávání tyraminu vykazoval kmen RIBM 2-9, ostatní kmeny byly schopné snížit jeho množství o bezmála 116,2 mg/l.

Naopak velmi vyrovnané výsledky oproti kontrole poskytly po kultivaci v minerálním médiu suplementovaném tyraminem testované kmeny kvasinek (Obr. 7). Vzhledem ke stanoveným směrodatným odchýlkám však nelze s jistotou říci, zda byly vybrané kmeny schopné prokazatelné degradace tohoto BA.



Obr. 7 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem

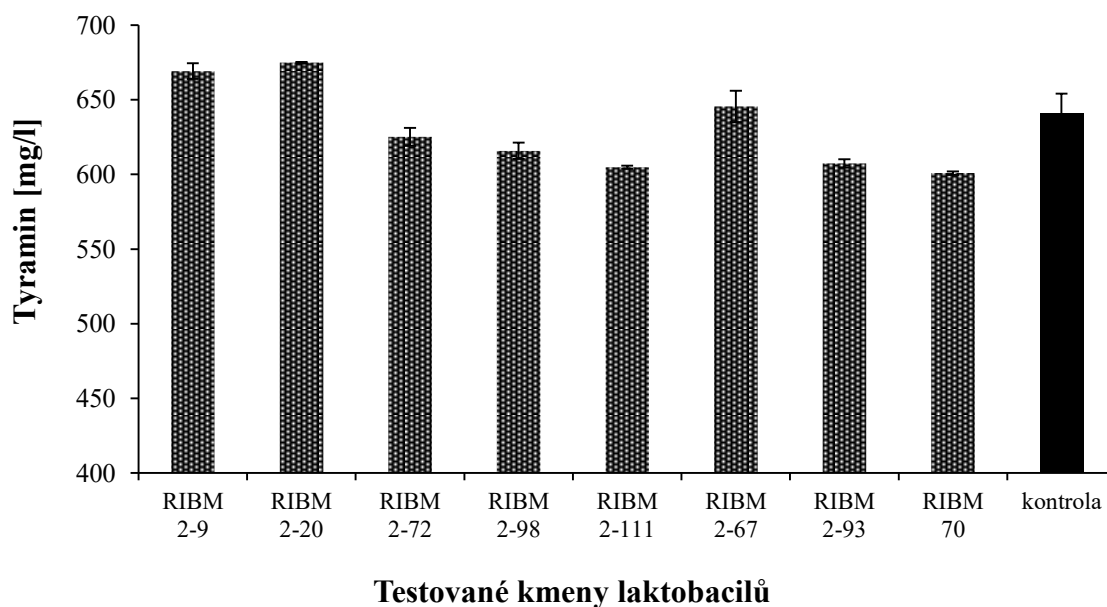


Obr. 8 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem

7.3 Minerální médium suplementované tyraminem a kvasničným extraktem

Ve variantě minerálního média s přidavkem tyraminu a kvasničného extraktu byla po kultivaci kvasničných kmenů detekována hladina tryptaminu do 5,1 mg/l, putrescinu do 3,2 mg/l a histaminu do 2,0 mg/l (Příloha PIII). Slabou produkci BA oproti minerálnímu médiu obohacenému pouze tyraminem si lze vysvětlit přidavkem kvasničného extraktu coby zdroje uhlíku a dusíku, který mohly testované mikroorganismy pro svou dekarboxylázovou aktivitu využít. V médiu nebyly naopak detekovány stopy fenylalaninu ani kadaverinu. Žádné z výše zmíněných BA a PA nebyly zaznamenány v tomto médiu ani po kultivaci zkoušených kmenů laktobacilů.

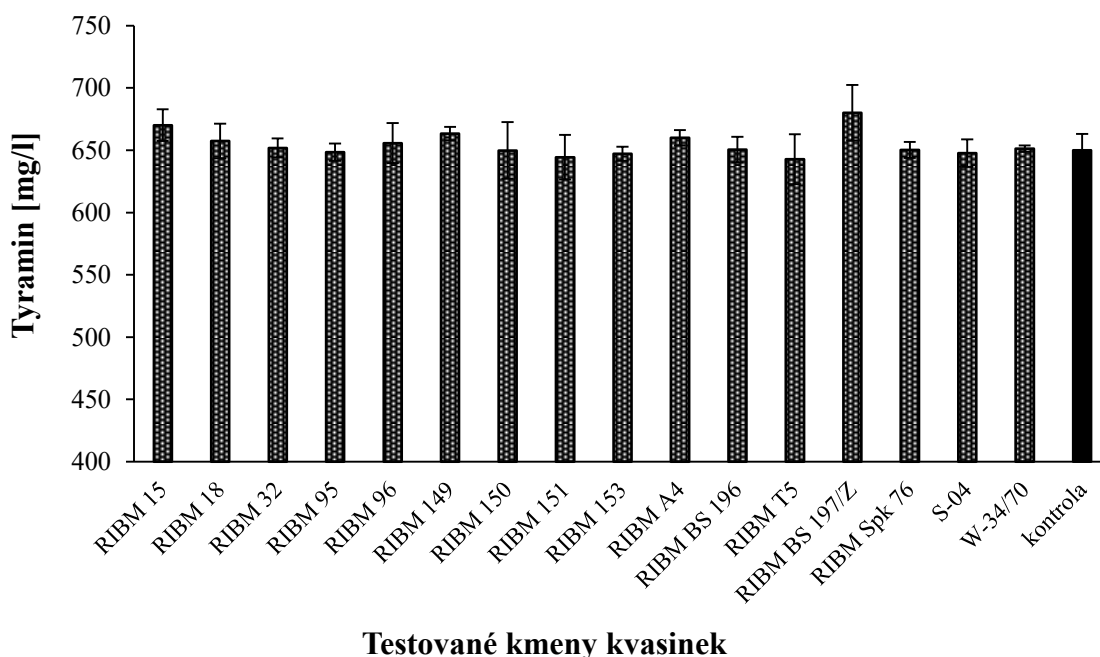
Obsah tyraminu byl ve vzorcích snížen oproti kontrole po kultivaci kmenů RIBM 2-72, RIBM 2-98, RIBM 2-111, RIBM 2-93 a RIBM 70 o 15,8–40,1 mg/l. Současně byla detekována produkce tyraminu o 28,2 a 33,9 mg/l kmeny RIBM 2-9 a RIBM 2-20, které i v ostatních testech projevily svou mohutnou tyrozindekarboxylázovou aktivitu. Grafické znázornění koncentrací tyraminu po kultivaci laktobacilů v testovaném médiu je uvedeno na obrázku 9.



Obr. 9 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničným extraktem

Oproti laktobacilům nedošlo během kultivace kvasničných kmenů k výraznějším odchylkám v koncentraci tyraminu v porovnání s kontrolou. Hladiny tyraminu v rámci souboru testovaných kmenů kolísaly od -7,3 mg/l do 30,0 mg/l, maximální zjištěné přírůstky však nemohou být vzhledem ke stanoveným směrodatným odchylkám považovány za významné (Obr. 10). Z uvedeného vyplývá, že kvasinky vzhledem k nízkému obsahu živin v daném prostředí neprojevily svou potenciální tyrozindekarboxylázovou aktivitu, pravděpodobně pro zachování metabolické aktivity a získání energie využily kvasničný extrakt a nikoliv přidaný tyramin, který by tak mohl podléhat degradaci.

Kultivace kvasinek i laktobacilů za standardizovaných podmínek při 30 °C po dobu 72 hodin umožnila v minerálním médiu detekci sperminu a spermidinu do 1,4 mg/l (Příloha PIII).



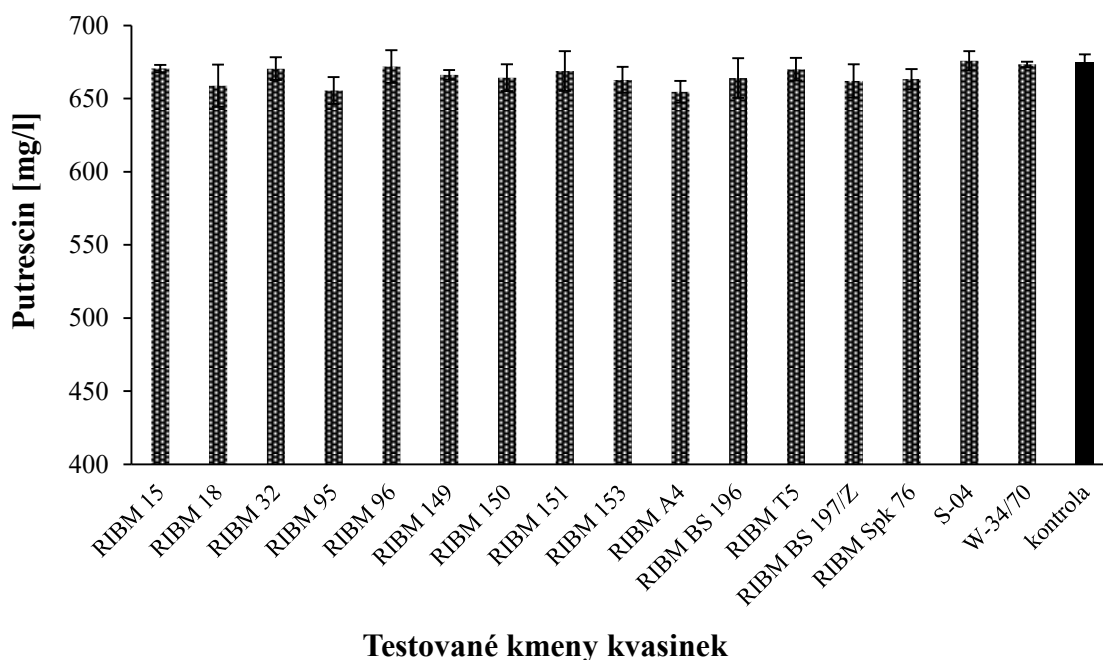
Obr. 10 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničným extraktem

7.4 Minerální médium suplementované vybranými BA

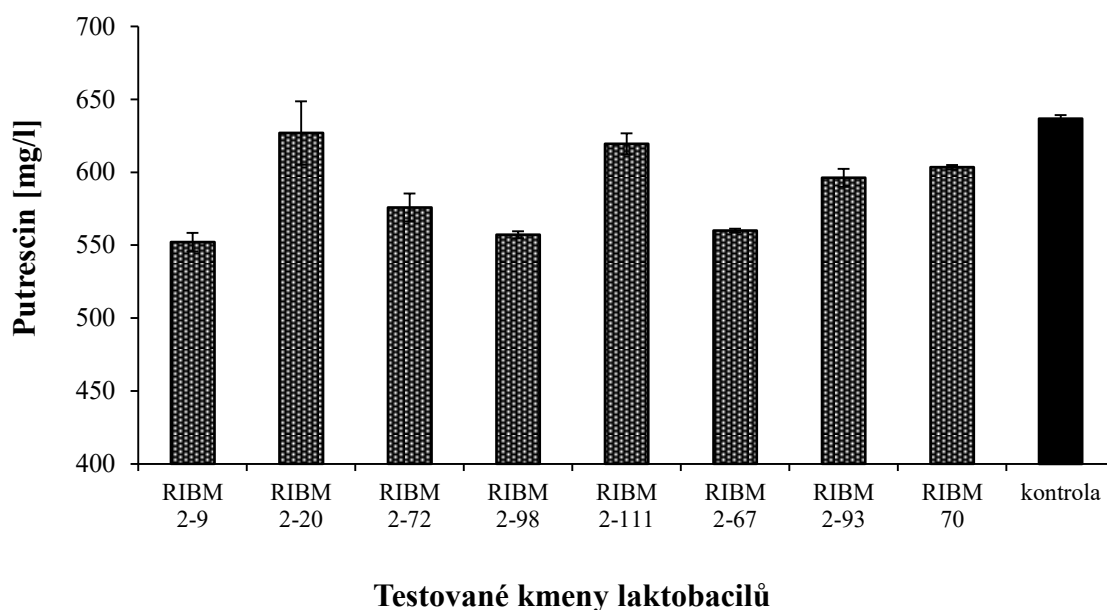
Po kultivaci kvasinek a laktobacilů v minerálním médiu suplementovaném putrescinem, histaminem a tyraminem nebyl detekován tryptamin, fenyletylamin ani kadaverin. V případě kvasinek byly detekovány nízké hladiny sperminu a spermidinu do 1,3 mg/l (Příloha PIV). V důsledku metabolické aktivity inokulovaných mikroorganismů došlo v médiu ke snížení hladiny putrescinu – *Lb. brevis* RIBM 2-67 snížil jeho obsah

o 76,9 mg/l (Obr. 12), kvasničné kmeny RIBM 95 a RIBM A4 degradovaly koncentraci tohoto aminu o téměř 20,2 mg/l (Obr. 11). Jsou-li však po kultivaci kvasinek vzaty v úvahu případné odchylky koncentrace, degradace tohoto aminu nedosáhla významných hodnot převyšujících 10 mg/l.

V nutričně chudém prostředí, které právě minerální médium reprezentuje, mají mikroorganismy pro zachování své metabolické aktivity k dispozici pouze velmi omezené zdroje energie. Potenciální degradaci BA a PA je tedy možné vysvětlit vstupem těchto látek do metabolických drah mikroorganismů z důvodu absence ostatních nízkomolekulárních substancí potenciálně vhodných k látkové přeměně.

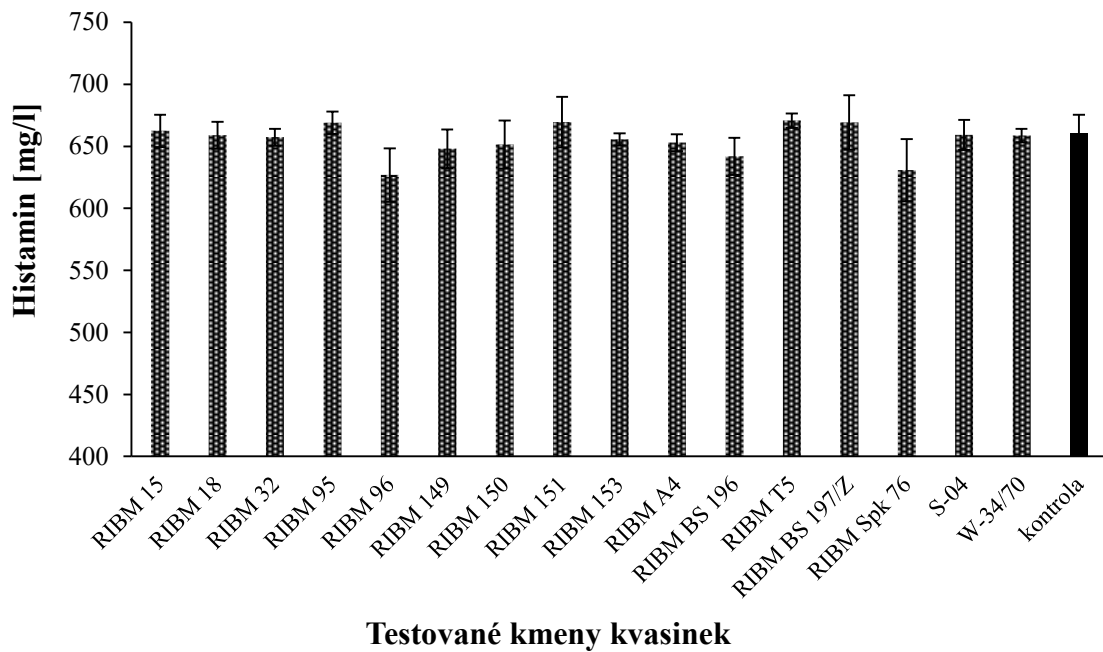


Obr. 11 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA

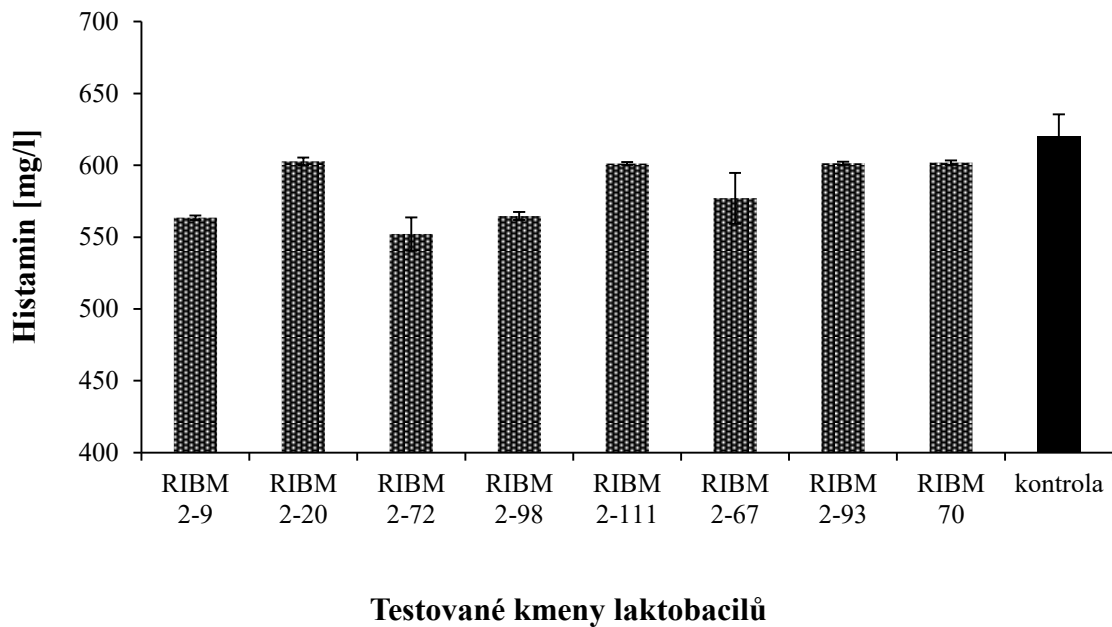


Obr. 12 Obsah putrescinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA

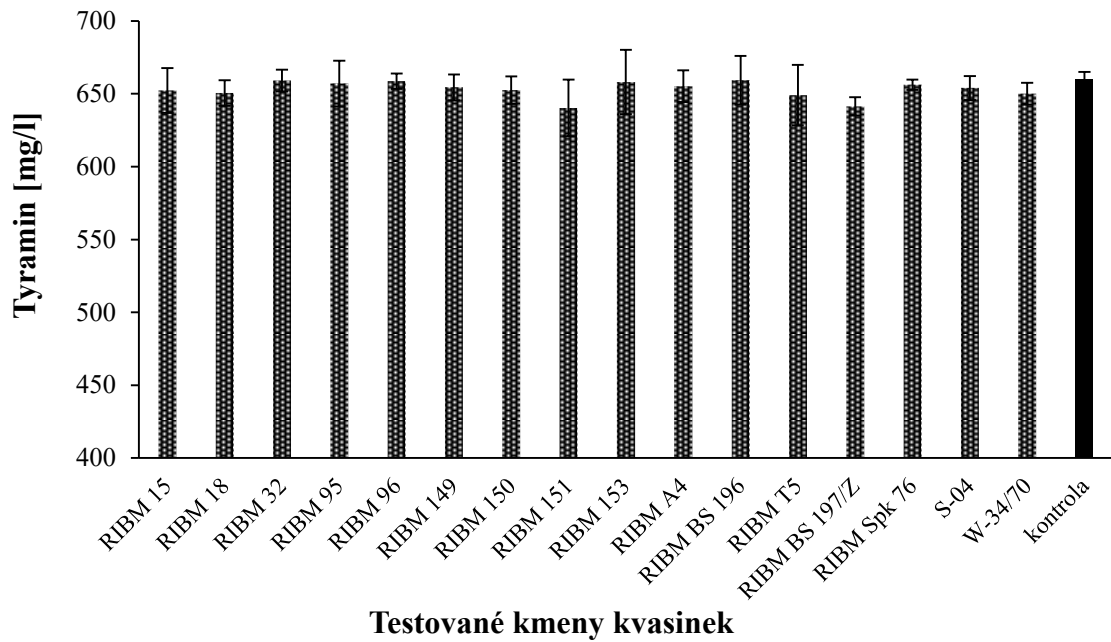
Jak je patrné z obrázků 13–16, některé testované kmeny kvasinek a laktobacilů způsobily také mírný pokles hodnot histaminu a tyraminu v porovnání s kontrolou. Ostatní kmeny nevykazovaly významnější produkci či degradaci těchto BA a PA, což lze usuzovat z relativně neměnných hladin histaminu a tyraminu vůči kontrole. Intenzivní odbourávání histaminu o bezmála 34 mg/l vykazoval pouze kvasničný kmen RIBM 96 a RIBM Spk 76, vzhledem ke stanoveným směrodatným odchylkám však tyto údaje nelze považovat za klíčové. Značnou degradaci histaminu o 68,5 mg/l projevil také kmen *Lb. brevis* RIBM 2-72. Po kultivaci kvasinek nebyly zpozorovány zásadní změny v koncentraci tyraminu, nejmarkantnějšího vychýlení hodnot o 18,2 mg/l bylo dosaženo kmenem RIBM BS 197/Z. Je-li však vzata v úvahu zjištěná směrodatná odchylka, nedosahuje tento výsledek statisticky významných rozměrů. Téměř všechny testované kmeny laktobacilů snížily množství tyraminu v médiu o přibližně 75 mg/l, pouze u kmene RIBM 2-111 nebyla vůči kontrole pozorována změna.



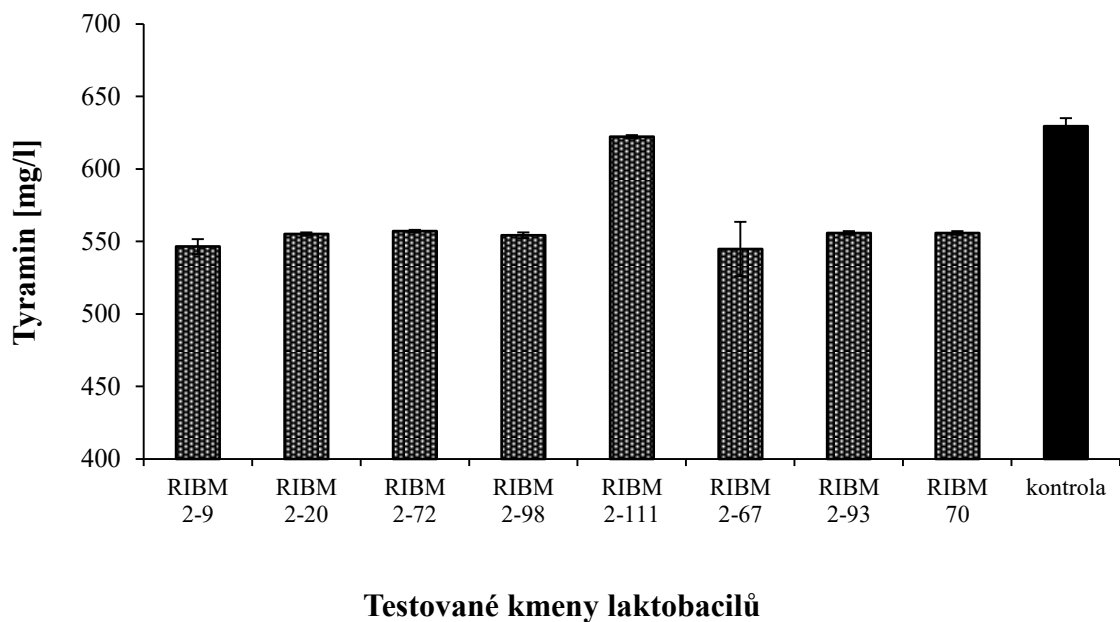
Obr. 13 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA



Obr. 14 Obsah histaminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA



Obr. 15 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA

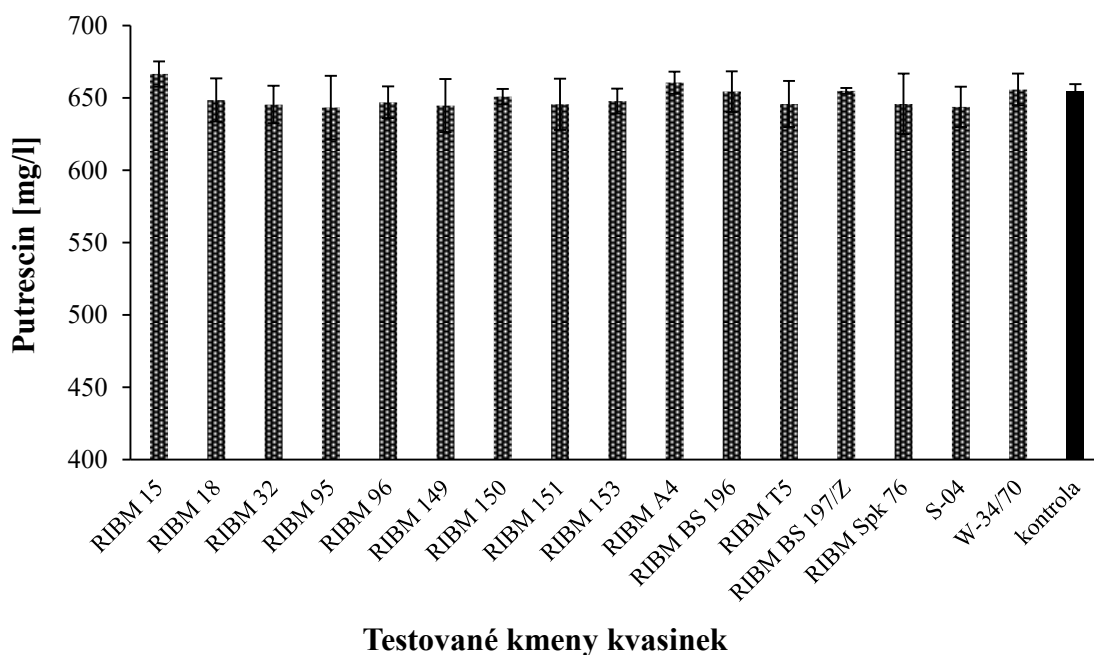


Obr. 16 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA

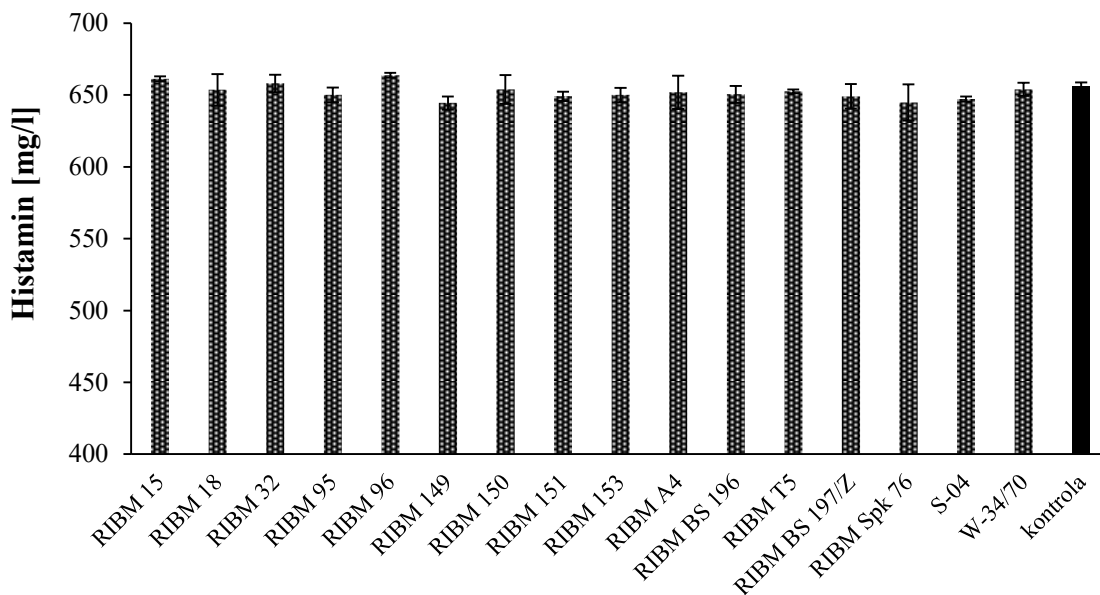
7.5 Minerální médium suplementované vybranými BA a kvasničným extraktem

V minerálním médiu suplementovaném putrescinem, histaminem, tyraminem a zdrojem nutrientů ve formě kvasničného extraktu došlo po kultivaci kvasinek a laktobacilů k nepatrnému nárůstu koncentrace sperminu do 4,3 mg/l a spermidinu do 2,5 mg/l. V supernatantech nebyl po kultivaci testovaných kmenů detekován fenyletylamin ani kaverin, pouze u několika kmenů kvasinek byl zpozorován nárůst obsahu tryptaminu do 3,5 mg/l (Příloha PV).

Velmi vyrovnané výsledky koncentrace putrescinu a histaminu podala data získaná kultivací kvasinek. Z obrázků 17 a 18 je zřejmé vychýlení hodnot putrescinu i histaminu ± 12 mg/l, můžeme se tedy domnívat, že mikroorganismy pro svůj metabolismus upřednostnily přítomný kvasničný extrakt před suplementovanými BA.



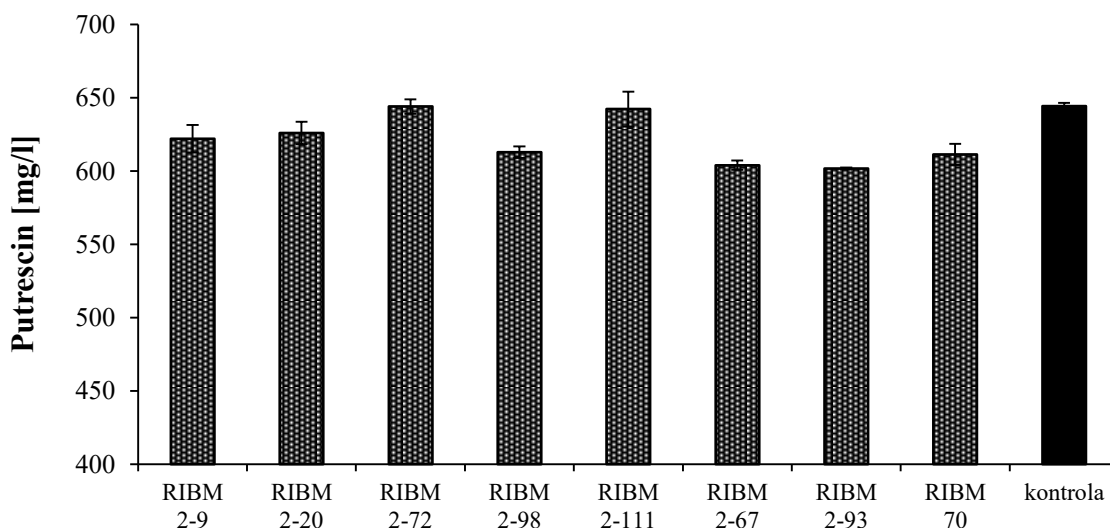
Obr. 17 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem



Testované kmeny kvasinek

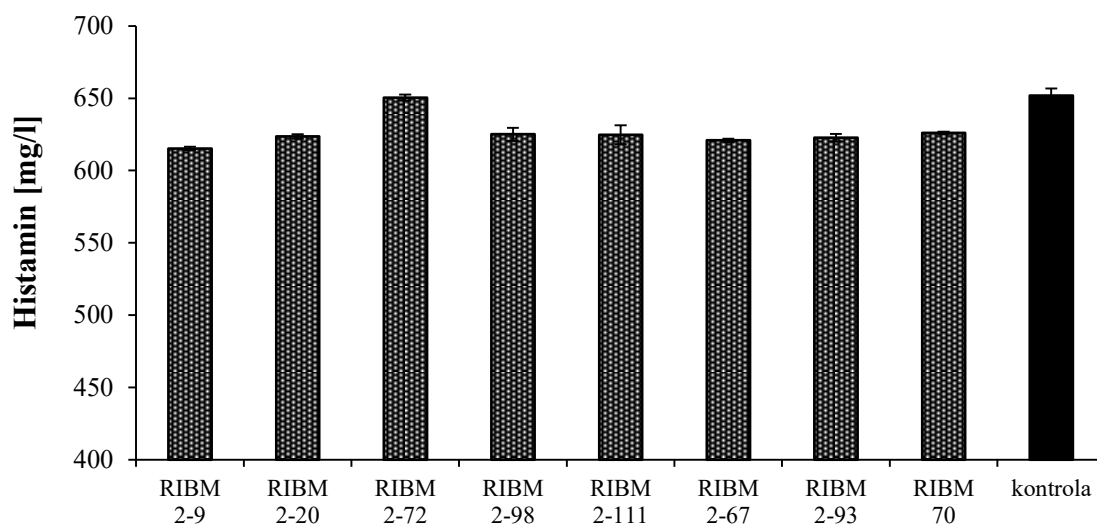
Obr. 18 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničním extraktem

Oproti kvasničním kmenům byl po kultivaci laktobacilů zjištěn pokles koncentrace putrescinu o 18,4–42,5 mg/l (Obr. 19) a histaminu o 25,9–36,6 mg/l (Obr. 20). Téměř nulová odchylka v obsahu putrescinu byla detekována u kmenů RIBM 2-72 a RIBM 2-111, u histaminu se jednalo taktéž o kmen RIBM 2-72.



Testované kmeny laktobacilů

Obr. 19 Obsah putrescinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničním extraktem

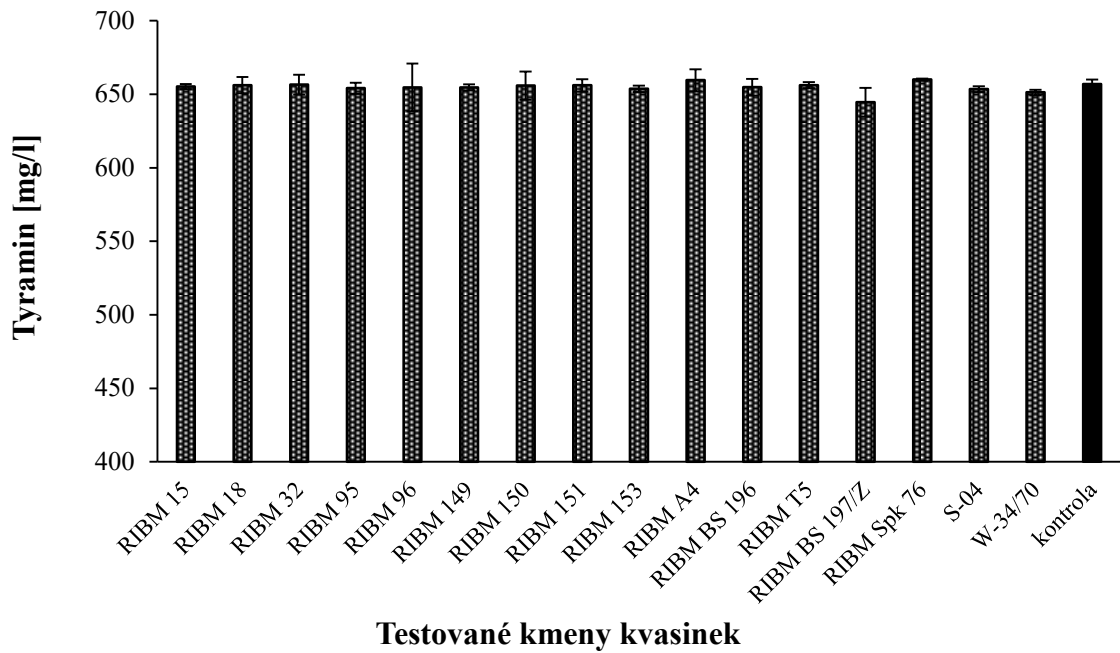


Testované kmeny laktobacilů

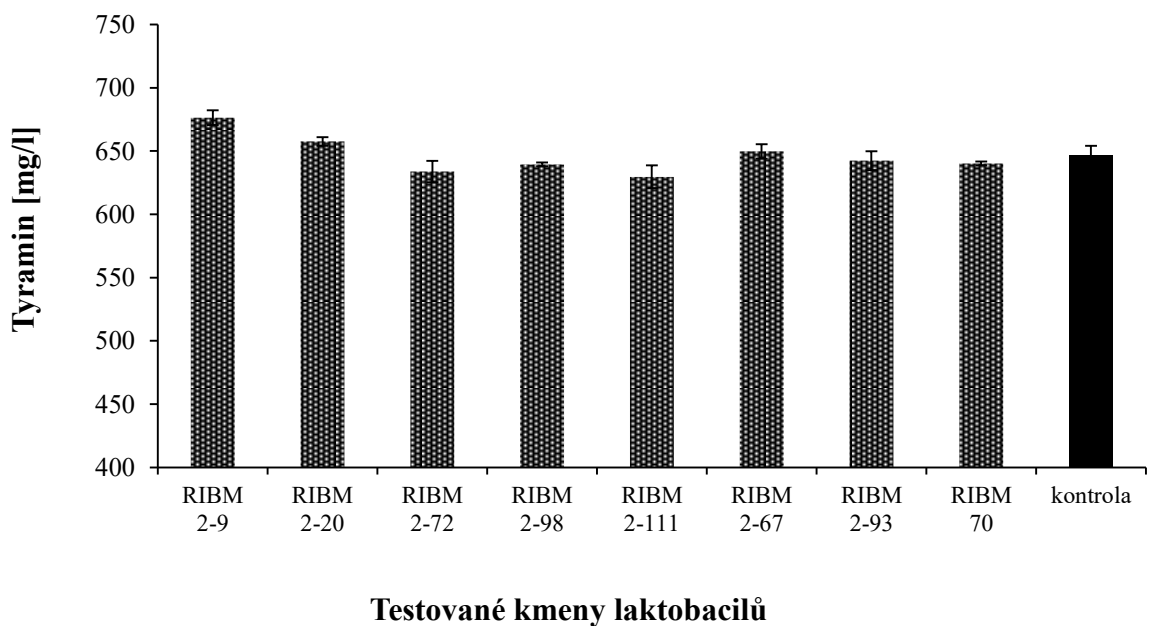
Obr. 20 Obsah histaminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničním extraktem

Během kultivace kvasinek v minerálním médiu s vybranými BA a kvasničním extraktem nedošlo, obdobně jako u putrescinu a histaminu, ke zřetelnější produkci či degradaci tyraminu. Pouze kmen RIBM BS 197/Z vykazoval degradaci tyraminu o 12,2 mg/l oproti kontrole. Intenzivnější snížení obsahu tyraminu bylo u téhož kmene prokázáno i po kultivaci v minerálním médiu suplementovaném BA.

Ve srovnání s kvasinkami byly u laktobacilů stanoveny zřetelné mezikmenové rozdíly v produkci a degradaci tyraminu. V porovnání s kontrolou došlo během kultivace kmenů RIBM 2-9 a RIBM 2-20 k navýšení obsahu tyraminu o 29,7 mg/l a 10,7 mg/l. Kolísavé hodnoty tyraminu ± 5 mg/l byly detekovány u kmenů RIBM 2-67 a RIBM 2-93. Mírnou degradací do 17,1 mg/l vykazovaly kmeny RIBM 2-72 a RIBM 2-111 (Obr. 22).



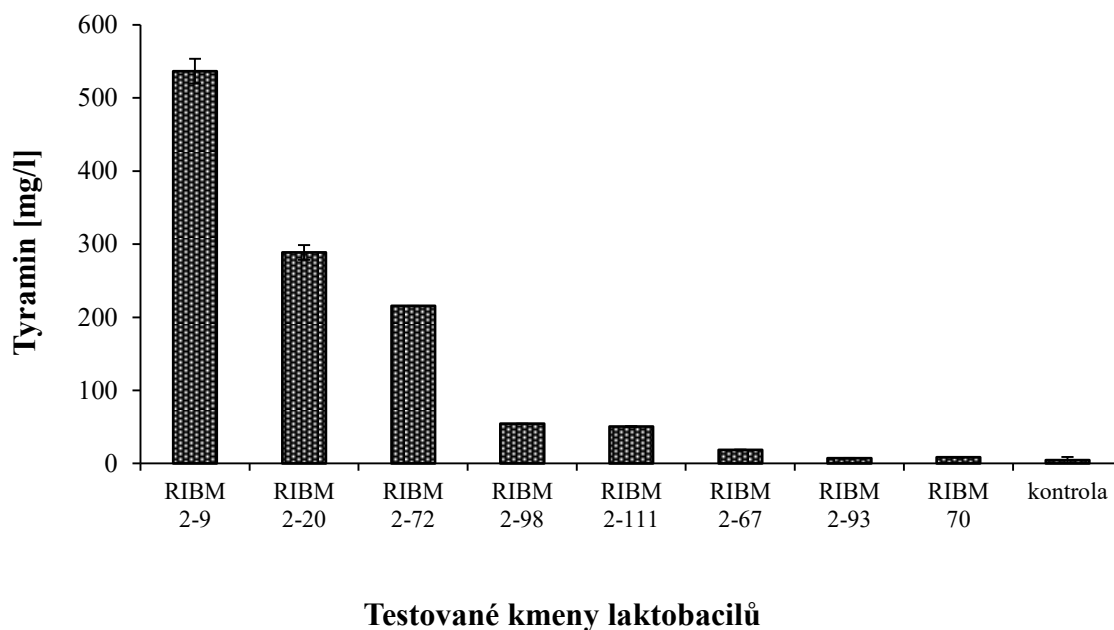
Obr. 21 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničním extraktem



Obr. 22 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničním extraktem

7.6 Živné médium suplementované aminokyselinami

V živném médiu s aminokyselinami v koncentraci 3 g/l nebyly po kultivaci kvasinek detekovány koncentrace fenyletylaminu a kadaverinu, v případě laktobacilů nebyl detekován ani tryptamin, putrescin či histamin. Tyto údaje korespondují s výsledky získanými po kultivaci laktobacilů v živných médiích se suplementací BA, kdy byla zpozorována silně limitující produkce BA. Naopak hodnoty tyraminu se po kultivaci laktobacilů v živném médiu s přidanými aminokyselinami téměř zdvojnásobily oproti témuž médiu obohacenému BA. Z obrázku 23 je zjevné, že kmen RIBM 2-9 byl schopný vyprodukovat 532,1 mg/l tyraminu a kmeny RIBM 2-20 a RIBM 2-72 daly vzniku 284,1 mg/l a 210,9 mg/l tyraminu. Lze tedy usuzovat, že přidavek prekurzorů ve formě aminokyselin může podpořit přirozeně výraznou dekarboxylázovou aktivitu laktobacilů.

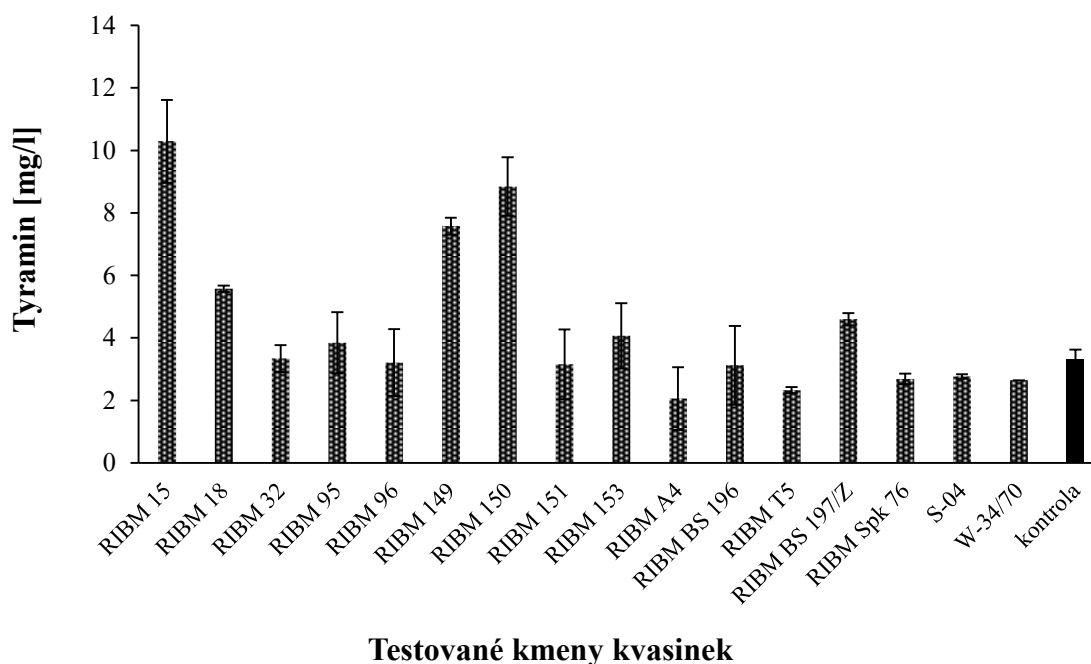


Obr. 23 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném aminokyselinami

U kvasinek bylo detekováno navýšení koncentrace tryptaminu do 5,5 mg/l, putrescinu do 3,8 mg/l a histaminu do 2,7 mg/l (Příloha PVI). Můžeme se domnívat, že přirozeně nízkou dekarboxylázovou aktivitu kvasinek přidavek prekurzorů v podobě aminokyselin výrazně neovlivňuje, neboť obdobné hodnoty byly získány po kultivaci těchto kmenů v živném médiu obohaceném vybranými BA.

Nárůst obsahu tyraminu po kultivaci kvasinek v médiu obohaceném aminokyselinami byl zaznamenán u kmenů RIBM 15, RIBM 149 a RIBM 150. Jednalo se o navýšení do 10 mg/l, které je zobrazeno na obrázku 24. Vzhledem k relativně nízkému přírůstku koncentrace tyraminu se však vliv přidavku aminokyselin zdá být v případě kvasinek minoritní.

U kvasinek i laktobacilů došlo po kultivaci také k nepatrnému nárůstu obsahu spermidinu do 3,3 mg/l, koncentrace sperminu dosahovala místy až 15,6 mg/l (Příloha PVI).

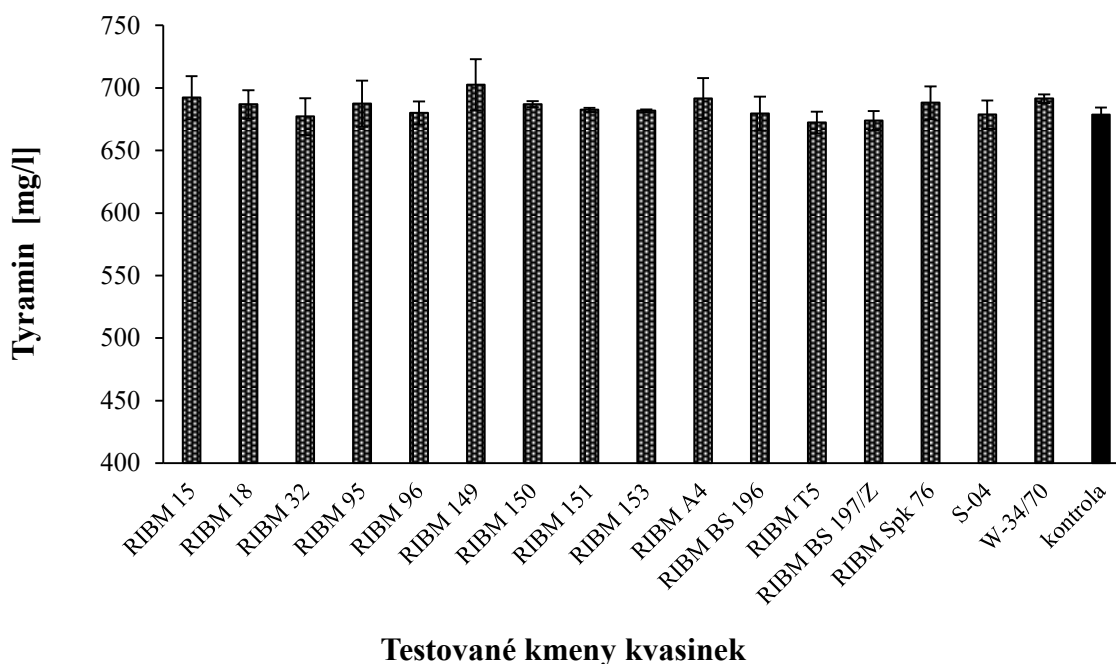


Obr. 24 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami

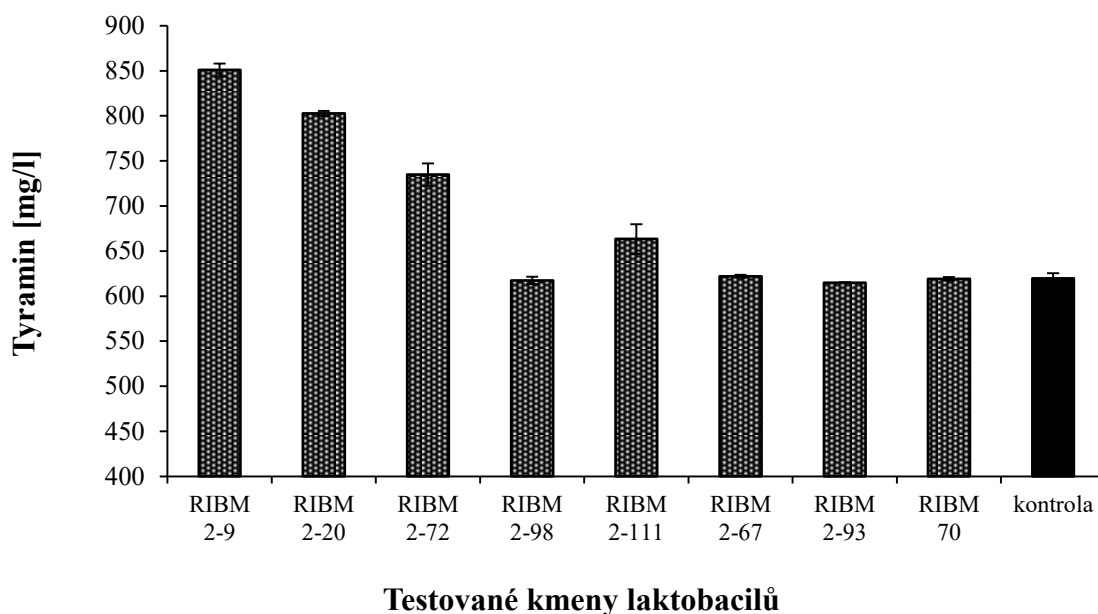
7.7 Živné médium suplementované tyraminem

V živném médiu MALT suplementovaném tyraminem byla po kultivaci některých kmenů zaznamenána nízká hladina tryptaminu do 3,3 mg/l, histaminu do 4,0 mg/l a putrescinu do 3,3 mg/l (příloha PVII). Médium nevykazovalo přítomnost fenyletylaminu ani kadaverinu. V půdě MRS obohacené tyraminem nebyla produkce žádného z výše zmíněných BA testovanými kmeny laktobacilů detekována. V obou suplementovaných médiích MALT i MRS byly zjištěny kolísavé nízké hladiny sperminu a spermidinu do 3,4 mg/l (Příloha PVII).

Po kultivaci kmenů kvasinek byly v supernatantech zaznamenány velmi vyrovnané koncentrace tyraminu. Zřetelnějšího navýšení koncentrace tohoto BA bylo dosaženo pouze u kvasničního kmene RIBM 149, které nepřesáhlo 24 mg/l (Obr. 25). Vzhledem ke stanovené směrodatné odchylce však tento údaj nelze považovat za statisticky významný. Ze získaných dat tak nelze usuzovat na prokazatelně významnou produkci či degradaci tyraminu kvasničními kmeny. Odlišné výsledky poskytla analýza média po kultivaci testovaných laktobacilů, které vykazovaly značnou produkci tyraminu. Jednalo se zejména o kmeny RIBM 2-9, RIBM 2-20 a RIBM 2-72, které navýšily množství tyraminu až o 231,2 mg/l (Obr. 26). Lze se tedy domnívat, že by dostatečné množství živin v nutričně bohatém médiu MRS mohlo podpořit dekarboxylázovou aktivitu daných mikroorganismů a zvýšit obsah BA a PA, a to i v případě již existujících vysokých koncentrací těchto dusíkatých látek.



Obr. 25 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem

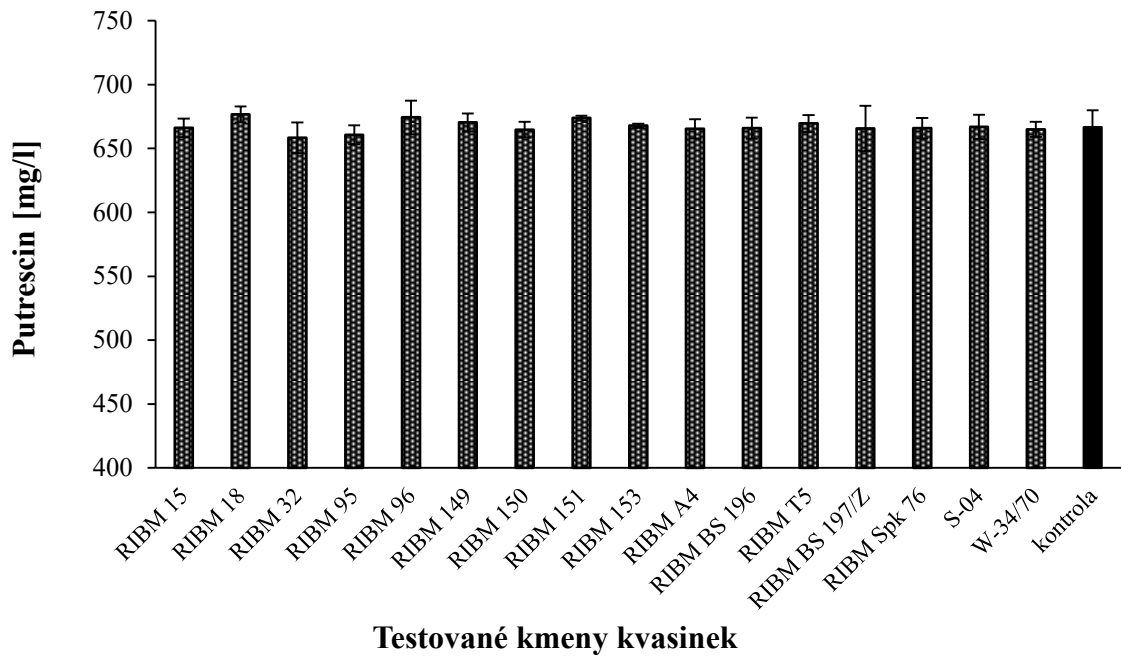


Obr. 26 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném tyraminem

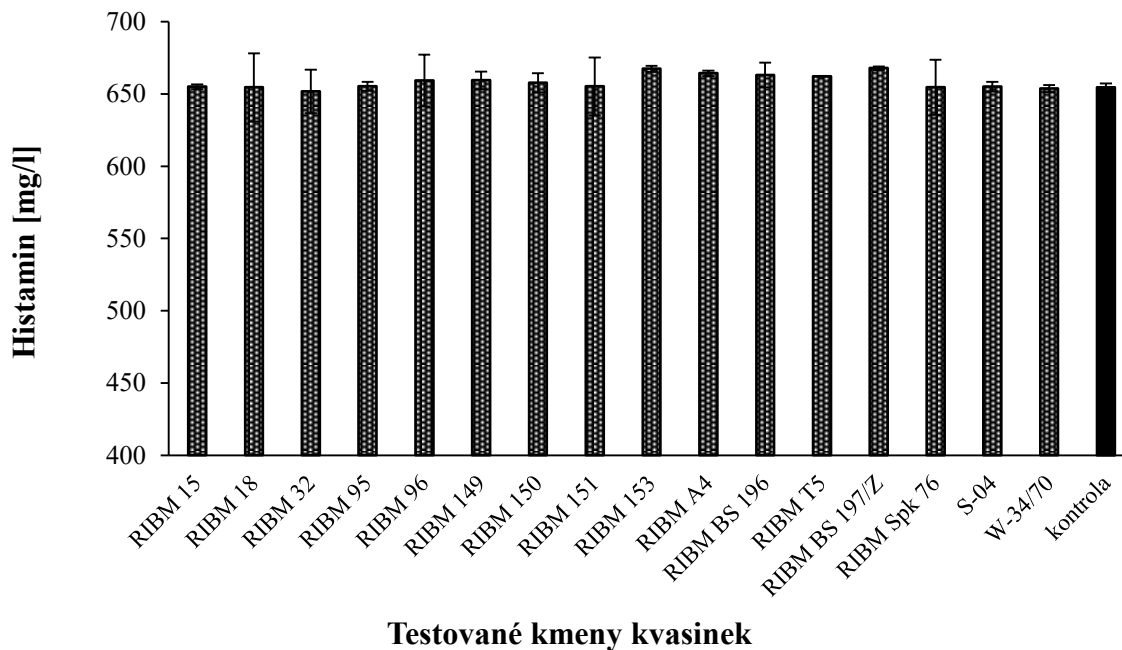
7.8 Živné médium suplementované vybranými BA

Kmeny pivovarských kvasnic nevykazovaly po kultivaci v MALT médiu suplementovaném tyraminem, histaminem a putrescinem dekarboxylázovou aktivitu spojenou s produkcí fenyletylaminu ani kadaverinu. Stejné chování bylo detekováno i u laktobacilů. Kmeny pivovarských kvasnic daly oproti laktobacilům vzniku 3,3 mg/l tryptaminu. U kvasinek i laktobacilů bylo navíc po kultivaci zaznamenáno v příslušných médiích mírné navýšení obsahu sperminu a spermidinu, a to v koncentraci nepřevyšující 2,8 mg/l (Příloha VIII).

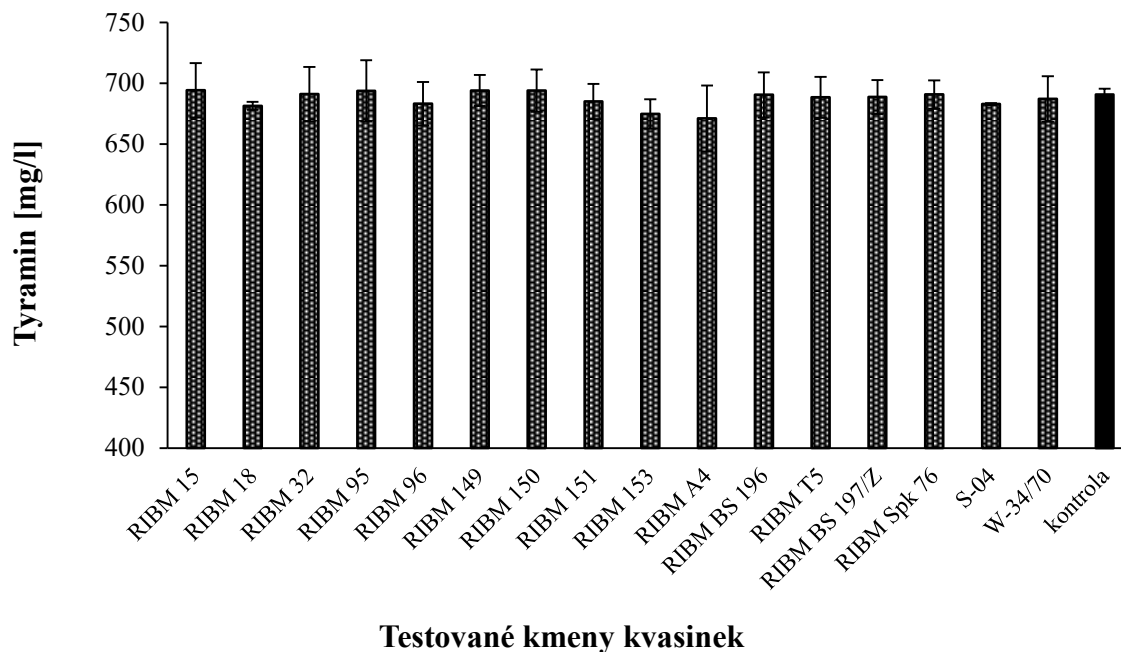
Z níže uvedených grafů je patrné, že po kultivaci kvasinek v živném médiu s přísadkou vybraných BA byl vůči kontrole prokázán poměrně stabilní obsah putrescinu, histaminu i tyraminu. Na obrázku 27 lze vidět vychýlení hodnot putrescinu vůči kontrole do 10 mg/l, obrázek 28 pak znázorňuje přírůstek histaminu do 13,2 mg/l. Tyto výsledky korespondují s daty získanými kultivací testovaných mikroorganismů v živném médiu s přísadkou tyraminu, kdy došlo k nepatrnému navýšení obsahu putrescinu a histaminu do 4 mg/l. Koncentrace tyraminu v médiu s obsahem vybraných BA (obr. 29) kolísala ve srovnání s kontrolou od -19,7 do 3,5 mg/l, vzhledem ke stanoveným směrodatným odchylkám však nelze hovořit o prokazatelném přírůstku či úbytku množství tohoto aminu.



Obr. 27 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA

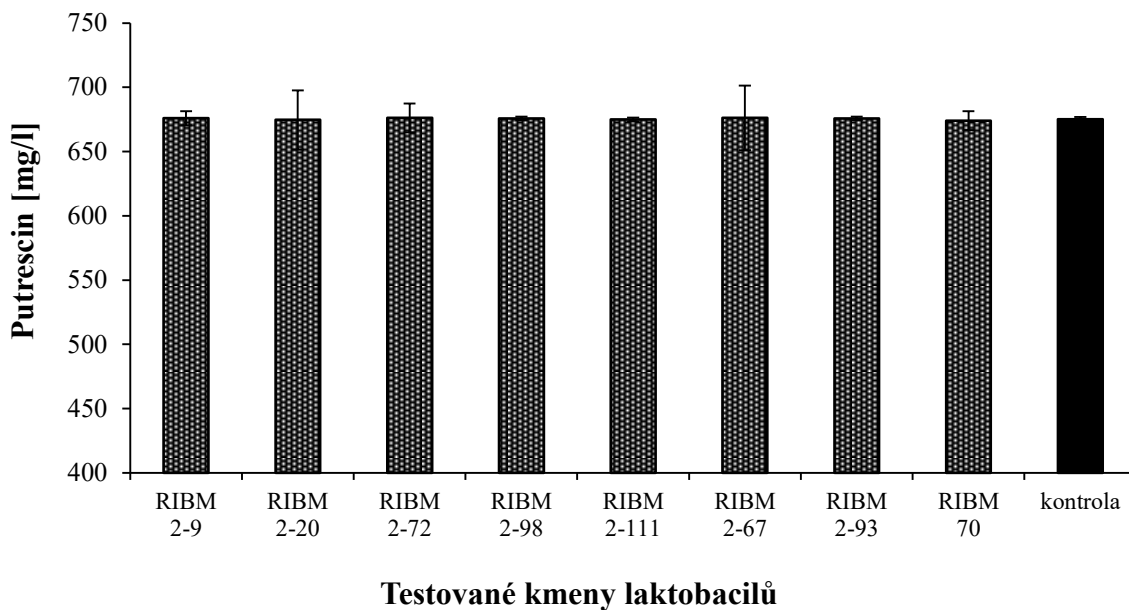


Obr. 28 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA

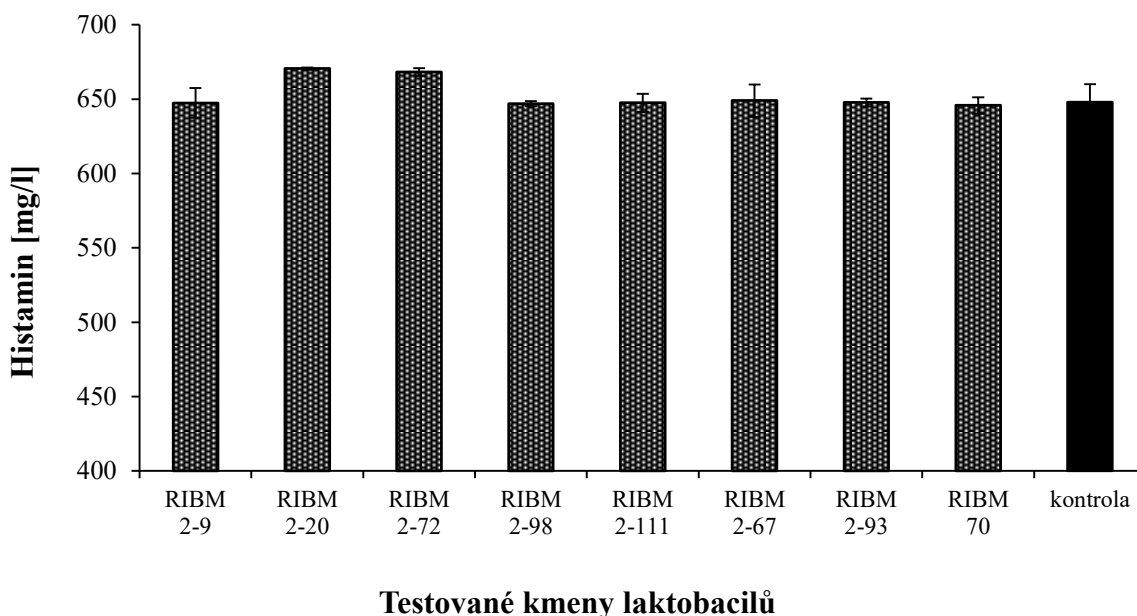


Obr. 29 Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA

Po kultivaci laktobacilů v médiu MRS se suplementací vybraných BA nebyla zaznamenána žádná změna koncentrace putrescinu (Obr. 30) a histaminu, pouze mírný nárůst obsahu histaminu do 22,5 mg/l u kmenů RIBM 2-20 a RIBM 2-72 (Obr. 31). Stejně výsledky podalo i vyhodnocování dat získaných po kultivaci laktobacilů v MRS médiu suplementovaném tyraminem, kdy nebyla zaznamenána žádná změna koncentrace putrescinu ani histaminu. Lze se tedy domnívat, že laktobacily nedisponují významnější ornitindekarboxylázovou aktivitou a pouze kmeny RIBM 2-20 a RIBM 2-72 jsou schopné omezené produkce histaminu.



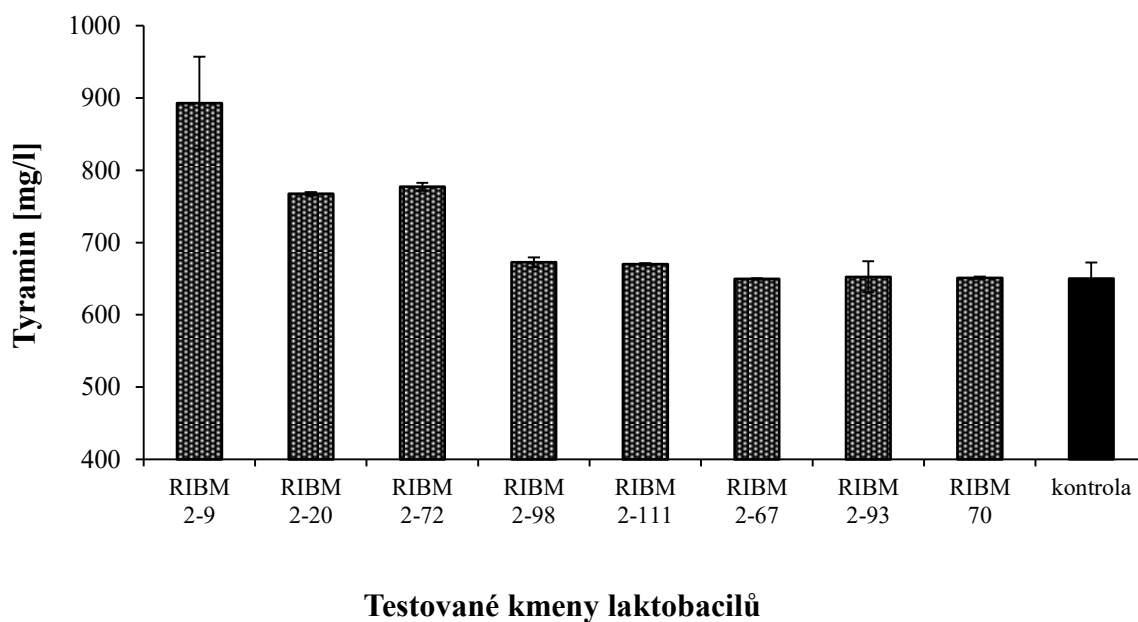
Obr. 30 Obsah putrescinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA



Obr. 31 Obsah histaminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA

Na rozdíl od předcházejících BA byla po 72 hodinové kultivaci laktobacilů v živném médiu zaznamenána značná produkce tyraminu, a to až 240 mg/l. Tuto produkci vykazoval kmen RIBM 2-9, zvýšené hodnoty do 120 mg/l byly detekovány také u kmenů RIBM 2-20 a RIBM 2-72 (Obr. 32). Obdobně výrazná tyrozindekarboxylázová aktivita

se již u daných kmenů projevila, a to po kultivaci v nutričně bohatém MRS médiu obohaceném tyraminem (Obr. 26) a MRS médiu obohaceném amionokyselinami (Obr. 23). Na základě těchto výsledků je možné tvrdit, že testované laktobacily v prostředí s dostatečnou zásobou živin prokazatelně produkují významné koncentrace tyraminu, které mohou pro zdraví člověka představovat riziko.



Obr. 32 Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA

8 DISKUZE

Znalost obsahu cizorodých látek v potravinách, včetně BA a PA, je v posledních letech spotřebitelem vnímána jako nedílná součást jakostního produktu (Rodriguez et al, 2014). Je obecně známo, že konzumace nadměrných množství BA a PA může vést k závažným zdravotním obtížím v podobě kolísavého krevního tlaku, nevolnosti, výkyvů srdečního rytmu anebo ztíženého dýchání (Russo et al., 2010). Ačkoliv mnohé potraviny a nápoje, vyrobené především procesem fermentace, mohou toxikologicky riziková množství BA a PA obsahovat, české ani evropské legislativní předpisy jejich koncentrace ve většině případů nijak neregulují (Česká republika, 1997a; Evropská Unie, 2005).

Třebaže je většina mikrobiální činnosti v procesu výroby piva považována za žádoucí, část může z hlediska kvality výrobku představovat hrozbu. Je totiž prokázáno, že s ní souvisí přítomnost výše zmíněných BA a PA. Znalost zastoupení mikroorganismů a jejich vlastností by však mohla výrobcům umožnit monitoring a řízení obsahu těchto cizorodých látek vedoucí k produkci bezpečného výrobku. Existuje sice řada českých i zahraničních studií zabývajících se koncentrací BA a PA v pivu coby konečném produktu, výzkumů sledujících roli specifických mikroorganismů v průběhu jeho výroby je však nedostatek (Baumlisberger et al., 2015; Bokulich a Bamforth, 2013; Caruso et al., 2002; Costantini et al., 2009; Van Nierop et al., 2006). Proto se tato diplomová práce věnuje sledování schopnosti vybraných kvasničných kmenů i laktobacilů BA a PA produkovat nebo degradovat, v pilotní etapě za podmínek *in vitro*.

Záměrem práce bylo stanovit dekarboxylázovou aktivitu pivovarsky významných vybraných mikroorganismů. Pozornost byla zaměřena na několik kmenů laktobacilů, u nichž bylo záměrem určit schopnost produkce BA/PA v prostředí s různou dostupností živin. Hlavním cílem však bylo stanovit schopnost produkce či degradace těchto dusíkatých látek kvasničnými kmeny, přičemž v případě produkce > 10 mg/l by se jednalo o negativní parametr v rámci volby vhodného kmene pro výrobu piva. Dílčím cílem bylo zjistit, zda budou některé kvasinky schopné využít tyramin, putrescin anebo histamin jako zdroj dusíku a jejich koncentraci v různě suplementovaných médiích, zvláště těch nutričně chudších, snižovat. Kvasničné kmeny, které by v živných médiích neprodukovaly významné množství BA/PA a v minerálním médiu měly naopak tendence obsah BA/PA snižovat, by mohly být doporučeny pro fermentaci piva a pro delší ležení piva v ležáckých tancích.

Monitoring dekarboxylázové aktivity a degradace BA a PA byl proveden u 16 kmenů kvasinek a 8 kmenů laktobacilů získaných od Ústavu sladařského a pivovarského v Praze za podmínek *in vitro*, byl sledován obsah sedmi BA (tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermin, spermidin). V experimentu bylo použito několik variant nutričně chudého minerálního média i nutričně bohatého MALT a MRS média. Nutriční prostředí sloužilo k testování dekarboxylázové aktivity mikroorganismů v optimálních podmínkách. Nepřívětivé prostředí minerálního média umožnilo stanovit schopnost mikroorganismů degradovat přítomné BA/PA, případně jejich způsobilost pro produkci za využití živin z autolyzované biomasy. V médiích s přidavkem aminokyseliny byla testovaná role prekurzorů v produkci těchto dusíkatých substancí.

V žádném z použitých médií nebyla po kultivaci kvasničných kmenů prokázána přítomnost fenyletylaminu ani kadaverinu, k podobným závěrům dospěla i Haasová (2016). Jelikož výskyt těchto BA v pivu bývá přičítán zejména procesu sladování (Izquierdo-Pulido, 1994), je možné potenciální fenylalanindekarboxylázovou a lyzindekarboxylázovou aktivitu kvasinek vyloučit. Ani po kultivaci vybraných laktobacilů nebyly zjištěny hladiny fenyletylaminu, kadaverinu a tryptaminu. Nedetekovatelné koncentrace fenyletylaminu a tryptaminu po kultivaci vybraných laktobacilů potvrzuje i studie provedená Lorencovou (2015), která však prokázala pouze nízké hladiny kadaverinu do 6,3 mg/l (Lorencová, 2015).

Získané výsledky poukazují na slabou produkci tryptaminu některými kmeny kvasinek. Hladiny kolísající od 3,3 mg/l do 5,5 mg/l tryptaminu byly detekovány po kultivaci kvasinek v prostředí poskytující mikroorganismům alespoň nepatrný zdroj energie v podobě kvasničného extraktu. Zanedbatelnou produkci tryptaminu do 4 mg/l různými kmeny kvasinek uvádí také Caruso et al. (2002). Z dosažených výsledků vyplývá, že ačkoli mohou být určité kmeny kvasinek schopné produkce tryptaminu, jeho nízké koncentrace nemohou kýžený produkt či zdravý spotřebitele negativně ovlivnit.

Nízké koncentrace putrescinu do 6 mg/l v pivu byly doposud přisuzovány zejména sladu, přičemž jeho zdrojem může být již samotný ječmen (Izquierdo-Pulido, 1996b). Vzhledem ke schopnosti putrescinu zesilovat toxické účinky histaminu a tyraminu (Mayer, Fiechter a Fischer, 2010) je znalost nakládání kvasinek a laktobacilů s tímto aminem zcela zásadní. Výsledky experimentu dokládají, že v průběhu kultivace laktobacilů nedošlo k produkci putrescinu, ba naopak v minerálních médiích s jeho suplementací došlo místy k poklesu koncentrace o téměř 76,9 mg/l. V ekvivalentně suplementovaném živném médiu

zůstalo po kultivaci laktobacilů množství putrescinu nezměněné. Tato skutečnost může vést k myšlence, že laktobacily jsou schopné v prostředí s omezenou dostupností živin snižovat množství putrescinu. Laktobacily tedy nepředstavují z hlediska nárůstu koncentrace tohoto BA hrozbu, což potvrzuje i studie Lorencové (2015) a závěrečná práce Mandové (2015).

Na rozdíl od laktobacilů neprokázaly kvasničné kmeny výraznou schopnost produkce či degradace putrescinu. Analýza médií suplementovaných aminokyselinami dokládá nízké přírůstky do 4 mg/l putrescinu, podobné údaje byly získány i po kultivaci některých kmenů kvasinek v médiích s tyraminem a kvasničným extraktem. Shodné koncentrace po kultivaci kvasinek prezentuje i Caruso et al. (2002). Naopak Halász et al. (1994, 1998) detekoval hladiny putrescinu v rozmezí 25–55 mg/l, a prokázal tak významnější dekarboxylázovou aktivitu pivovarských kvasnic. Tato práce nemůže Halászovo tvrzení dosvědčit nebo vyvrátit, neboť ani analýza médií suplementovaných vybranými BA/PA nedokládá zřetelný nárůst či pokles koncentrace putrescinu.

Spermin a spermidin představují PA mající nezastupitelnou roli při buněčném dělení, jejich přítomnost je tedy pro optimální růst kvasinek zcela zásadní. To potvrzují i výsledky tohoto výzkumu, kdy byla u více než poloviny testovaných kmenů kvasinek i laktobacilů zaznamenána nízká produkce sperminu a spermidinu do 5,1 mg/l. Naproti tomu výzkum provedený Halászem et al. (1994, 1998) poukazuje na poměrně vysoká množství spermidinu (189 mg/100g) a sperminu (56 mg/100g) vyprodukovaná pivovarsky významnými kmeny kvasnic. Haasová (2015) však tvrdí, že se tvorba těchto polyaminů v prostředí *in vitro* a v prostředí simulující podmínky piva značně liší, přičemž vyšší produkci lze očekávat právě v prostředí mladiny.

Ercan, Bozkurt a Soysal (2013) v publikaci zmiňují, že během hlavního kvašení a dokvašování piva může vznikat z toxikologického hlediska významné množství tyraminu a histaminu. To potvrzuje i Izquierdo-Pulido (1996a), který ve spontánně kvašených pivech detekoval 21,3 mg/l tyraminu a 5,8 mg/l histaminu. Výsledky tohoto experimentu poukazují na poměrně nevýznamné koncentrace histaminu po kultivaci vybraných kmenů kvasinek. Ve všech typech živných médií byly zaznamenány kolísavé hodnoty ± 13 mg/l histaminu, žádné z minerálních médií neumožnilo spolehlivě prokázat schopnost kvasinek histamin degradovat. Vzhledem ke stanoveným směrodatným odchylkám nebylo možné rozhodnout o jednoznačné produkci či degradaci histaminu, proto by bylo vhodné získané údaje ověřit v dalších experimentech i nekultivačními metodami.

Mezi laktobacily je za histidin-dekarboxyláza pozitivní označován především druh *Lb. buchneri* (Russo et al., 2010), čemuž však výsledky této práce odporují. Ve většině případů nebyla přítomnost histaminu detekována vůbec, po kultivaci testovaných kmenů v prostředí suplementovaném BA došlo spíše k úbytku koncentrace histaminu. Pouze kultivace dvou kmenů *Lb. brevis* RIBM 2-20 a *Lb. brevis* RIBM 2-72 v živném médiu suplementovaném BA podala mírné navýšení koncentrace histaminu do 22,5 mg/l, ostatní mikroorganismy vykazovaly oproti kontrole stabilní obsah tohoto aminu. Tyto výsledky spíše korespondují s daty získanými Lorencovou (2015), která po kultivaci těchto kmenů laktobacilů koncentrace histaminu nedetekovala.

Russo et al. (2010) a Baumlisberger et al. (2015) označují za hlavního producenta tyraminu druh *Lb. brevis*. Analýza provedená v rámci této studie potvrzuje značnou produkci tyraminu kmeny RIBM 2-20 a RIBM 2-72, nejvyšších hodnot tyraminu však bylo dosaženo kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Bylo prokázáno, že dekarboxylázovou aktivitu těchto mikroorganismů výrazně ovlivňuje nejen dostupnost živin, ale také aminokyselin jako prekurzorů. Ke stejným výsledkům dospěla i Mandová (2015), která taktéž potvrzuje nejmohutnější produkci tyraminu kmenem RIBM 2-9. Překvapivě vykazují kmeny zcela odlišné chování v nutričně chudém prostředí, kdy byla většina testovaných mikroorganismů schopná snižovat množství přidaného tyraminu o téměř 116,2 mg/l.

Nejasné výsledky produkce/degradace tyraminu však poskytla analýza kvasničných kmenů. Vzhledem k silně vyrovnaným hodnotám kolísajícím vůči kontrole maximálně ± 30 mg/l a rozsáhlým směrodatným odchylkám nebylo možné rozhodnout o zřetelné produkci či degradaci tohoto BA.

Tvrzení spjatá s dekarboxylázovou aktivitou kvasinek se liší napříč mnoha autory. Například Costantini et al. (2009) dospěl k názoru, že kvasinková kultura *Saccharomyces cerevisiae* není schopná produkce BA a PA, naopak Kalač a Křížek (2003) či Halász et al. (1994) uvádí značný potenciál kvasinek k dekarboxylaci aminokyselin. Tato práce se na základě získaných výsledků nemůže jednoznačně přiklonit ani k jednomu z výše uvedených názorů, z důvodů ne zcela výrazné dekarboxylázové aktivity kvasinek tak není možné stanovit doporučení pro výběr kvasničného kmene pro výrobu piva. K vyvození těchto závěrů by bylo vhodné získaná data potvrdit molekulární analýzou PCR s cílem ověření genetické predispozice mikroorganismů tvořit enzymy účastnící se degradace či produkce BA/PA. Lze doporučit také následné ověření předpokladů v reálném prostředí

mladiny, jelikož složení média zásadně ovlivňuje metabolickou aktivitu mikroorganismů (Halász et al., 1994).

Obsah aminokyselin v prostředí se však zdá být pouze limitujícím faktorem, jelikož po kultivaci kvasinek v prostředí s dostatkem aminokyselin nebyly zaznamenány výraznější odchylky v koncentraci BA/PA. Naopak kultivace laktobacilů v živném médiu s obsahem aminokyselin umožnila u některých kmenů markantní produkci BA/PA. Otázkou zůstává, zdali za předpokladu dodržení podmínek vhodnějších pro rozvoj kvasinek dojde k utlumení dekarboxylázové aktivity laktobacilů, nebo silná produkce BA/PA přetrvává. Mohutná schopnost dekarboxylace vybranými kmeny laktobacilů byla v nutričně bohatém prostředí v této práci potvrzena, překvapivě však byla detekována i výrazná způsobilost těchto kmenů BA/PA v nutričně chudém prostředí degradovat.

9 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala schopností produkce a degradace BA/PA vybranými kmeny kvasinek a laktobacilů získaných od Ústavu pivovarského a sladařského v Praze za podmínek *in vitro*. Současně byl sledován vliv přídavku různých BA a PA do odlišných kultivačních prostředí na degradaci těchto dusíkatých látek a přídavku aminokyselin na produkci BA a PA. Na základě výsledků praktické části diplomové práce lze konstatovat následující:

- U testovaných kmenů *Lb. brevis* RIBM 2-20, *Lb. brevis* RIBM 2-72 a *L. buchneri* RIBM 2-9 byla během screeningu prokázána mohutná schopnost produkce tyraminu za přítomnosti dostatečného množství nutrientů.
- Tyrozindekarboxylázovou aktivitu vybraných kmenů laktobacilů značně podpořila přítomnost tyrozinu coby prekursoru tohoto BA.
- Nedostatek živin v nutričně chudých minerálních médiích vedl k degradaci tyraminu testovanými kmeny laktobacilů.
- Kultivace laktobacilů v prostředí s dostupnými zdroji BA/PA neumožnila průkazné stanovení schopnosti produkce či degradace histaminu a putrescinu.
- Po kultivaci laktobacilů byla detekována toxikologicky nevýznamná produkce sperminu a spermidinu, hladiny tryptaminu, fenyletylaminu a kadaverinu nebyly detekovány vůbec.
- U vybraných kmenů kvasinek nebyla prokázána schopnost produkce fenyletylaminu a kadaverinu, byla zjištěna slabá dekarboxylázová aktivita spojená s toxikologicky nevýznamnými hladinami sperminu a spermidinu.
- Dostatečné množství živin vedlo po kultivaci některých kmenů kvasinek k detekci zanedbatelných koncentrací tryptaminu.
- Byl prokázán limitující vliv přídavku aminokyselin na dekarboxylázovou aktivitu kvasničných kultur.
- Kolísající hladiny putrescinu, histaminu a tyraminu neumožnily jednoznačné stanovení schopnosti kvasinek BA/PA produkovat či degradovat, byly doporučeny doplňující molekulární analýzy.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AFLAKI, F. et al. Biogenic Amine Contents in Non-alcoholic Beers: Screening and Optimization of Derivatization. *Food Analytical Methods*. 2014, roč. 7, č. 3, s. 713 – 720
- ANLI, R. E. et al. Biogenic amine content consumed in Turkey and influence of storage conditions on biogenic amine formation. *Journal of the Institute of Brewing*. 2006, roč. 112, č. 3, s. 267-274
- ASANO, S. et al. Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2007, roč. 104, č. 4, s. 334 – 338
- BAMFORTH, C. W. *Beer: tap into the art and science of brewing*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2003. 233 s.
- BAMFORTH, C. W. *Food, fermentation, and micro-organisms*. Ames, Iowa: Blackwell Science, 2005. 216 s.
- BASAŘOVÁ, G., BLÁHA, M., VESELÝ, P. Vliv kmene kvasnic na senzoryckou stabilitu piva. *Kvasný průmysl*. 2003, roč. 49, č. 1, s. 3-9
- BASAŘOVÁ, G., NOVÁK, J. Každé pivo se drží svých kvasinek. *Vesmír*. 2004, roč. 83, č. 154, s. 154-156
- BASAŘOVÁ, G. et al. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. 904 s.
- BAUMLISBERGER, M. et al. *The Potential of the Yeast Debaryomyces hansenii H525 to Degrade Biogenic Amines in Food*. *Microorganisms*. 2015, roč. 3, č. 4, s. 839-850
- BĚLOHLÁVKOVÁ, S., FUCHS, M. Scombroid syndrom. *Alergie*. 2005, č. 3, s. 217-220
- BENDO VÁ, O., PARDONOVÁ, B. Výběr kmenů pivovarských kvasinek. *Kvasný průmysl*. 1975, roč. 21, č. 4, s. 75-78
- BENDO VÁ, O., KAHLER, M. *Pivovarské kvasinky*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981. 300 s.
- BENDO VÁ, O., VERNEROVÁ, J. Význam kvasničného kmene pro kvalitu piva. *Kvasný průmysl*. 1986, roč. 32, č. 9, s. 201-203
- BOKULICH, N. A., BAMFORTH, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology nad Molecular Biology Reviews*. 2013, roč. 77, č. 2, s. 157-172

- BOVER-CID, S., et al. Influence of Hygienic Quality of Raw Material on Biogenic Amine Production during Ripening and Storage of Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Protection*. 2000, roč. 63, č. 11, s. 1544 – 1550
- BUŇKA, F. et al. Content of Biogenic Amines and Polyamines in Beers from the Czech Republic. *The Institute of Brewing and Distilling*. 2012, roč. 118, č. 2, s. 213 – 216
- CARUSO, M. et al. *Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast*. World J. Microbiol. Biotechnol. 2002, roč. 18, č. 2, s. 159-163
- CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007. 208 s.
- COSTANTINI, A. et al. *Biogenic Amine Production by Contaminating Bacteria Found in Starter Preparations Used in Winemaking*. Journal of agricultural and food chemistry. 2009, roč. 57, č. 22, s. 10664-10669
- ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 ze dne 28. listopadu 1997a, zrušeno dne 1. března 2002
- ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 335/1997 ze dne 12. prosince 1997b, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí.
- DRAČKOVÁ, M. et al. Stanovení obsahu polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené reflektanční spektrometrie. *Acta fytotechnica et zootechnica*. 2009, roč. 12, s. 121 – 126
- ERCAN, S. Ş., BOZKURT, H., SOYSAL, Ç. Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *Journal of Food Science and Engineering*. 2013, roč. 3, s. 395 – 410
- EVROPSKÁ UNIE. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny [on-line]. [cit. 30. října 2016]. Dostupné z:
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF>
- FERREIRA, O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristic and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*. 2. 2010, roč. 21, č. 2, s. 77-84
- FIALOVÁ, J et al. Výskyt rodu *Lactobacillus* a biogenních aminů v laboratorně vyrobené majonéze a tatarské omáčce. *Chemické Listy*. 2013, roč. 107, 308 - 312
- GLÓRIA, M., IZQUIERDO-PULIDO, M. B. A. Levels and Significance of Biogenic Amines in Brazilian Beers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1999, roč. 12, č. 2, s. 129 – 136

HAASOVÁ, Z. *Schopnost produkce biogenních aminů vybranými kmeny kvasinek*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav technologie potravin.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic Amines and Their Production by Microorganisms in Food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994, roč. 5, č. 2, s. 42-49

HALÁSZ, A., BARÁTH, A., HOLZAPFEL, W. H. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1998, roč. 208, s. 434-438

HALÁSZ, A., BARÁTH, A., HOLZAPFEL, W. H. The Biogenic Amine Content of Beer; the Effect of Barley, Malting and Brewing on Amine Concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1999, roč. 208, č. 5, s. 418-423

HARDWICK, W. A. *Handbook of brewing: tap into the art and science of brewing*. 2nd ed. New York: M. Dekker, c1995. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 64.

HORNSEY, Ian. *Brewing*. 2nd edition. Cambridge: RSC. Royal Society of Chemistry, 2013.

IZQUIERDO-PULIDO M. L., MARINE-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic Amines Formation during Malting and Brewing. *Journal of Food Science*. 1994, roč. 59, č. 5, s. 1104-1107

IZQUIERDO-PULIDO, M. L. et al Biogenic Amine Changes Related to Lactic Acid Bacteria During Brewing. *Journal of Food Protection*. 1995, roč. 59, č. 2, s. 175-180

IZQUIERDO-PULIDO, M. L. et al. Biogenic Amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996a, roč. 44, č. 10, s. 3159-3163

IZQUIERDO-PULIDO, M. L. aj. Biogenic Amines in Spanish Beers: Differences among Breweries. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und – Forschung*. 1996b, roč. 203, č. 6, s. 507-511

IZQUIERDO-PULIDO, M. L., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Effect of Tyrosin on Tyramin Formation during Beer Fermentation. *Food Chemistry*. 2000, roč. 70, č. 3, s. 329-332

JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. *Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions*. Washington, DC: ASM Press, 2009. 512 s.

JUSTÉ, A. et al. Microflora during Malting of Barley: Overview and Impact on Malt Quality. *Brewing Science*. 2011, roč. 64, s. 22-31

- KALACH, P., HLAVATA, V., KRÍZEK, M. Concentrations of Five Biogenic Amines in Czech Beers and Factors Affecting Their Formation. *Food Chemistry*. 1997, roč. 58, č. 3, s. 209-214
- KALACH, P. et al. Biogenic Amine Formation in Bottled Beer. *Food Chemistry*. 2002, roč. 79, č. 4, s. 431-434
- KALACH, P., KRÍZEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of The Institute of Brewing*. 2003, roč. 109, č. 2, s. 123-128
- KALACH P., GLÓRIA, M. B. A. Biogenic Amines in Cheeses, Wines, Beers and Sauerkraut. In: *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. Trivandrum, India, Transworld Research Network, 2009. 439 s.
- KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, č. 1, s. 70-79
- KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, č. 1, s. 30-49. Dostupné z: http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf
- KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva*. Vyd. 2. (1. na CD). Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2003. 398 s.
- LANDETE, J. M. et al. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, roč. 53, č. 4, s. 1119-1124
- LARQUÉ, E., SABATER-MOLINA, M., ZAMORA, S. Biological Significance of Dietary Polyamines. *Nutrition*. 2007, roč. 23, č. 1, s. 87-95
- LINARES, D. M. et al. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, roč. 51, č. 7, s. 691-703
- LORENCOVÁ, E. *Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu Lactobacillus a Bifidobacterium*. Zlín, 2015. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- MANCA DE NADRA, M. C. Nitrogen Metabolism in Lactic Acid Bacteria from Fruits: a review. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. 2007, s. 500–510
- MANDOVÁ, V. *Produkce biogenních aminů bakteriálními izoláty mléčného kvašení z procesu výroby piva*. Zlín, 2015. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- MATOULKOVÁ, D., J. KOPECKÁ a P. KUBIZNIAKOVÁ. Brewing Microbiology – Wild Yeasts and Methods of Their Detection. *Kvasný průmysl*. 2013, roč. 59, č. 9, s. 246-257

- MAYER, H. K., FIECHTER, G., FISCHER, E. A New Ultra-pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010, roč. 1217, č. 19, s. 3251-3257
- OLŠOVSKÁ, J. et al. Pivo a zdraví. *Kvasný průmysl*. 2014, roč. 60, č. 7-8, s. 174-181
- PRADENAS, J. et al. Occurrence of Biogenic Amines in Beers from Chilean Market. *Food Control*. 2016, roč. 70, s. 138-144
- PRIEST, F. G., STEWART, G. *Handbook of brewing*. 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor, 2006. Food science and technology. 157 s.
- RODRIGUEZ, M. B. R. et al. Bioactive Amines: Aspects of Quality and Safety in Food. *Food and Nutrition Sciences*. 2014, roč. 5, č. 2, s. 138-146
- ROIG-SAGUÉS A. X. et al. The Decarboxylating Bacteria Present in Foodstuffs and The Effect of Emerging Technologies on Their Formation. In: *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. Trivandrum, India, Transworld Research Network, 2009. 439 s.
- ROMERO, R. et al. The Influence of the Brewing Process on the Formation of Biogenic Amines in Beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, roč. 376, č. 2, s. 162-167
- RUSSO, P. et al. Are Consumers Aware of the Risks Related to Biogenic Amines in Food ? *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2010, s. 1087-1095
- SALMINEN, S., A. VON WRIGHT a A. OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. 3 vyd. Marcel Dekker, Inc., 2004. 633s.
- SHALABY, A. R. Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, č. 7, s. 675-690
- SHUKLA, S., KIM, J-K., KIM, M. Occurrence of biogenic amines in soybean food products. In: *Soybean and Health*. ed. H. El-Shemy, InTech, 2011. s. 181-199
- SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, č. 2-3, s. 213-231
- SŁOMKOWSKA, A., AMBROZIAK, W. Biogenic Amine Profile of the Most Popular Polish Beers. *European Food Research and Technology*. 2002, roč. 215, č. 5, s. 380-383
- SMIT, A. Y., TOIT, W. J., TOIT, M. Biogenic amines in Wine: Understanding the Headache. *South African Journal for Enology and Viticulture*. 2008, roč. 29, č. 2, s. 109-127

SOHRABVANDI, S., MORAZAVIAN, A. M., REZAEI, K. Health-Related Aspects of Beer: a Review. *International Journal of Food Properties*. 2012, roč. 15, č. 2, s. 350-373

SPANO, G. et al. Biogenic Amines in Fermented Foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, roč. 64, č. 3, s. 95-100

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002.

ŠKACH, J., SLABÝ, M. Vážíme se dostatečně kvasinek? *Kvasný průmysl*. 2009, roč. 55, č. 1, s. 2-8.

TANG, T. et al. Determination of Biogenic Amines in Beer with Pre-column Derivatization by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2009, roč. 877, č. 5-6, s. 507-512

TENGE, C. Yeast. In: EBLINGER, H. M. *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. Weinheim, Bergstr: WILEY-VCH, 2009.

VAN NIEROP, S. N. E et al. The Impact of Microorganisms on Barley and Malt Quality - A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2006, roč. 64, č. 2, s. 69-78

VANĚK, S. Slouží pivu ke cti jen vitamíny? *Vesmír*. 2004, roč. 83, s. 704

VAUGHAN, A., O'SULLIVAN, T., SINDEREN, D. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, roč. 111, č. 4, s. 355-371

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 3. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 343 s.

11 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	Adenozintrifosfát
BA	Biogenní aminy
DAO	Diaminooxidáza
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MAO	Monoaminooxidáza
PA	Polyaminy
PAO	Polyaminooxidáza
UV	Ultrafialové záření

12 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Transaminace</i>	35
Obr. 2. <i>Deaminace</i>	35
Obr. 3. <i>Dekarboxylace</i>	35
Obr. 4. <i>Schéma metodiky skríníngu dekarboxylázové aktivity a degradace BA a PA in vitro. TYR – tyramín, HIS – histamín, PUT – putrescín, YE – kvasničný extrakt, Arg – arginín, His – histidín, Tyr – tyrozin, Phe – fenylalanín</i>	48
Obr. 5 <i>Obsah tyramínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami</i>	52
Obr. 6 <i>Obsah tyramínu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami</i>	53
Obr. 7 <i>Obsah tyramínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyramínem</i>	54
Obr. 8 <i>Obsah tyramínu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyramínem</i>	54
Obr. 9 <i>Obsah tyramínu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyramínem a kvasničným extraktem</i>	55
Obr. 10 <i>Obsah tyramínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyramínem a kvasničným extraktem</i>	56
Obr. 11 <i>Obsah putrescínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA</i>	57
Obr. 12 <i>Obsah putrescínu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA</i>	58
Obr. 13 <i>Obsah histamínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA</i>	59
Obr. 14 <i>Obsah histamínu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA</i>	59
Obr. 15 <i>Obsah tyramínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA</i>	60
Obr. 16 <i>Obsah tyramínu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA</i>	60
Obr. 17 <i>Obsah putrescínu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem</i>	61

Obr. 18	<i>Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem.....</i>	62
Obr. 19	<i>Obsah putrescinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem.....</i>	62
Obr. 20	<i>Obsah histaminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem.....</i>	63
Obr. 21	<i>Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem.....</i>	64
Obr. 22	<i>Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném BA a kvasničným extraktem.....</i>	64
Obr. 23	<i>Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném aminokyselinami</i>	65
Obr. 24	<i>Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami</i>	66
Obr. 25	<i>Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem</i>	67
Obr. 26	<i>Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném tyraminem</i>	68
Obr. 27	<i>Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA.....</i>	69
Obr. 28	<i>Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA.....</i>	69
Obr. 29	<i>Obsah tyraminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA.....</i>	70
Obr. 30	<i>Obsah putrescinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA.....</i>	71
Obr. 31	<i>Obsah histaminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA.....</i>	71
Obr. 32	<i>Obsah tyraminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA.....</i>	72

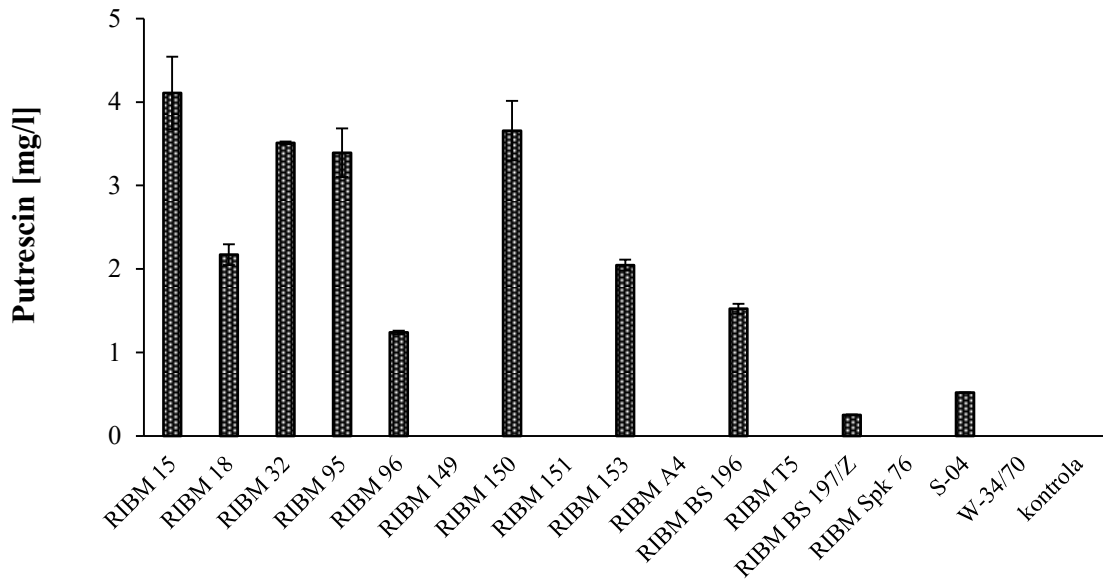
13 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 <i>V potravinách významné BA a PA a jejich prekurzory (Shukla, Kim a Kim, 2011)</i>	16
Tab. 2 <i>Přehled kmenů použitých kvasinek a laktobacilů</i>	46

14 SEZNAM PŘÍLOH

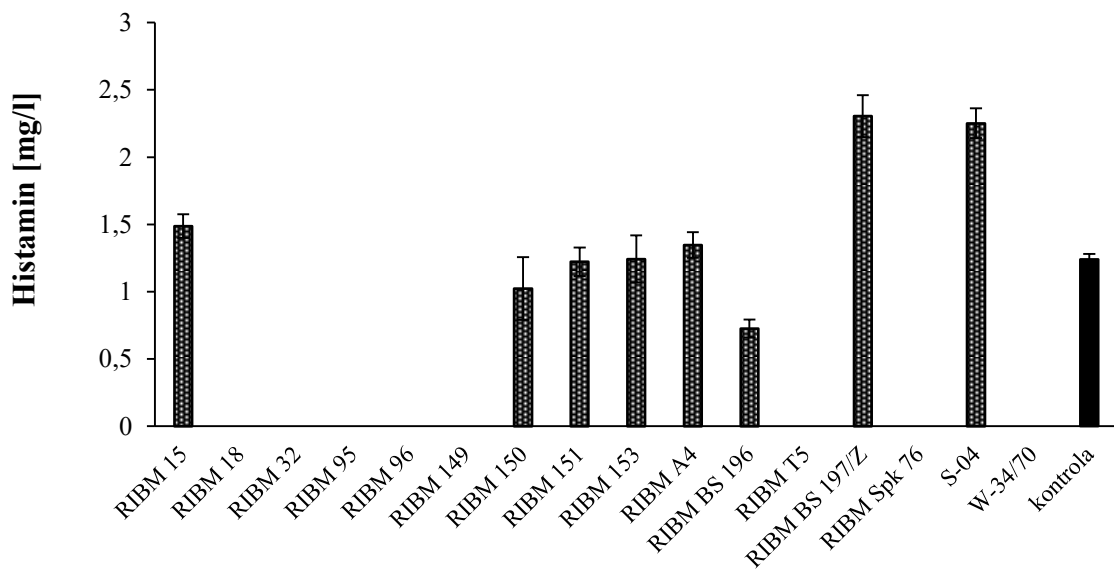
Příloha P I: Obsah BA a PA v minerálním médiu s aminokyselinami	90
Příloha P II: Obsah BA a PA v minerálním médiu s tyraminem	93
Příloha P III: Obsah BA a PA v minerálním médiu s tyraminem a kvasničným extraktem	94
Příloha P IV: Obsah BA a PA v minerálním médiu s vybranými BA	98
Příloha P V: Obsah BA a PA v minerálním médiu s vybranými BA a kvasničným extraktem	99
Příloha P VI: Obsah BA a PA v živném médiu s aminokyselinami	102
Příloha P VII: Obsah BA a PA v živném médiu s tyraminem	106
Příloha P VIII: Obsah BA a PA v živném médiu s vybranými BA	110

PŘÍLOHA P I: OBSAH BA A PA V MINERÁLNÍM MÉDIU S AMINOKYSELINAMI



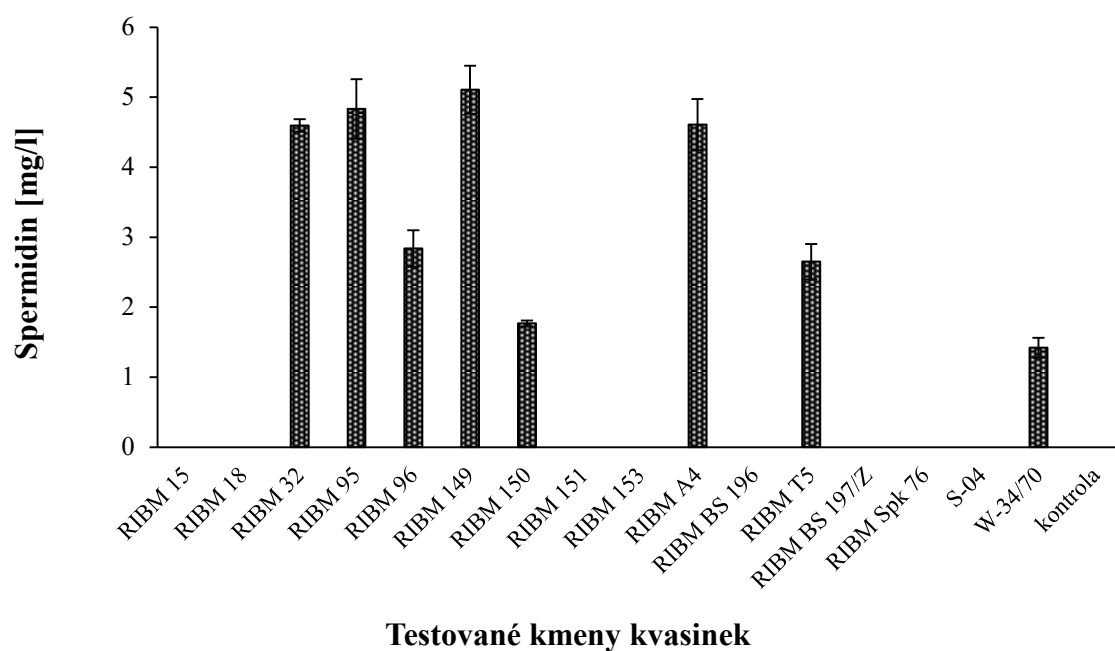
Testované kmeny kvasinek

Obr. 1 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami

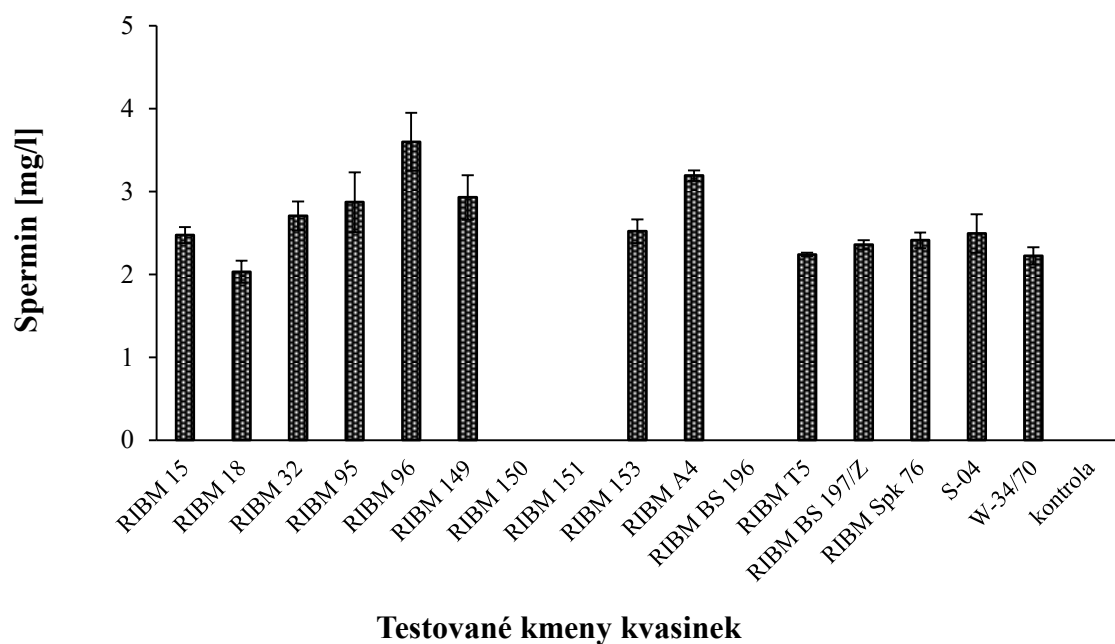


Testované kmeny kvasinek

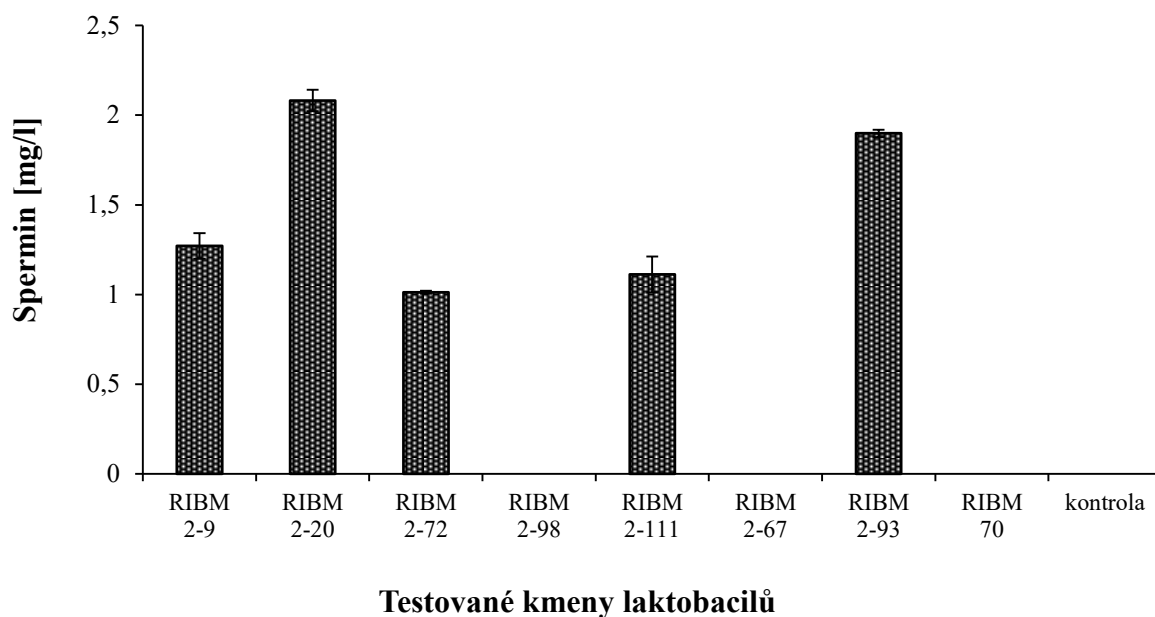
Obr. 2 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami



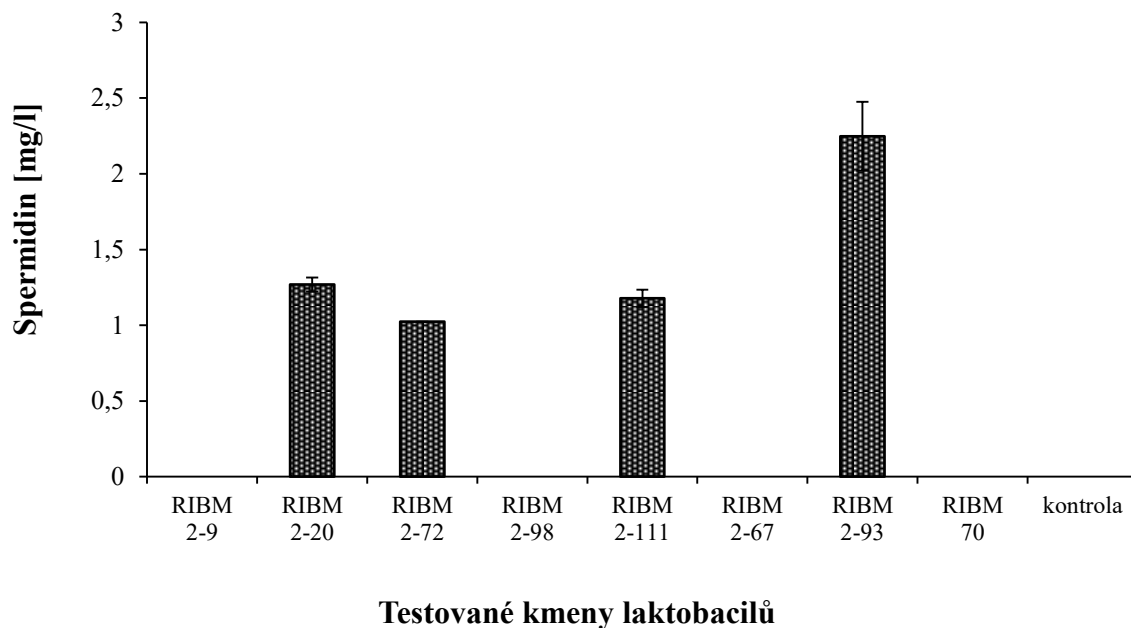
Obr. 3 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami



Obr. 4 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami

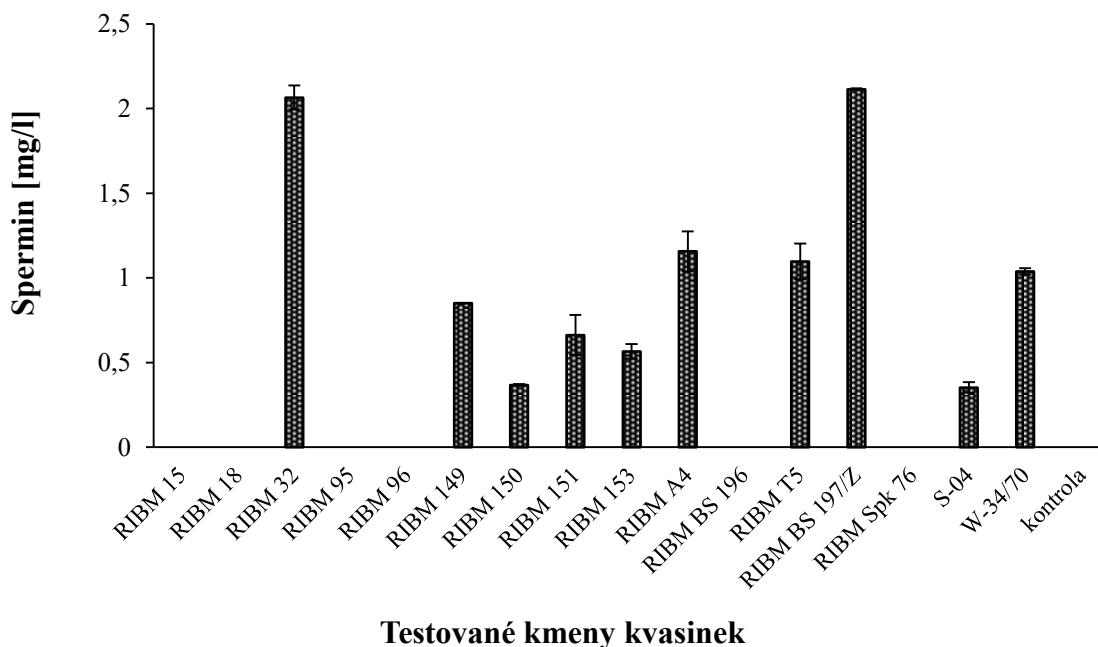


Obr. 5 Obsah sperminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami

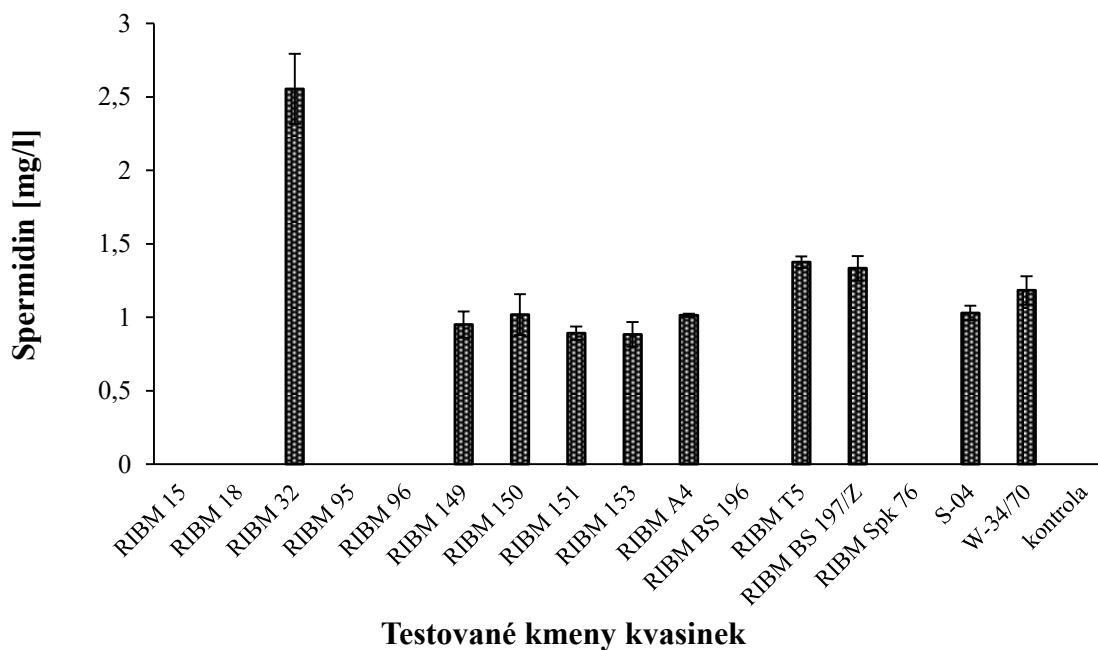


Obr. 6 Obsah spermidinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném aminokyselinami

PŘÍLOHA P II: OBSAH BA A PA V MINERÁLNÍM MÉDIU S TYRAMINEM

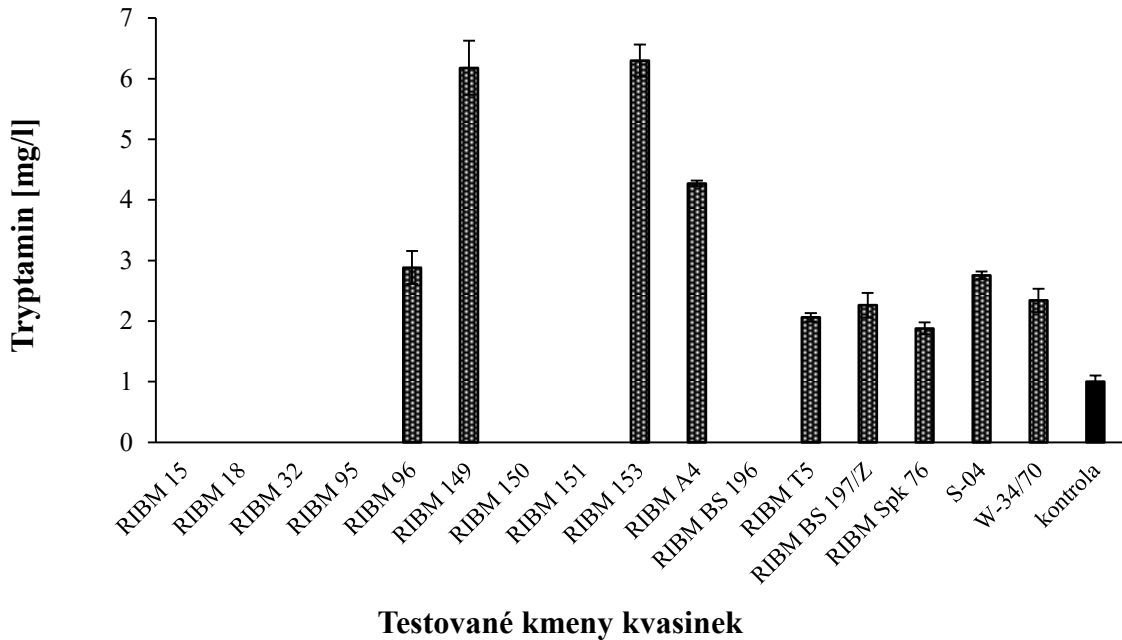


Obr. 7 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem

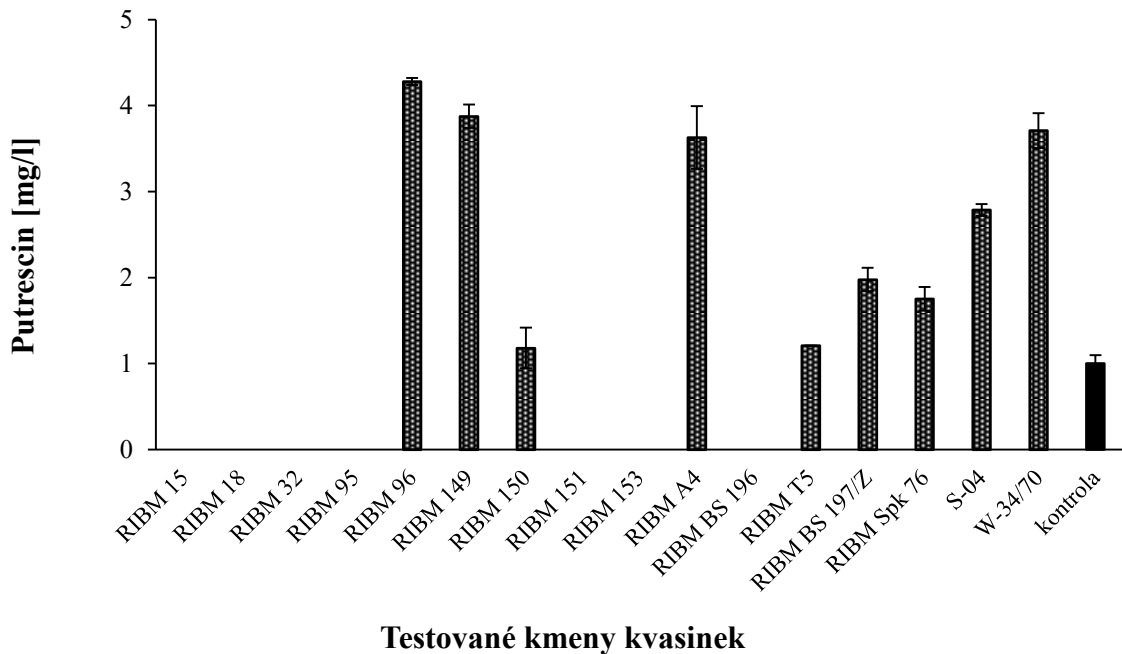


Obr. 8 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem

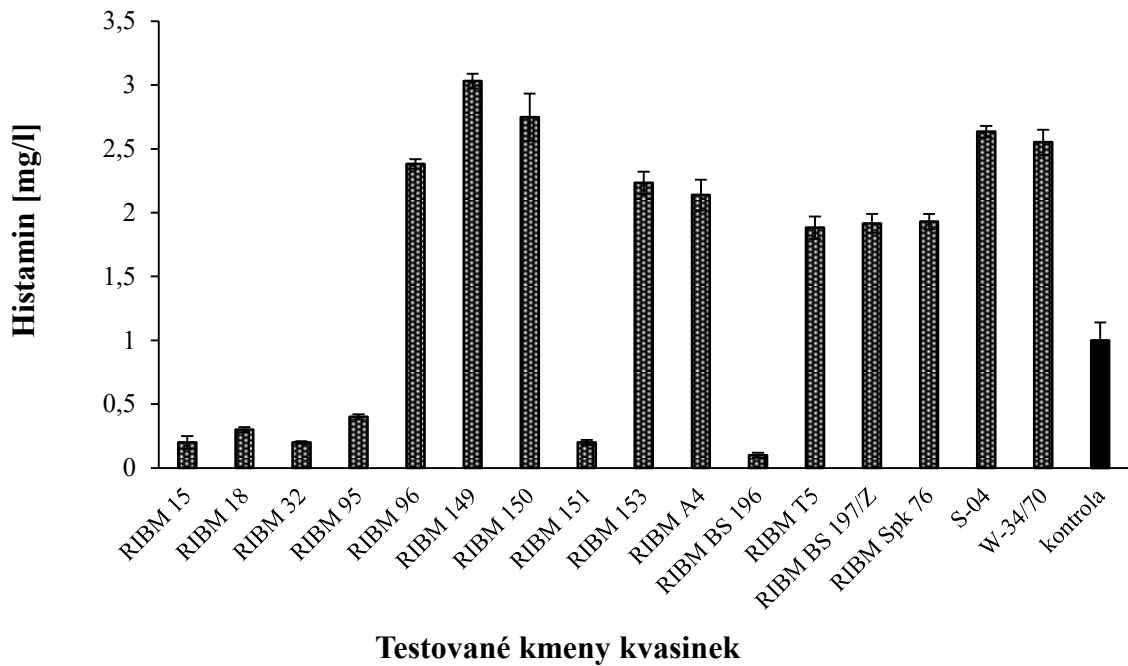
PŘÍLOHA P III: OBSAH BA A PA V MINERÁLNÍM MÉDIU S TYRAMINEM A KVASNIČNÝM EXTRAKTEM



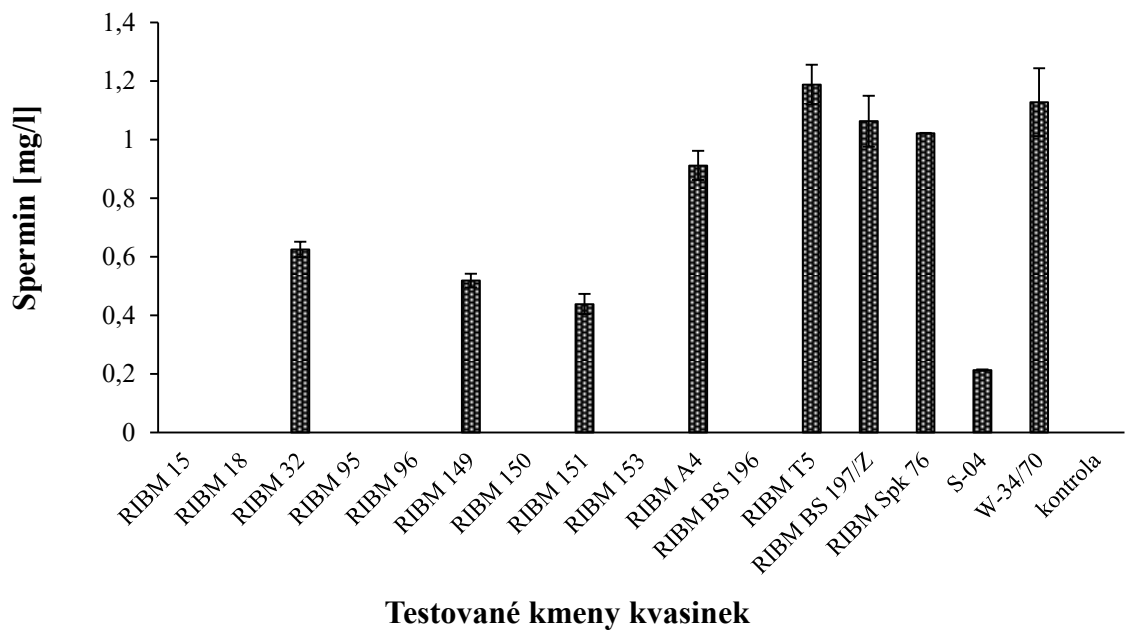
Obr. 9 Obsah tryptaminu po kultivaci kvasinek v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničním extraktem



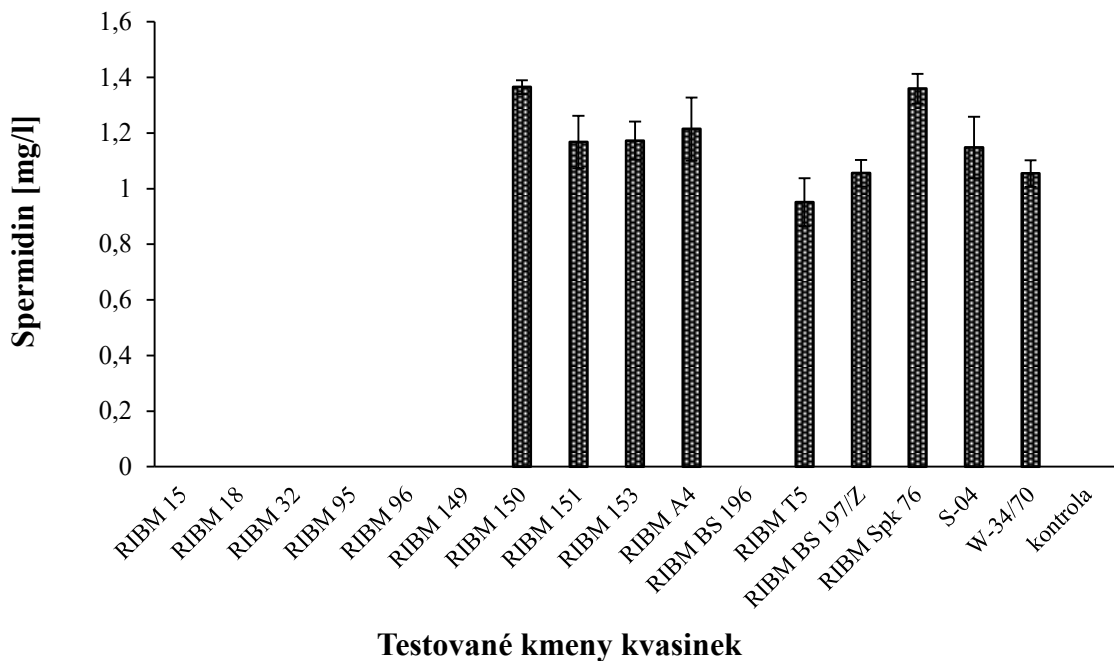
Obr. 10 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničním extraktem



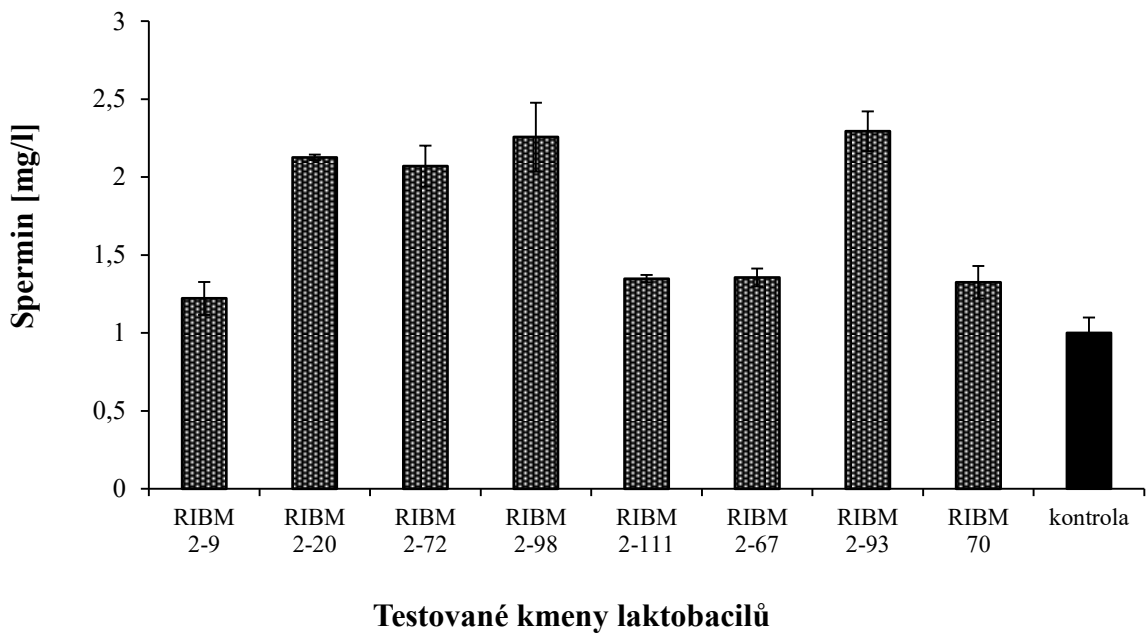
Obr. 11 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničným extraktem



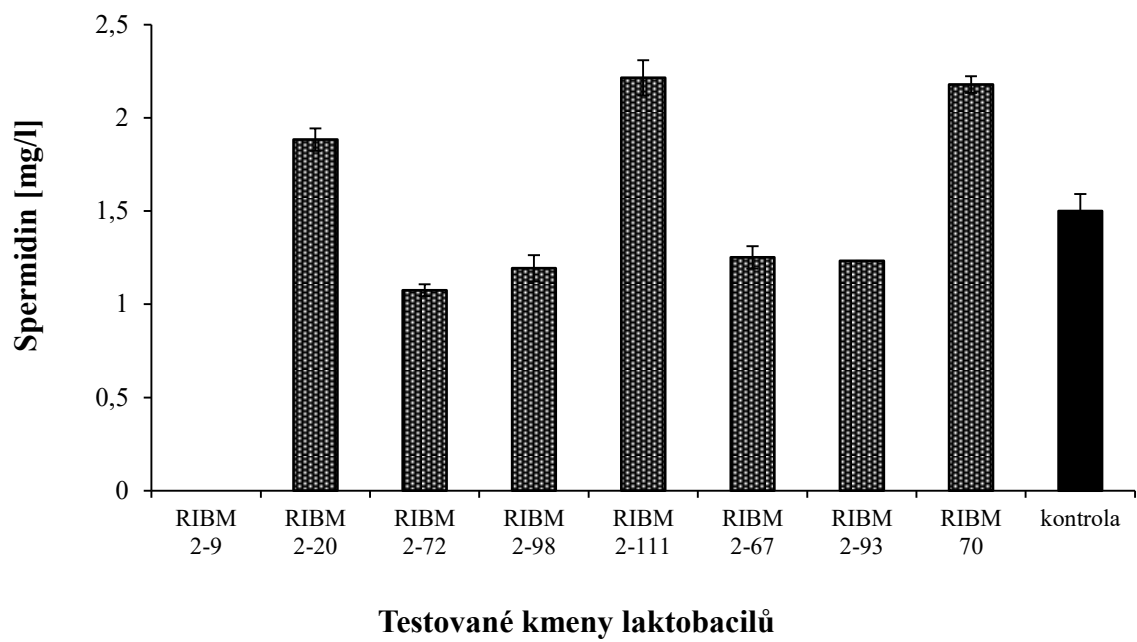
Obr. 12 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničným extraktem



Obr. 13 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničním extraktem

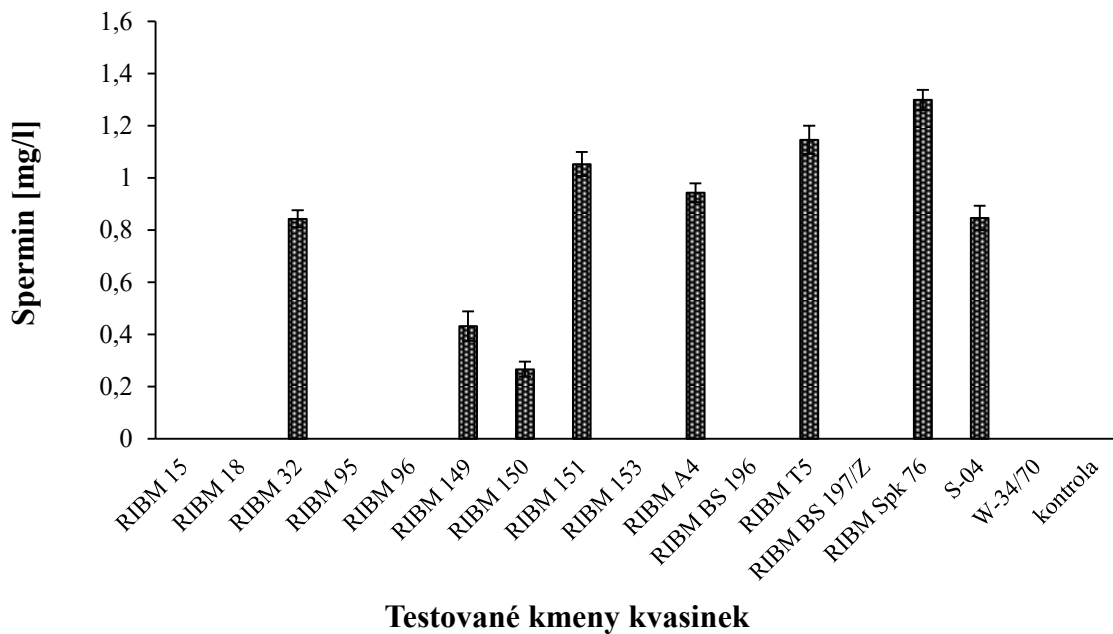


Obr. 14 Obsah sperminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničním extraktem

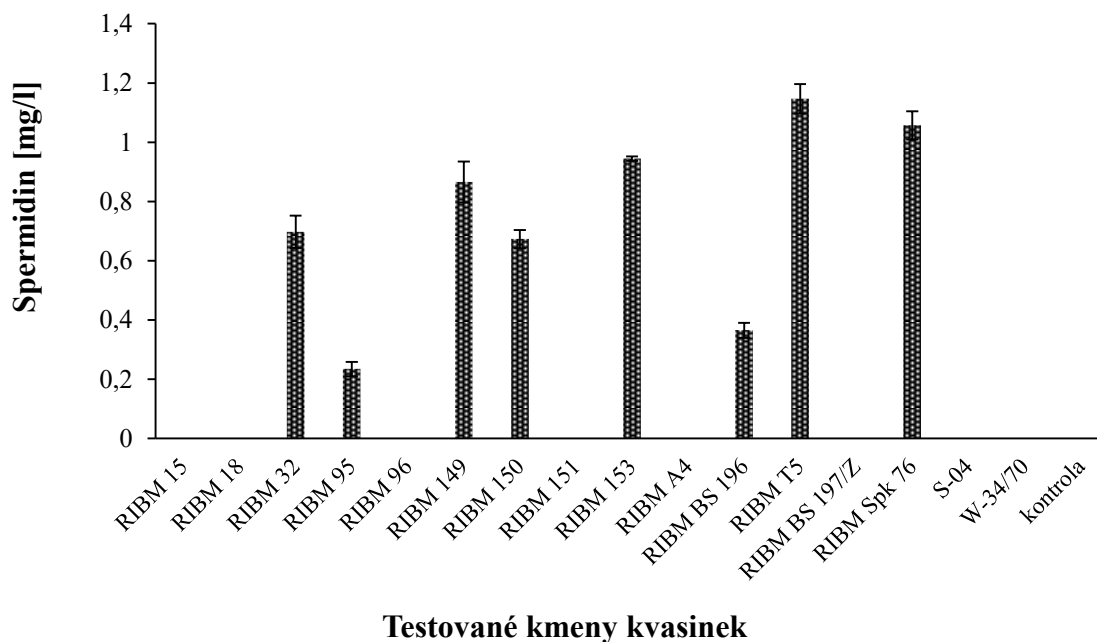


Obr. 15 Obsah spermidinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném tyraminem a kvasničným extraktem

PŘÍLOHA P IV: OBSAH BA A PA V MINERÁLNÍM MÉDIU S VYBRANÝMI BA

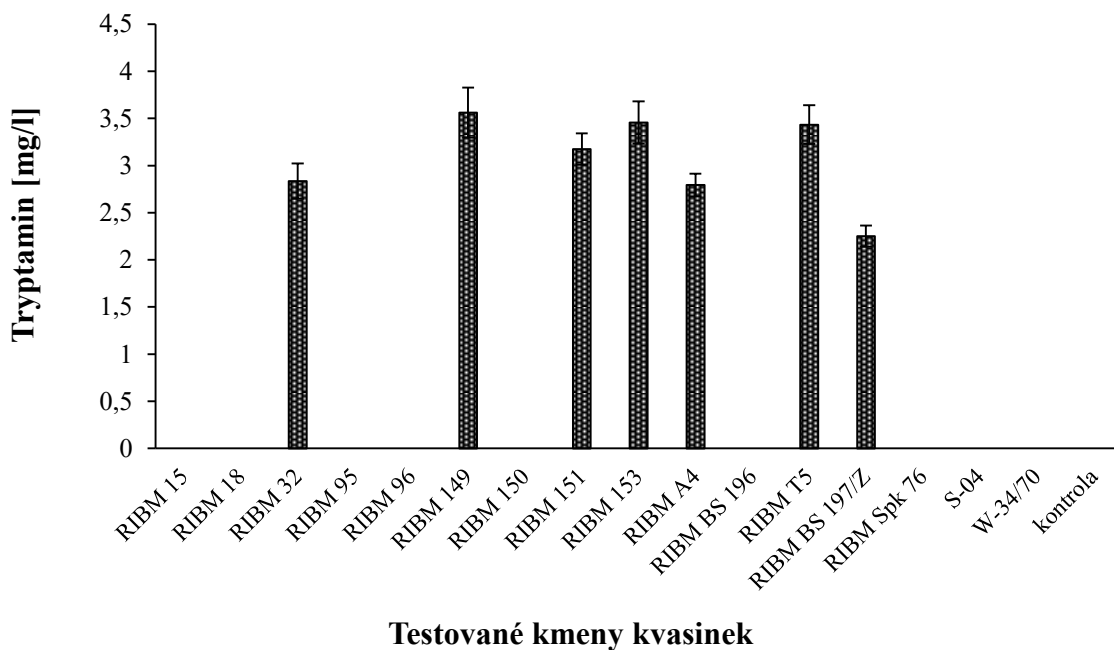


Obr. 16 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA

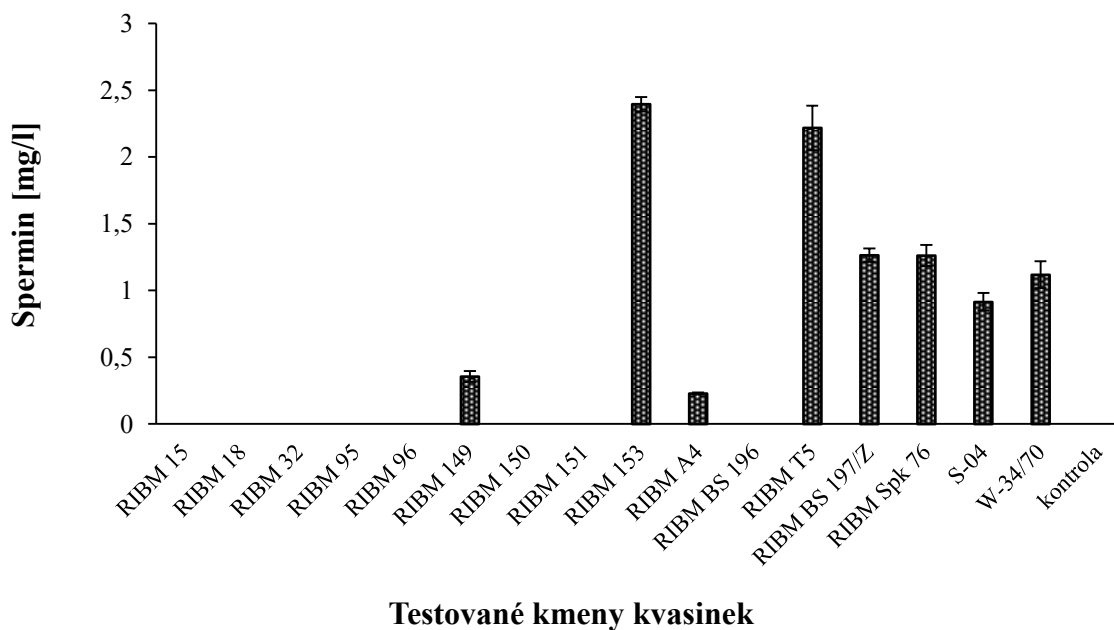


Obr. 17 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA

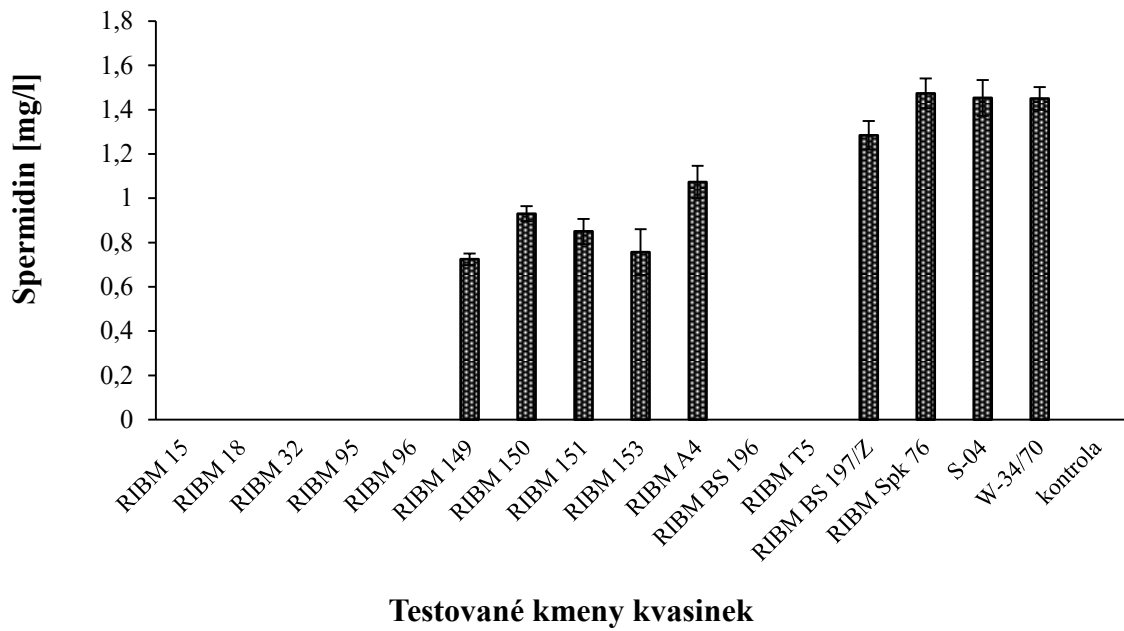
PŘÍLOHA P V: OBSAH BA A PA V MINERÁLNÍM MÉDIU S VYBRANÝMI BA A KVASNIČNÝM EXTRAKTEM



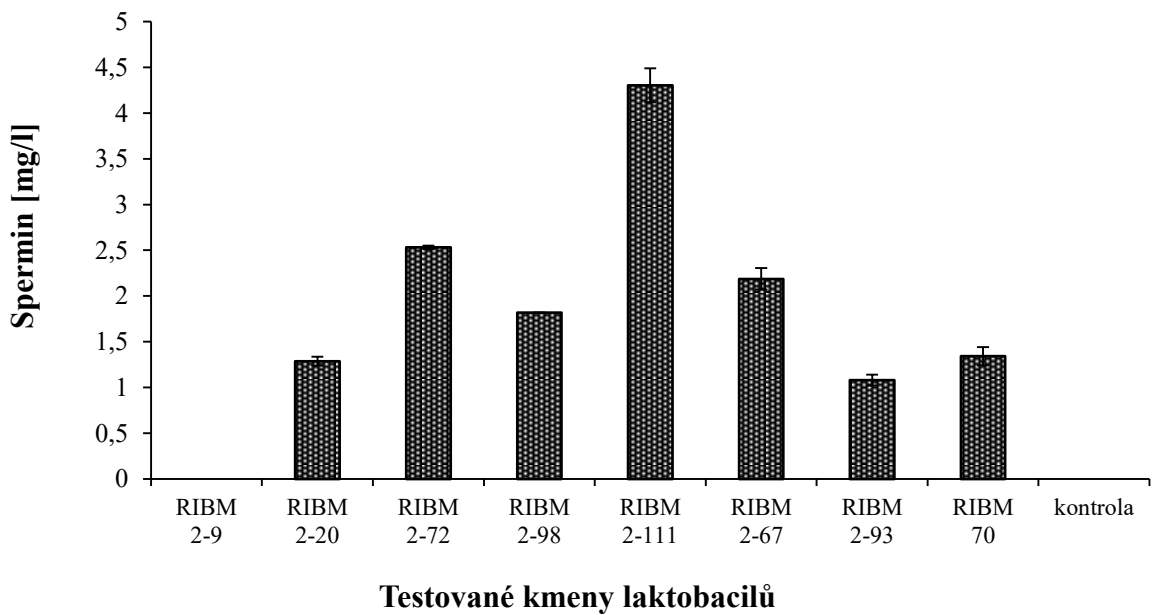
Obr. 18 Obsah tryptaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA a kvasničním extraktem



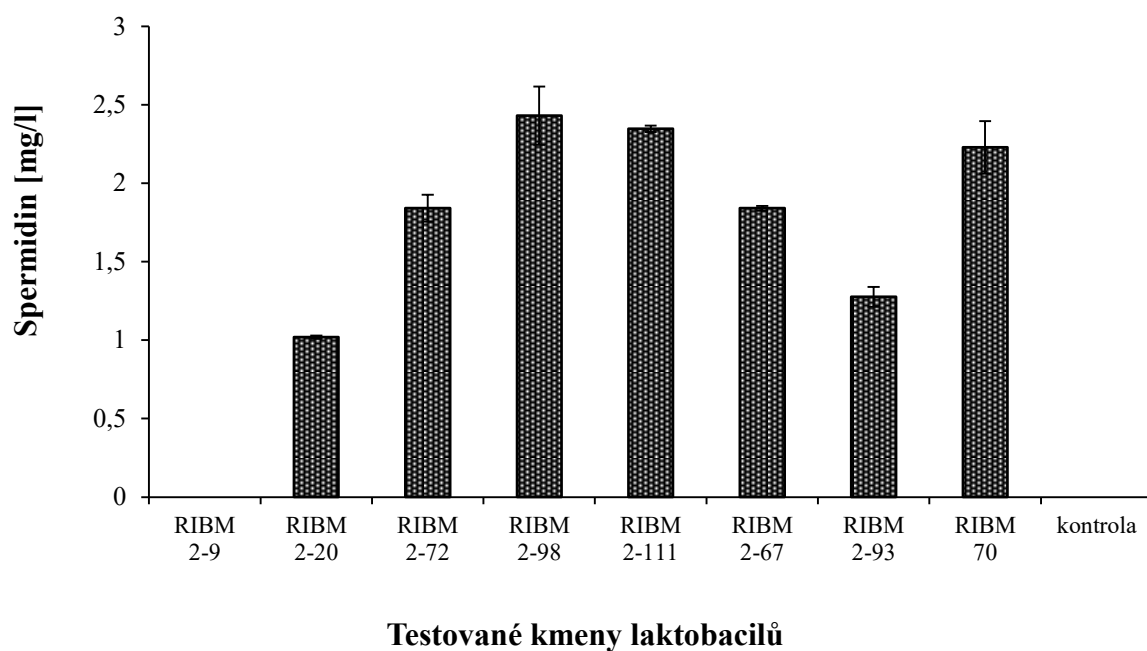
Obr. 19 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA a kvasničním extraktem



Obr. 20 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA a kvasničným extraktem

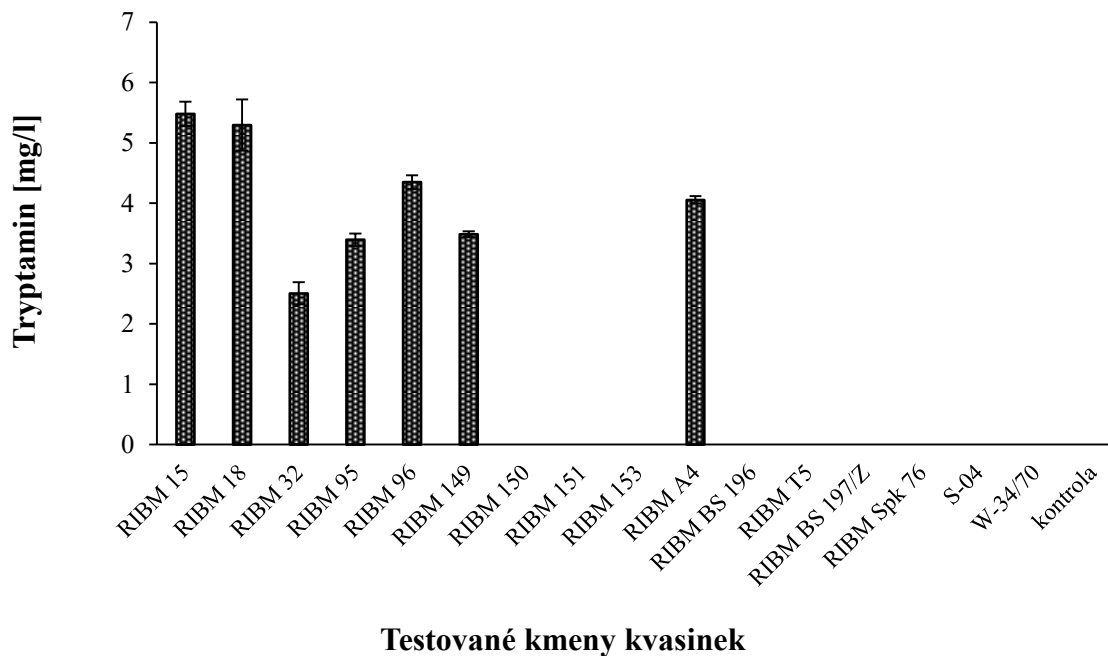


Obr. 21 Obsah sperminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA a kvasničným extraktem

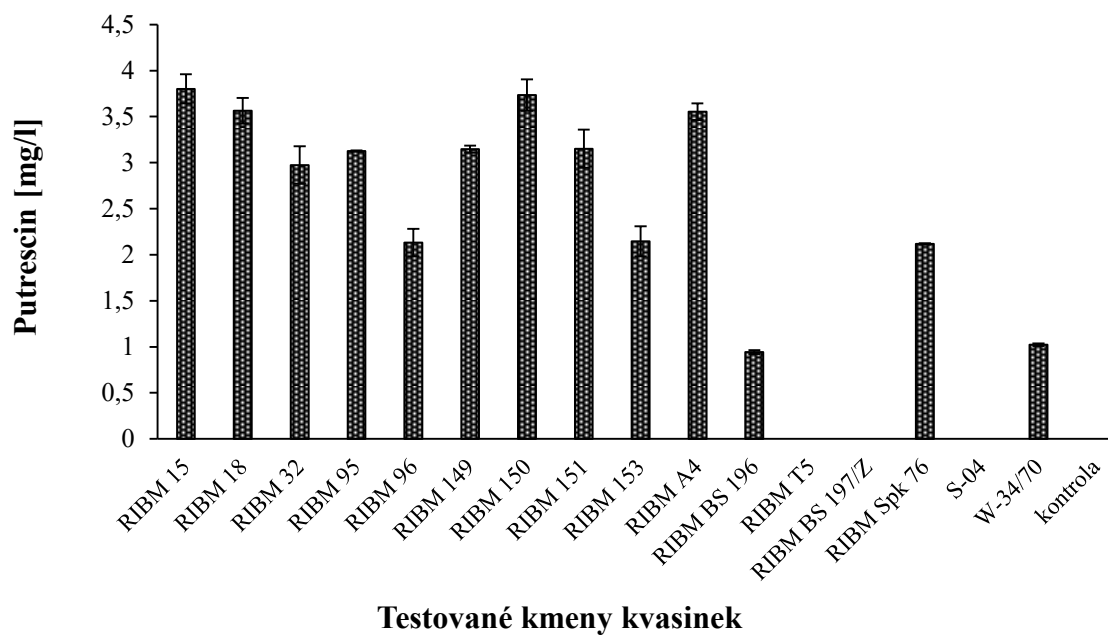


Obr. 22 Obsah spermidinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v minerálním médiu suplementovaném vybranými BA a kvasničným extraktem

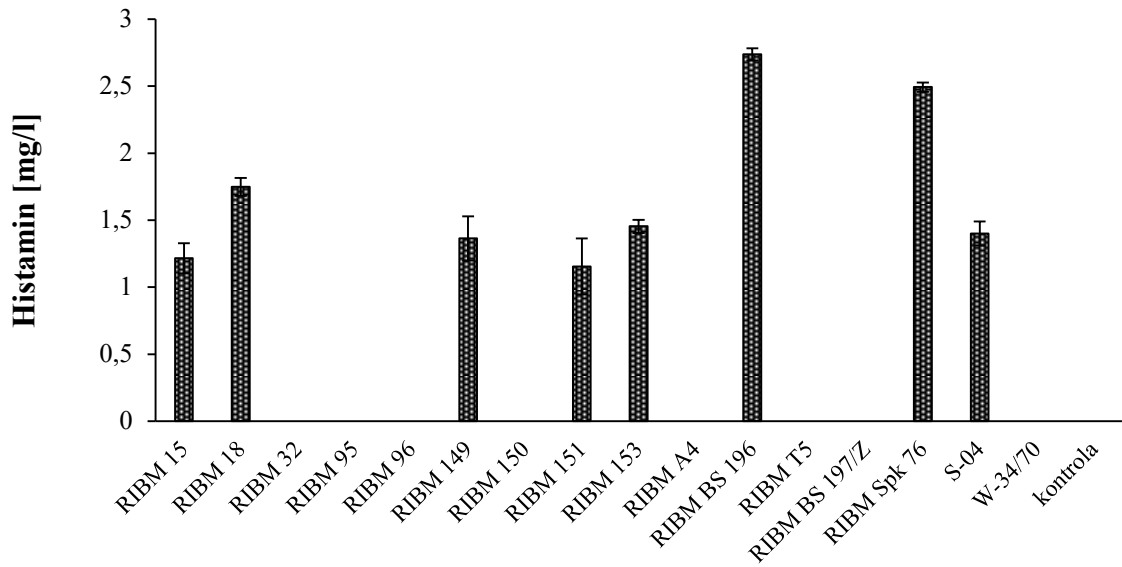
PŘÍLOHA P VI: OBSAH BA A PA V ŽIVNÉM MÉDIU S AMINOKYSELINAMI



Obr. 23 Obsah tryptaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami

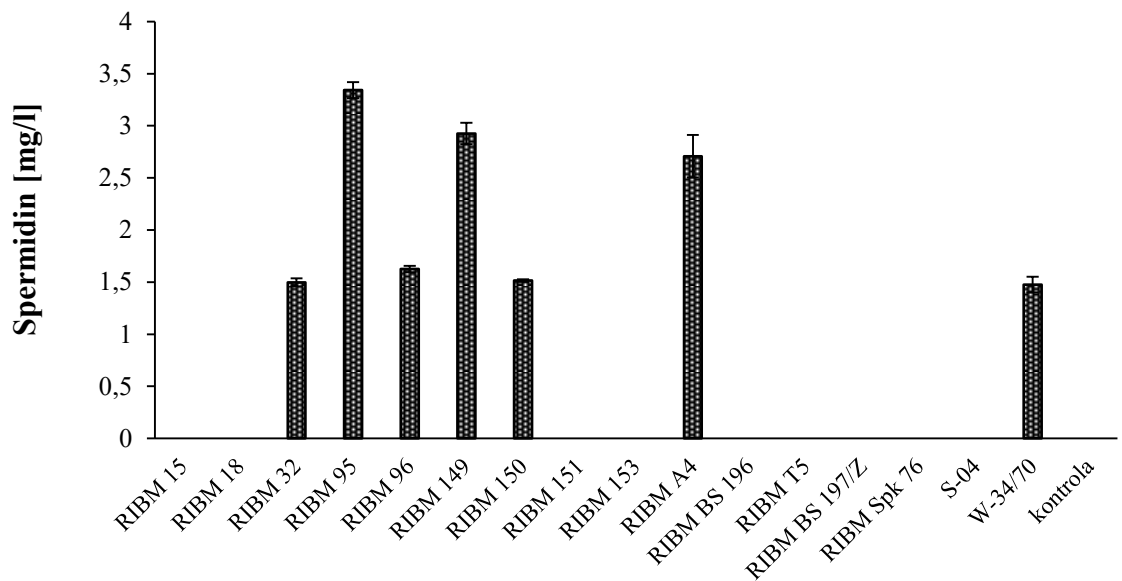


Obr. 24 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami



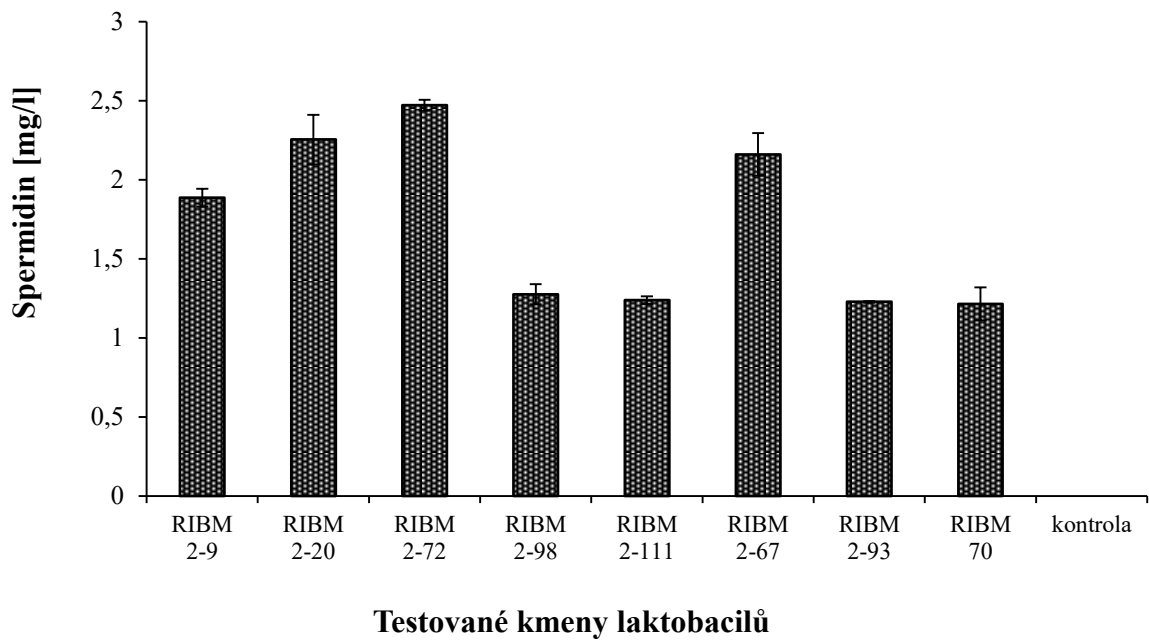
Testované kmeny kvasinek

Obr. 25 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami

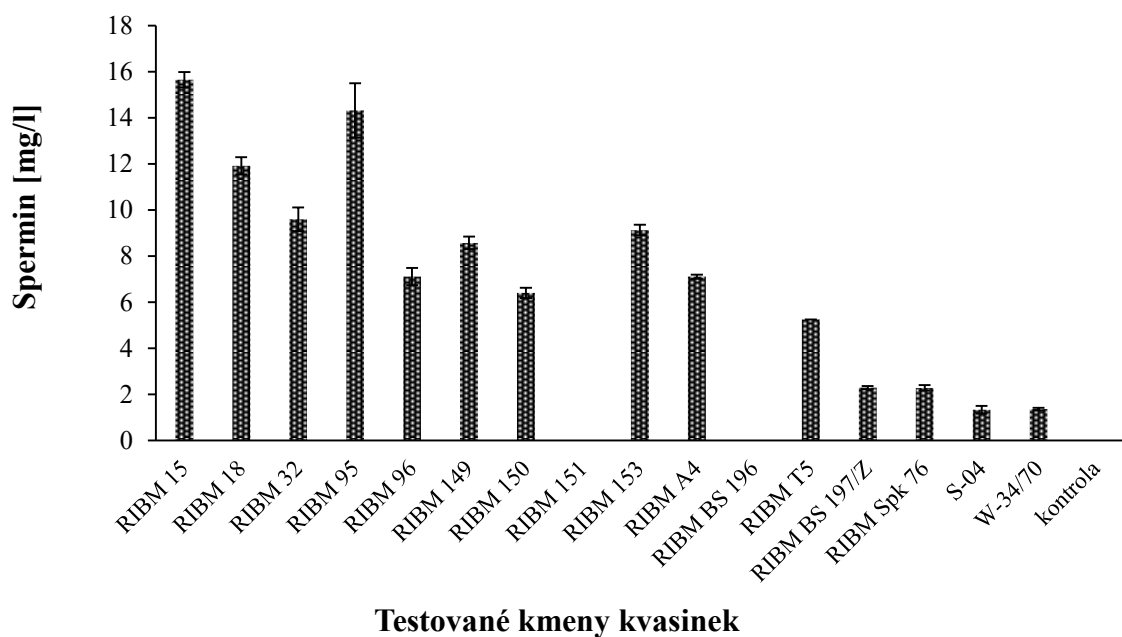


Testované kmeny kvasinek

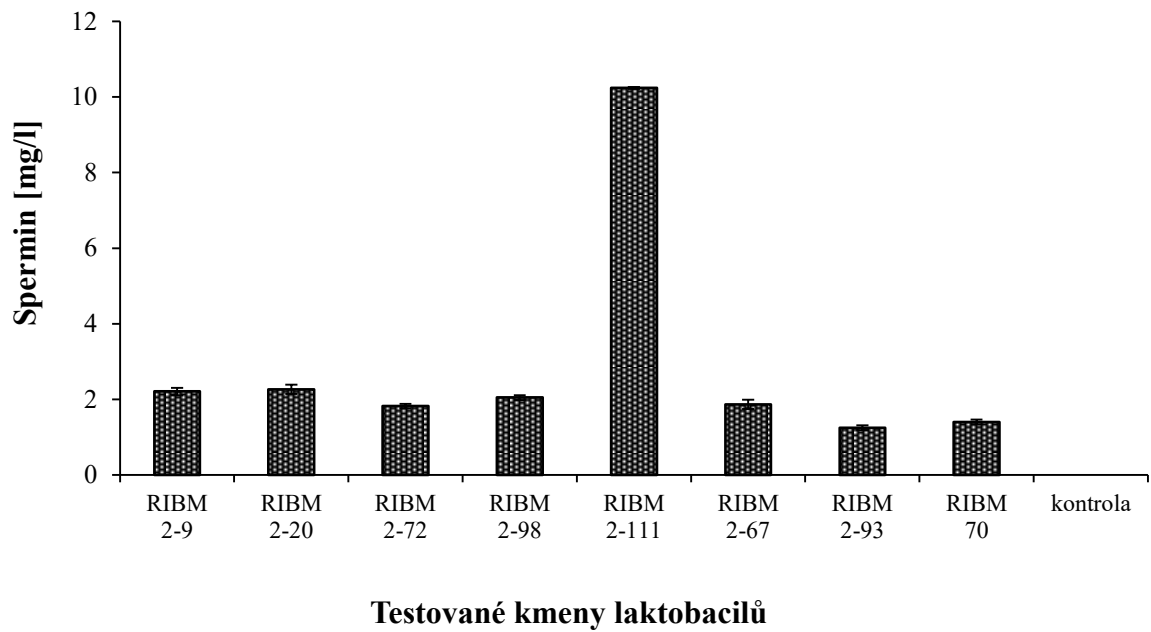
Obr. 26 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami



Obr. 27 Obsah spermidinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném aminokyselinami

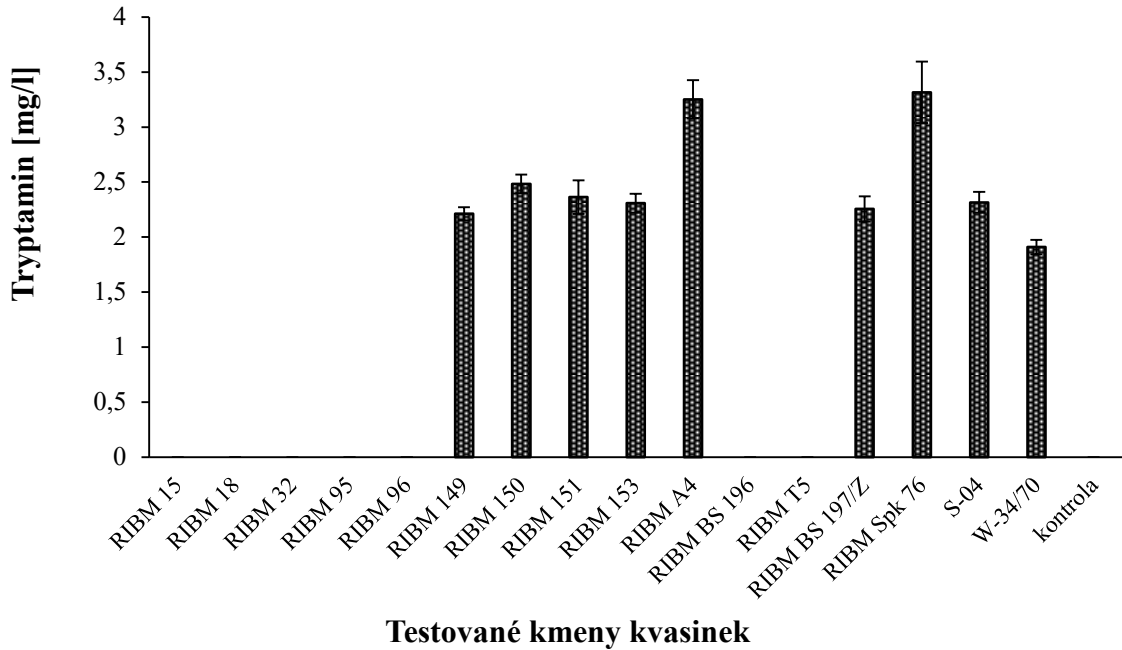


Obr. 28 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném aminokyselinami

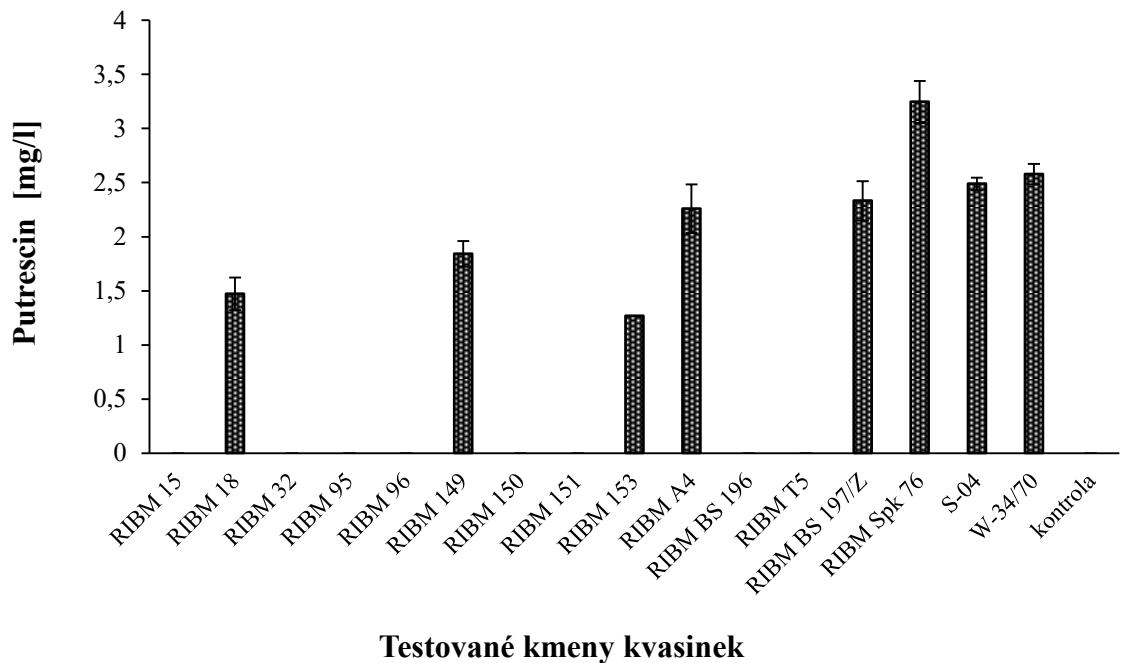


Obr. 29 Obsah sperminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném aminokyselinami

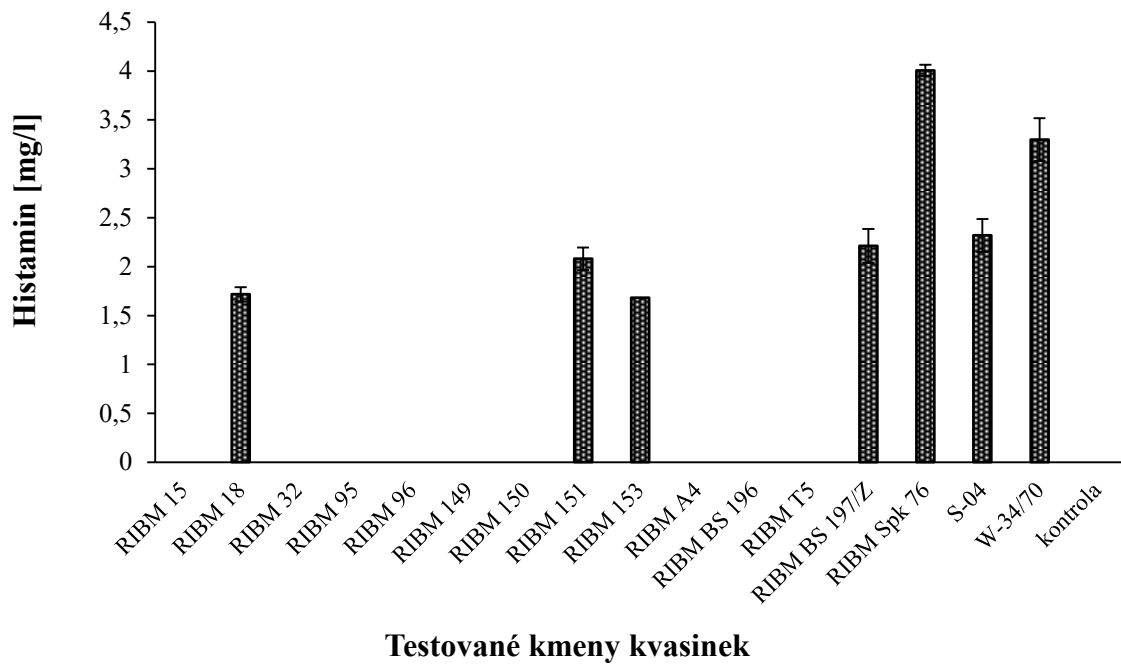
PŘÍLOHA P VII: OBSAH BA A PA V ŽIVNÉM MÉDIU S TYRAMINEM



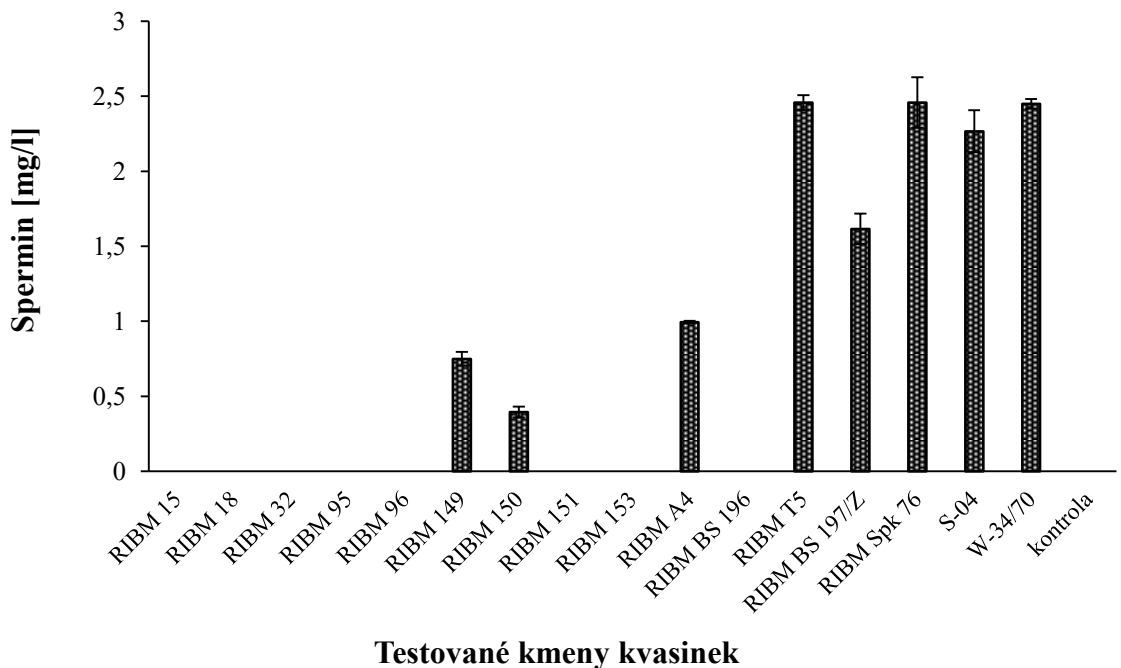
Obr. 30 Obsah tryptaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem



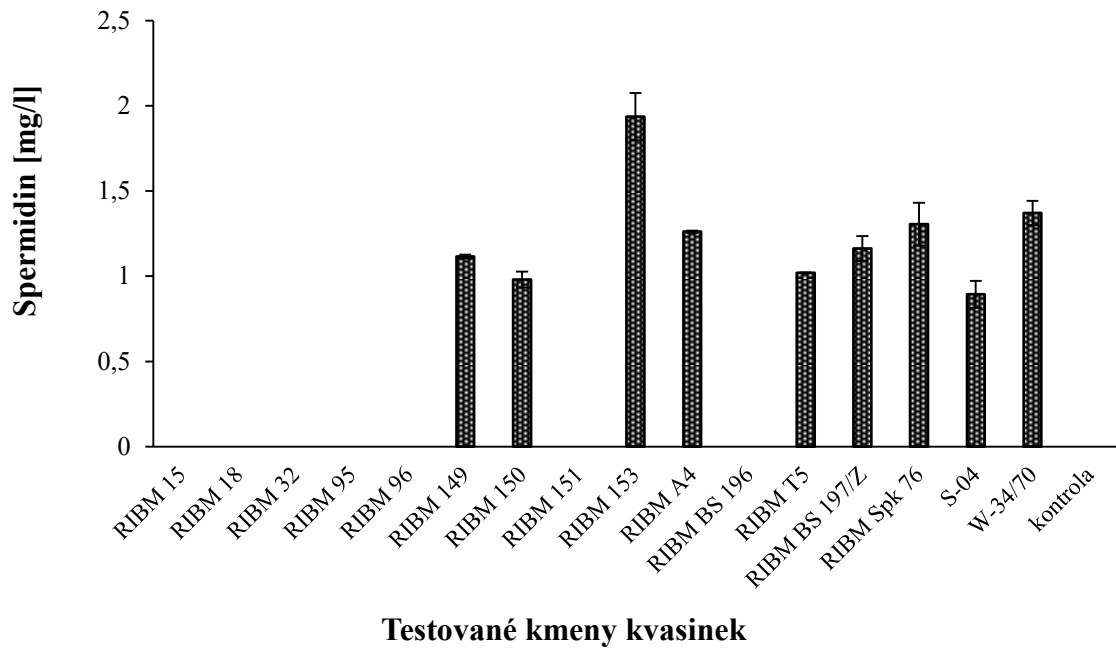
Obr. 31 Obsah putrescinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem



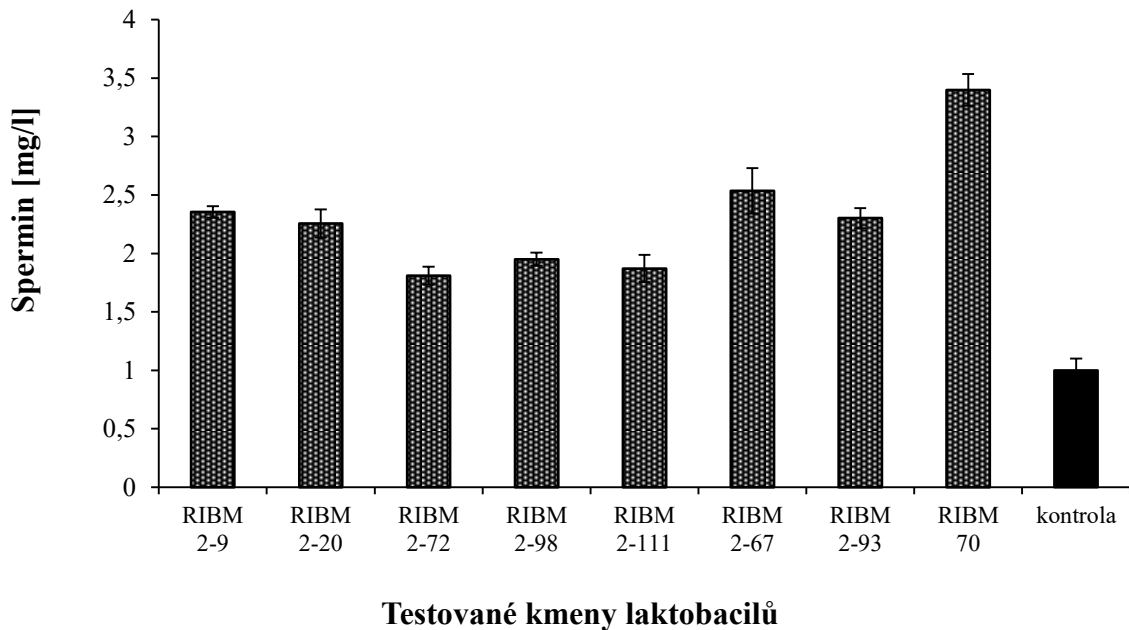
Obr. 32 Obsah histaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem



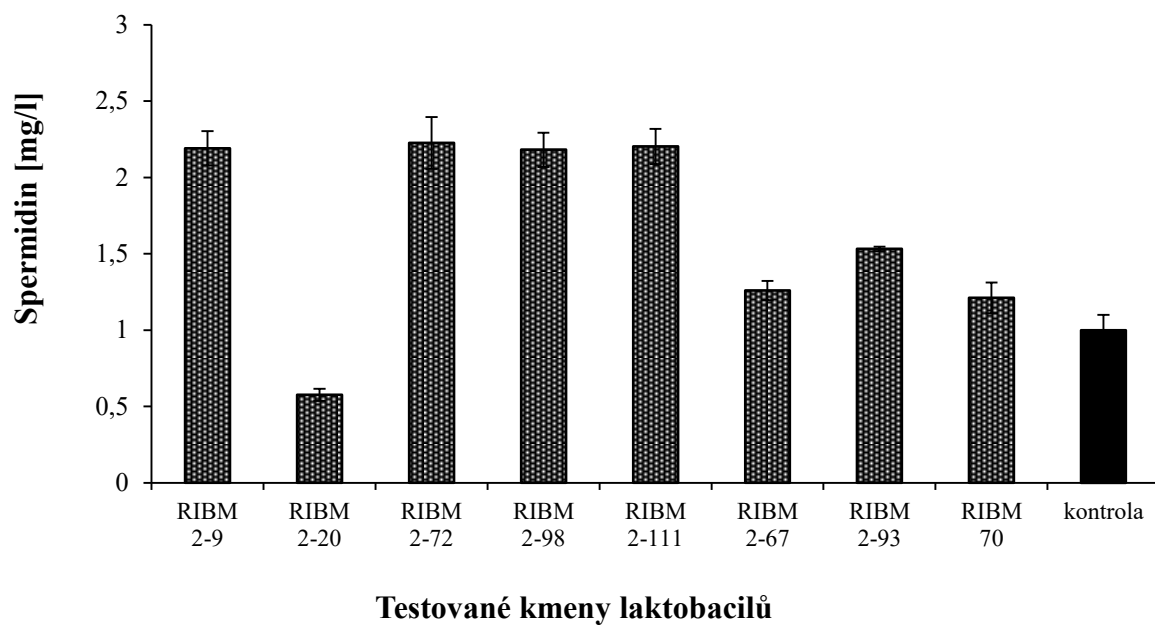
Obr. 33 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem



Obr. 34 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném tyraminem

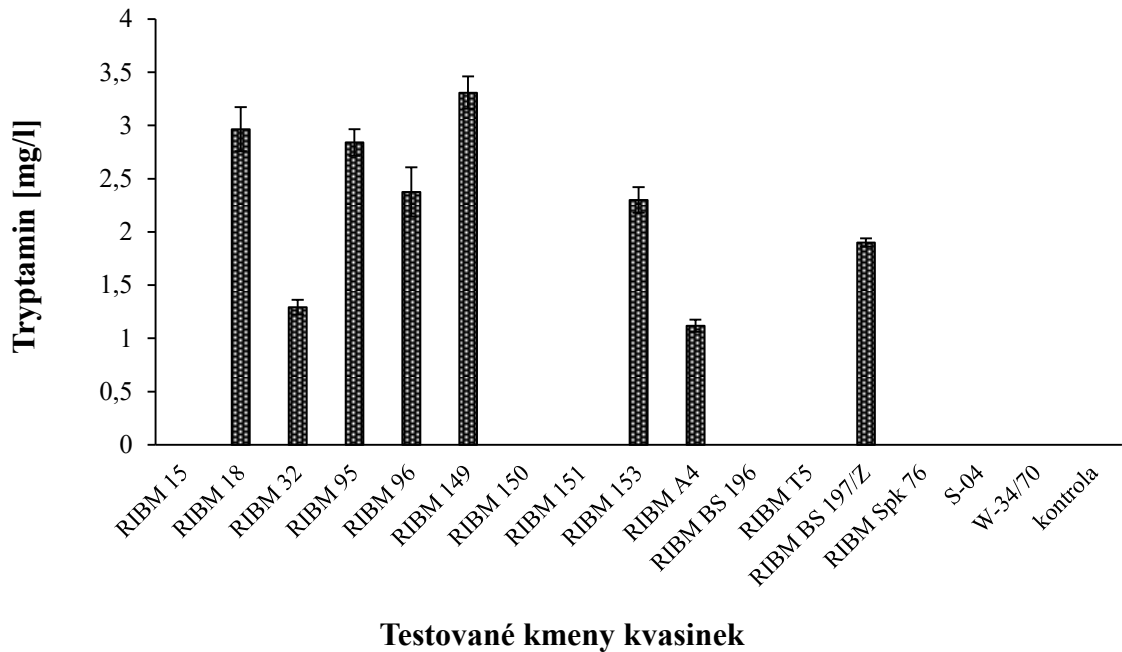


Obr. 35 Obsah sperminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném tyraminem

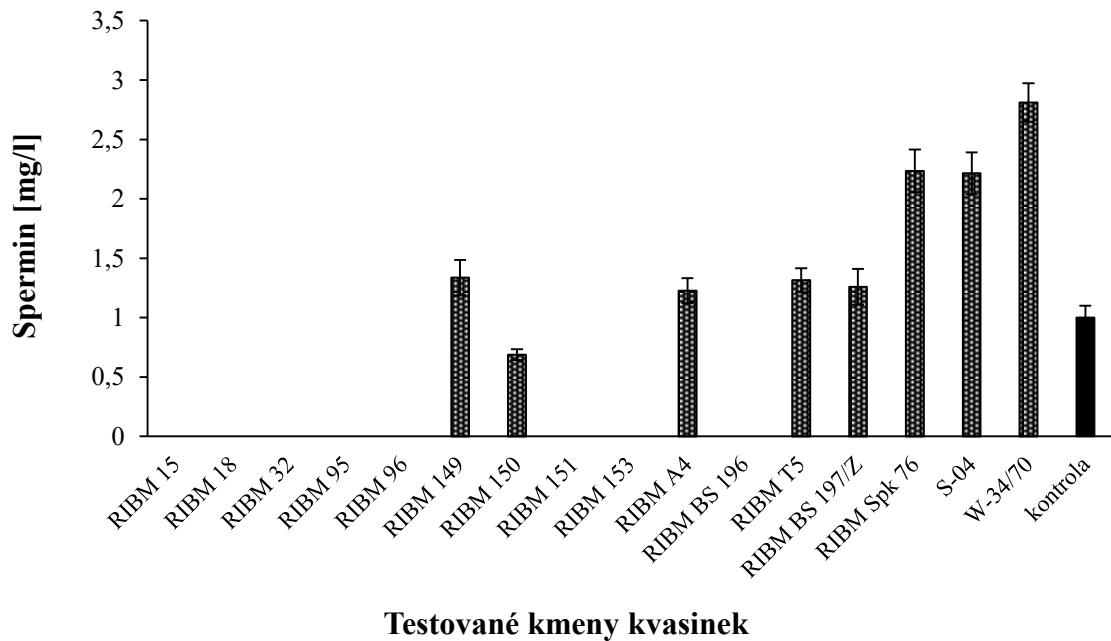


Obr. 36 Obsah spermidinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném tyraminem

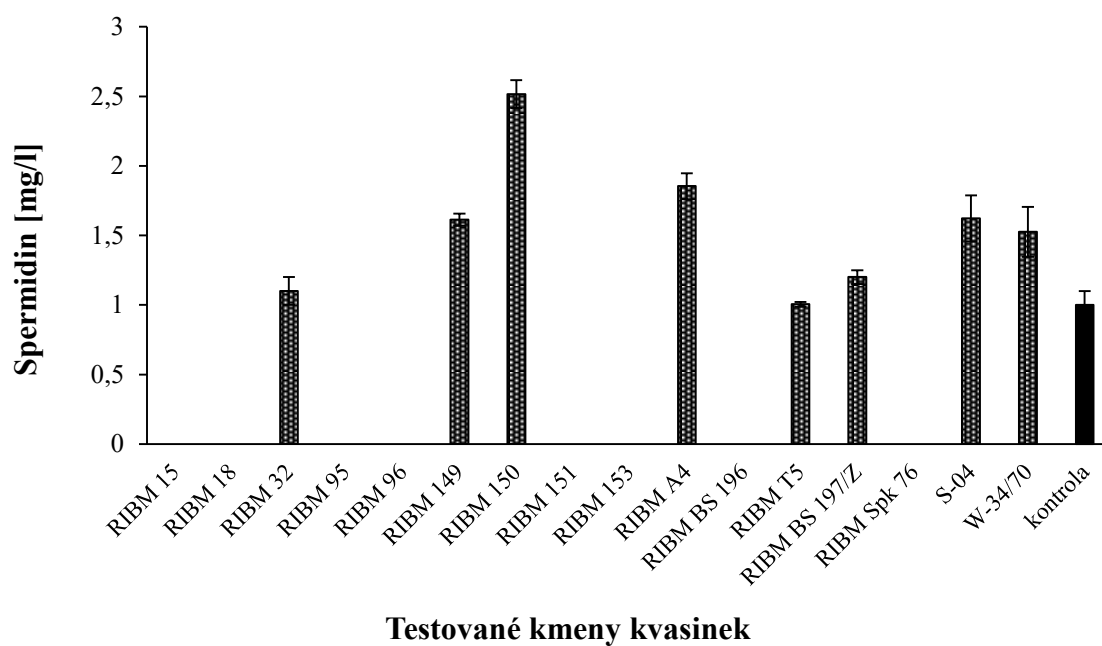
PŘÍLOHA P VIII: OBSAH BA A PA V ŽIVNÉM MÉDIU S VYBRANÝMI BA



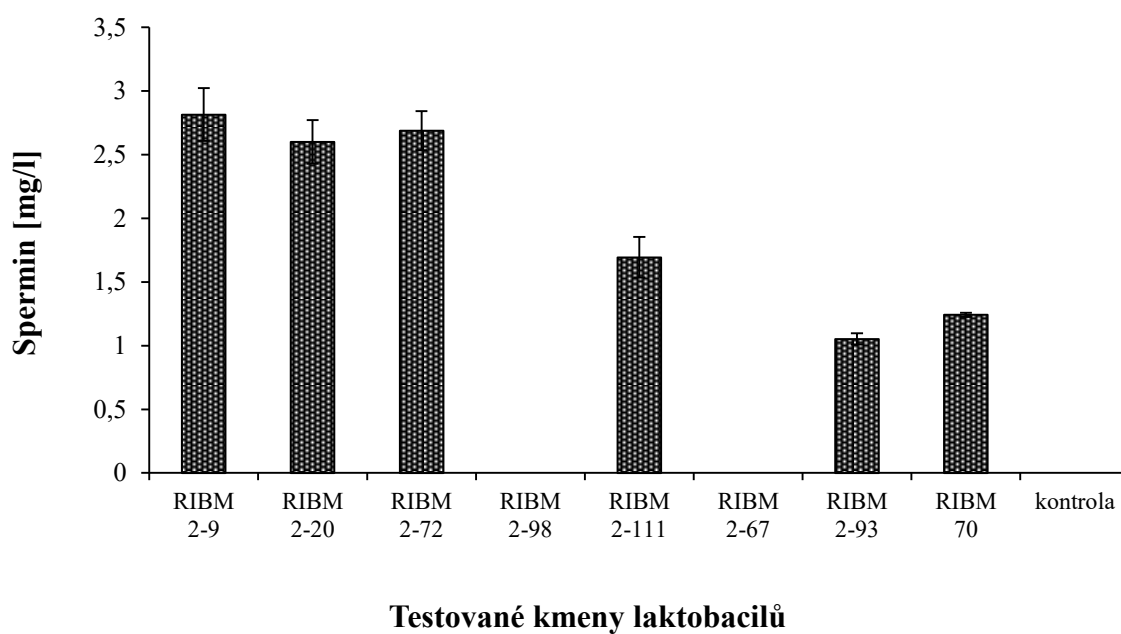
Obr. 37 Obsah tryptaminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA



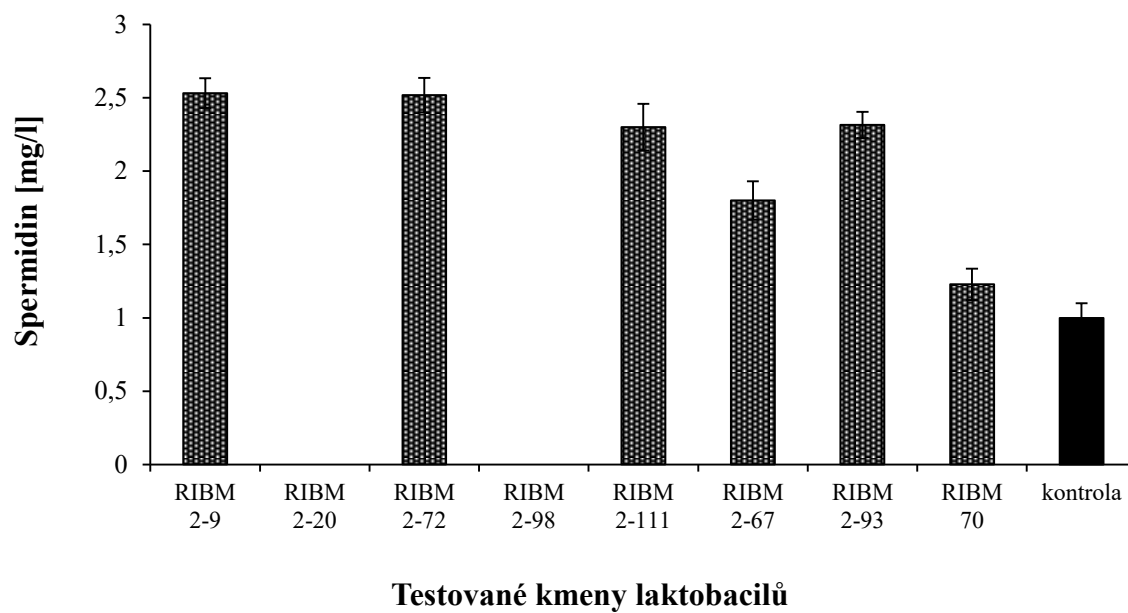
Obr. 38 Obsah sperminu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA



Obr. 39 Obsah spermidinu po kultivaci kvasinek po dobu 72 hod při 30 °C v MALT médiu suplementovaném BA



Obr. 40 Obsah sperminu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA



Obr. 41 Obsah spermidinu po kultivaci laktobacilů po dobu 72 hod při 30 °C v MRS médiu suplementovaném BA