Schopnost produkce biogenních aminů vybranými kmeny kvasinek

Bc. Zuzana Haasová

Diplomová práce
2016

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Zuzana Haasová**
Osobní číslo:	**T15979**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie potravin**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Schopnost produkce biogenních aminů vybranými kmeny kvasinek**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Biogenní aminy a jejich vznik dekarboxylační aktivitou mikroorganizmů.**
2. **Kvasinky a tvorba biogenních aminů.**
3. **Výskyt biogenních aminů ve slabě alkoholických nápojích a jejich původci.**

II. Praktická část

1. **Stanovení produkce biogenních aminů vybranými kmeny rodu Saccharomyces.**
2. **Zpracován výsledků.**
3. **Zhodnocení významu produkce kmeny Saccharomyces v rámci běžného výskytu biogenních aminů v pivu a ve víně.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] CARUSO, M., C. FIORE, M. CONTUSI, G. SALZANO, A. PAPARELLA a P. ROMANO, 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology, roč. 18, s. 159–163. ISSN: 0959-3993.
[2] BASAŘOVÁ G., J. ŠAVEL, P. BASAŘ a T. LEJSEK, 2010. Pivovarství - Teorie a praxe výroby piva, VŠCHT PRAHA. ISBN 978-80-7080-734-7.
[3] TORREA GONI, Diego a Carmen ANCÍN AZPILICUETA, 2001. Influence of Yeast Strain on Biogenic Amines Content in Wines: Relationship with the Utilization of Amino Acids during Fermentation. American Journal of Enology and Viticultur, roč. 52, s. 185–190. ISSN: 0002-9254.
[4] KALAČ Pavel a Martin KŘÍŽEK, 2003. A review of biogenic amines and polyamines in beer. Journal of the institute of Brewing, roč. 109, s. 123–128. ISSN: 2050-0416.
[5] DADÁKOVÁ E., P. KŘÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ, 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Food Chemistry, roč. 116, s. 365–370. ISSN: 0308-8146.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. dubna 2016**

Ve Zlíně dne 2. února 2016

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

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

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

Příjmení a jméno: HAASOVÁ LUŽANA 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 11.5.2016 Haasová L.

[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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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 dekarboxylázovou aktivitou vybranými kmeny kvasinek (44 kmenů) získaných z ústavu Pivovarského a sladařského v Praze. Produkce biogenních aminů a polyaminů byla sledována za podmínek *in vitro*. Vzhledem k nedostatku studií zaměřených na produkci biogenních aminů kvasinkami byl, v rámci praktické části této práce, uskutečněn screening produkce biogenních aminů či případné degradace vybranými kmeny. Biogenní aminy a polyaminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s předkolonovou derivatizací dansylchloridem. Studované kmeny nejhojněji produkovaly tyramin a spermin. Nejvyšší stanovená hodnota tyraminu byla detekována u kmene *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 11 (39,14±6,24 mg/l), nejvyšší koncentraci sperminu vyprodukoval kmen *Saccharomyces pastorianus* RIBM 153 (43,21±4,39 mg/l) při teplotě kultivace 30 °C v médiu MB s faktory simulující prostředí piva.

Klíčová slova: biogenní aminy, polyaminy, kvasinky, pivo

ABSTRACT

This thesis was dealing with the decarboxylase aktivity of selected yeast strains (44strains) obtained from the Institute of Brewing and Malting in Prague. Production of biogenic amines and polyamines was studied under *in vitro* conditions. Due to the lack of studies on the production of biogenic amines by yeast was in the practical part of this thesis implemented screening for the production of biogenic amines or possible degradation of selected strains. Biogenic amines and polyamines were determined by high performance liquid chromatography with UV detection with precolumn derivatisation dansyl chlodire. Studied strains most widely produced tyramine and spermine. The highest value determined value tyramine was detected in strain *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 11 (39,14±6,24 mg/l), the highest concentration of spermine produced strain Saccharomyces pastorianus RIBM 153 (43,21±4,39 mg/l) at a cultivation temperature of 30 °C in a medium with factors simulant beer.

Keywords: biogenic amines, polyamines, yeast, beer

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Ing. Evě Lorencové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, ochotu, trpělivost a podporu při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala laborantce Ing. Ludmile Zálešákové za spolupráci a pomoc v laboratořích při měření praktické části.

Další mé velké poděkování patří panu Ing. Pavlovi Buriánovi a Haně Haasové za podporu a umožnění studovat na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

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 POLYAMINY **14**

1.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ 14

1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ 16

1.2.1 Dekarboxylázy 17

1.2.2 Degradace biogenních aminů a polyaminů 18

1.3 PODMÍNKY PRO VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ 18

2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V PIVU **21**

2.1 BA V SUROVINÁCH PRO VÝROBU PIVA 21

2.2 VÝSKYT BA BĚHEM VÝROBY 22

2.3 BA V KONEČNÝCH PRODUKTECH 22

3 SCHOPNOST TVORBY BIOGENNÍCH AMINŮ KVASINKAMI **25**

4 PIVOVARSKÉ KVASINKY **27**

4.1 DIVOKÉ KVASINKY 28

4.2 VÝŽIVA A METABOLIZMUS KVASINEK 29

II PRAKTICKÁ ČÁST **31**

5 CÍL PRÁCE **32**

6 MATERIÁL **33**

6.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY 33

6.2 ZAŘÍZENÍ, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE A POMOCNÉ LÁTKY 33

6.3 DEKARBOXYLAČNÍ MÉDIA 34

7 METODIKA **35**

7.1 SCREENING SCHOPNOSTI PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENY KVASINEK 35

7.1.1 Odběr vzorků pro analýzu 37

7.2 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ 37

8 VÝSLEDKY **39**

8.1 SCREENING PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI KMENY KVASINEK 39

9 DISKUZE **48**

ZÁVĚR **52**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **53**

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK **63**

SEZNAM OBRÁZKŮ **64**

SEZNAM TABULEK **66**

SEZNAM PŘÍLOH.....67

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které jsou přirozeně obsaženy v mnoha fermentovaných potravinách a nápojích, kde jsou produkovány zejména prostřednictvím mikrobiální dekarboxylaci aminokyselin [1].

Biogenní aminy vznikají z aminokyselinových prekurzorů, jako jsou například histidin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin, lyzin, cystein, arginin, ornitin, spermin, spermidin, putrescin a další [2]. Produkty dekarboxylace a látky, které z primárních aminů dále vznikají, se uplatňují jako hormony, neuromediátory, jako stavební kameny pro syntézy složitějších látek (fosfolipidy, koenzym A, …) [3].

Biogenní aminy a polyaminy představují skupinu látek, které pokud jsou obsaženy v potravinách, mohou představovat pro spotřebitele toxikologické riziko. Jejich monitoring v potravinách je v současnosti aktuálně řešenou problematikou. Jsou přítomny téměř v každé potravině v denní stravě, jako jsou například sýry, zelí, uzeniny, ryby, sójové omáčky, maso, čokoláda, víno, pivo atd. [4].

Biogenní aminy a polyaminy obsažené v pivu lze rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny můžeme zařadit aminy, které lze považovat za přírodní složky piva (putrescin, spermidin spermin a agmatin). Do druhé skupiny můžeme zařadit histamin, tyramin, a kadaverin, které vznikají během hlavního kvašení piva [5, 6].

Konzumace piva v České republice je vysoká a může způsobovat zdravotní problémy právě u některých citlivějších jedinců. V pivu se totiž kromě těchto substancí nachází i etanol, který interferuje s detoxikačním systémem. Negativní ovlivnění zdravotního stavu konzumentů piva však nemusí být způsobeno jen vysokým obsahem aminů v pivu, ale konzumací většího množství tohoto nápoje během krátkého časového úseku [5, 6].

Mezi mikroorganizmy, které mají schopnost produkovat biogenní aminy a polyaminy, patří nejčastěji grampozitivní a gramnegativní bakterie různých druhů a rodů. I když se zdá, že většina studií přikládá vznik aminů právě bakteriím, i kvasinky vykazují dekarboxylázovou aktivitu a mají velký potenciál pro tvorbu aminů, jako jsou například putrescin a kadaverin [7].

Tato práce byla zaměřena na aktuální problematiku týkající se dekarboxylázové aktivity pivovarských a divokých kvasinek, zda jsou schopny produkovat či naopak degrado-

vat biogenní aminy a polyaminy. Vzhledem k tomu, že v České republice není stanoven legislativní limit pro obsah biogenních aminů v pivu a konzumace tohoto nápoje je u nás vysoká, je třeba sledovat koncentrace aminů, jak v celém výrobním procesu, tak v konečných produktech.

I. TEORETICKÁ ČÁST

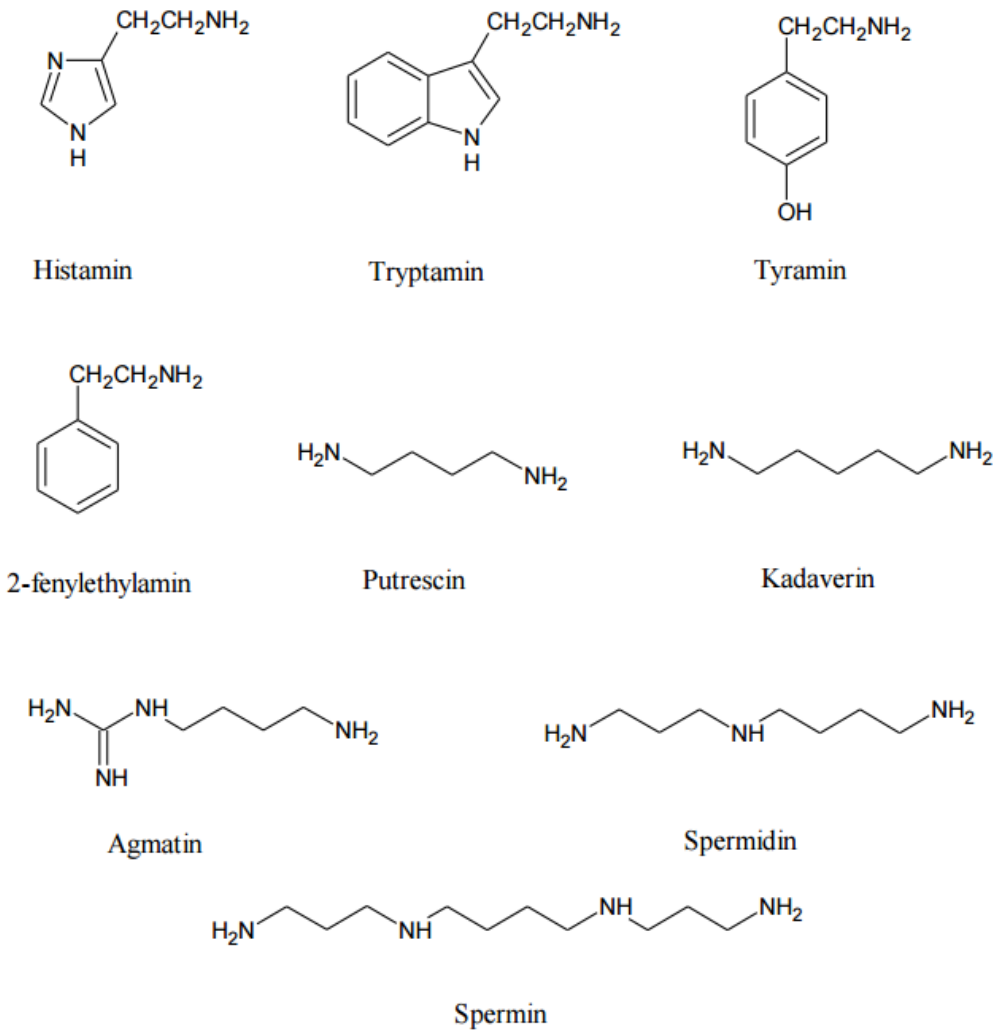
1 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY

1.1 Charakteristika biogenních aminů a polyaminů

Biogenní aminy (dále jen BA) jsou dusíkaté sloučeniny přirozeně vyskytující se v rostlinných, mikrobiálních a živočišných buňkách. Mohou být detekovány jak v použitých surovinách pro další zpracování, tak ve zpracovaných potravinách. V mikrobiologii potravin bývají spojovány buď s kažením potravin, nebo fermentačními procesy. Výskyt BA v nefermentovaných potravinách slouží jako ukazatel kažení [1, 8, 9]. Mezi nejčastěji vyskytující se BA řadí histamin, tryptamin, fenyletylamin, tyramin, někteří autoři zařazují i kadaverin. Častěji je však kadaverin řazen mezi polyaminy spolu s putrescinem, sperminem, spermidinem a případně agmatinem (Obr. 1) [10, 11]. Dříve byly mezi BA řazeny i polyaminy. Od roku 1990 jsou klasifikovány jako samostatná skupina, a to díky způsobu jejich vzniku. [12, 13].

BA představují skupinu aminů, které mají významné fyziologické a farmakologické účinky [14]. Patří do skupiny neurotransmiterů, včetně katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu a adrenalinu), indolaminu (serotonin) a imidazolu (histamin) [3]. Zajišťují řadu důležitých fyziologických funkcí. V nadměrném množství však tvoří skupinu nežádoucích přírodních složek rozšířených v potravinách či nápojích, jako jsou např. ryby, maso a masné výrobky, sýry, víno, rostlinné produkty a v neposlední řádě v pivu. Vyšší příjem BA konzumací piva nemusí být způsoben samostatným vysokým obsahem BA v pivu, ale spíše vyšší spotřebou tohoto nápoje v průběhu velmi krátkého časového intervalu. V jednotlivých zemích jsou nejvýše přípustné obsahy BA stanoveny různě. Limit pro obsah BA v pivu není v České republice stanoven. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. stanovovala nejvyšší přípustné množství histaminu 20 mg/kg v pivu a vínu. Ta však byla zrušena. Konzumace potravin či nápojů, které obsahují vysoké koncentrace BA, může způsobit bolesti hlavy, hypo- nebo hypertenzi, ve vážných případech krvácení či dokonce i smrt. [14, 15, 16].

Toxicita některých BA obsažených v alkoholických nápojích (pivo, víno) může být podporována právě obsahem etanolu. Metabolické cesty BA a případná konzumace alkoholu postupuje stejným enzymatickým systémem, proto může dojít k synergické interakci mezi etanolem a BA a tím pádem se může zvýšit toxický účinek některých aminů [17, 18].



Obr. 1: Nejčastěji vyskytující se biogenní aminy a polyaminy [19]

Vezmeme-li v úvahu jejich chemickou strukturu a možné důsledky, lze BA rozdělit do tří skupin na:

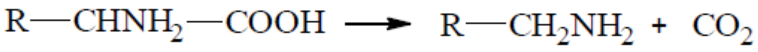
a) Aromatické, heterocyklické aminy, jako například histamin, tyramin, 2-fenylethylamin a tryptamin (Obr.1), jsou řazeny mezi biologicky aktivní aminy, které mají významné fyziologické účinky. Mohou způsobovat nevolnost či bolesti hlavy. Například histamin, vznikající z histidinu, se podílí na řadě alergických reakcí a na sekreci HCl v žaludku. Obecně se u histaminu považuje množství nad 100 mg/kg jako toxická koncentrace. U tyraminu až nad 1080 mg/kg [3, 4, 18].

b) Alifatické, di-, tri- a polyaminy tj. putrescin, kadaverin, spermin, spermidin a agmatin (Obr. 1). Mají stejný metabolický cyklus a zvyšují toxicitu aromatických a heterocyklických aminů. Polyaminy putrescin a kadaverin mohou být toxické již v koncentracích nad 2 mg/kg. Spermin a spermidin mohou působit negativně na organismus při koncentracích nad 600 mg/kg [4, 18].

c) Alifatické těkavé aminy tj. metylamin, etylamin a izoamylamin. U těchto aminů nebyly zaznamenány žádné toxické účinky, ale jejich stanovení je významné a to z důvodu, že mohou měnit organoleptické vlastnosti potravin [18].

1.2 Vznik biogenních aminů a polyaminů

BA vznikají z aminokyselin působením enzymů dekarboxyláz (EC.4.1.1.x), které jako kofaktor obsahují pyridoxalfosfát, nebo mohou vzniknout z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transamináz. Nejběžnějším způsobem syntézy BA je mikrobiální dekarboxylace aminokyselin. Obecné vyjádření reakce vzniku je znázorněno na Obr. 2 [8, 15, 16, 20, 21].



Obr. 2: Schéma dekarboxylace aminokyselin [22]

Obecně se předpokládá, že většina aminů vzniká dekarboxylací aminokyselin. Dekarboxylací však mohou vznikat jen primární aminy: histamin, tryptamin, fenyletylamin, tyramin, kadaverin a putrescin. Sekundární a terciální aminy jsou výsledkem dalších reakcí [3, 22, 23].

Při dekarboxylaci aminokyselin a přítomnosti pyridoxalfosfátu je nejdříve vytvořena „Schiffová báze“. Kladně nabité atomy dusíku pyridinového kruhu přitahují elektrony. Tímto se vytváří mezomerní stav, který může vzniknout jen, když je na alfa uhlíku atomu aminokyseliny eliminován substituent. Mezomerní mezistav se poté stabilizuje adicí na alfa uhlíku a hydrolýzou Schiffovy báze na primární amin [3, 22, 23]. Odstranění α-karboxylové skupiny z aminokyseliny vede odpovídající amin. Jména mnohých BA odpo-

vídají názvům svých původních aminokyselin: histamin z histidinu, tryramin z tyrosinu, beta-fenyletylamin z fenyletylalaninu, tryptamin z tryptofanu [24, 35].

BA jsou velmi reaktivní látky, které podléhají převážně změnám enzymaticky katalyzovaným. Kromě toho mohou podléhat oxidativní deaminaci (vznik aldehydů). Při působení zvýšených teplot mohou reagovat s triacylglyceroly a vznikají tak amidy mastných kyselin. Dále mohou vstupovat do reakcí neenzymového hnědnutí, při kterém vznikají jako primární produkty iminy. Z polyaminů, které reagují s oxidy dusíku, mohou vznikat i karcinogenní nitrózaminy. V alkoholických nápojích, jako je víno a další, se mohou objevit deriváty ß-karbolinu vznikající reakcí s tryptaminem a aldehydy [20]. Polyaminy se mohou nacházet nejen v potravinách rostlinného či živočišného původu, ale mohou se tvořit přímo v lidském těle v důsledku dekarboxylázové aktivity střevní mikroflóry, nebo intracelulární *de novo* syntézy [25].

1.2.1 Dekarboxylázy

Dekarboxylázy, podílející se na vzniku BA, jsou enzymy z třídy lyáz, které katalyzují odštěpení oxidu uhličitého z molekuly aminokyseliny (resp. její karboxylové skupiny) a vznikají tak BA (Obr. 2). Tento proces většinou probíhá za vyšších teplot a je to děj ireverzibilní [26]. Tyto enzymy se mohou přirozeně vyskytovat v potravinách, nebo mohou pocházet z činnosti dekarboxyláza-pozitivní mikroflóry [27].

V biosyntéze všech aminů je tedy klíčový enzym s dekarboxylázovou aktivitou: dekarboxylázy aromatických aminokyselin (DDC) pro serotonin, tryptofan, a dopamin, Histidin dekarboxylázy (HDC) pro histamin, arginin dekarboxylázy (ADC) pro agmatin a ornitin dekarboxylázy (ODC) pro putrescin [28; 29]. V rostlinách a některých mikroorganizmech existuje alternativní cesta produkce putrescinu z argininu přes agmatin. Lysin se dekarboxyluje podle lysin dekarboxylázy (ES 4.1.1.18) za vzniku kadaverinu, ačkoliv může být také tvořen ornitin dekarboxylázou (ES 4.1.1.17) v případě, že obsah ornitinu se nízký, ale obsah lysinu vysoký [24, 35].

Velmi specifickým rysem polyaminového metabolizmu je jejich cesta, umožňující nárůst velikosti molekul z putrescinu na spermidin a ze spermidinu na spermin postupným převodem aminopropylových skupin [28].

1.2.2 Degradace biogenních aminů a polyaminů

Toxicita BA je silně závislá na účinnosti detoxikace. Etanol významně snižuje aktivitu monoaminooxidázy, což vede k inhibici odbourávání BA z organizmu, a tím ke zvýšení jejich toxicity. To v konečném důsledku znamená, že BA mohou být obsaženy v tolerovaných množstvích, ale v přítomnosti etanolu a reakcí s ním se jejich účinek násobí [30]. Střední hodnota BA, která může být bez zdravotních komplikací přijímána, se pohybuje okolo 50 mg/kg [31].

Lidský organizmus je vybaven detoxikačním mechanizmem, který zajišťuje odbourávání endo- i exogenních BA. Jedná se o systém, který je přítomen hlavně ve střevním traktu v mitochondriích a je podpořen činností několika enzymů, monoaminooxidázy (MOA), diaminooxidázy (DAO) a histidinmethyltransferázy (HMT). Principem je degradace BA na fyziologicky méně aktivní formy. Nadměrný příjem BA či polyaminů může zatížit detoxikační metabolizmus natolik, že pak nemusí být schopen tyto látky degradovat a ty se následně ukládají v těle. Za normálních podmínek se u lidí BA vstřebávají působením aminooxidáz poměrně rychle, ale u citlivějších (alergických) jedinců je proces detoxikace narušen, protože aktivita aminooxidáz u těchto jedinců bývá obvykle nižší [4, 24].

1.3 Podmínky pro vznik biogenních aminů a polyaminů

Tvorba BA a polyaminů v potravinách je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou např. doba skladování surovin či potravin, pH prostředí, redox potenciál nebo obsah soli. U piva dále obsah BA ovlivňují vlastnosti chmele, teplota tepelného záhřevu při chmelovaru a pasterace piva, vodní aktivita, koncentrace etanolu, anaerobní podmínky, obsah sacharidů a živin, atd. [12, 32, 33, 34].

Mezi základní podmínky pro syntézu BA mikroorganizmy můžeme řadit:

- dostupnost volných aminokyselin v prostředí;
- přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganizmů;
- vhodné podmínky pro syntézu a růst mikroorganizmů [1, 20].

Přítomnost volných aminokyselin tzv. prekurzorů je jeden z hlavních faktorů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu v potravinách. Dostupné volné aminokyseliny poskytují substrát pro růst mikroorganizmů. Vyskytují se buď v potravinách, nebo mohou vznikat

prostřednictvím proteolýzy. Mikrobiální enzymy s vysokou proteolytickou aktivitou mohou potenciálně zvýšit riziko tvorby BA [24, 35].

Přísun kyslíku má také významný vliv na biosyntézu BA, protože na tvorbě BA se mohou podílet aerobní, anaerobní i fakultativně anaerobní mikroorganizmy. *Enterobacter cloacae* produkuje asi polovinu množství putrescinu v anaerobních podmínkách ve srovnání s aerobními podmínkami. *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje podstatně méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin za anaerobních podmínek [35]. Množství produkovaných BA fakultativně anaerobními mikroorganizmy by mělo být menší než v prostředí aerobním [20]. V pivu je obsah kyslíku pro růst mikroorganizmů nedostačující. Avšak existují mikroorganizmy (bakterie mléčného kvašení), které v pivu mohou růst a množit se [36].

Teplota ovlivňuje nejen růst a enzymatickou aktivitu mikroorganizmů, ale obecně platí, že obsah BA se zvyšuje s rostoucí teplotou díky proteolýze a dekarboxylaci. Suzzi a Gardini (2003) tvrdí, že mikrobiální dekarboxylázy jsou aktivní ještě při teplotě 15 °C, i když většina mikroorganizmů v průběhu skladování dosáhne stacionární fáze nebo je úplně inhibována [20; 37]. Optimální teploty růstu většiny mikrobiální populace s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou se pohybuje okolo 20 – 37 °C [35].

Etanol je jeden s faktorů mající inhibiční účinek na růst mikroorganizmů. Přítomnost etanolu v koncentraci 0,5 – 10 % (v/v) dělá pivo mikrobiálně stabilní, avšak do jaké míry působí etanol jako inhibitor, závisí také na teplotě a pH [38; 39]. Kaláč a Křížek ve své studii uvádí, že etanol v koncentracích okolo 4 % (v/v) působí pozitivně na dekarboxlázovou aktivitu [6]. Dle výsledků Glória a Izquierdo-Pulido lze tvrdit, že vyšší obsah etanolu může podporovat dekarboxylázovou aktivitu enzymů. Stanovily vyšší obsah BA (agmatin a putrescin) zejména u piv s vyšším obsahem etanolu [40].

Optimální hodnota pH je klíčová pro aktivitu dekarboxyláz. Aktivita dekarboxyláz je vyšší v kyselém prostředí, optimální hodnota pH je mezi 4,0 – 5,5. Z tohoto důvodu mohou být fermentované potraviny vhodným prostředím pro tvorbu aminů [24, 41]. Masson et al. (1997) se zabývali faktory ovlivňující produkci tyraminu izoláty *Carnobacterium divergens*. Zjistili, že přídavkem glukózy do média se snižovalo pH a zvýšil se obsah tyraminu. Přítomnost zkvasitelných cukrů zlepšuje dekarboxylázovou aktivitu mikroorganizmů, za optimální koncentraci je považováno 0,5 - 2 % (w/v) [34, 42]. Přítomnost využitelných

cukrů může způsobit snížení pH až na optimální hodnotu dekarboxylázové aktivity [43, 44].

Taktéž obsah solí ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu, tím pádem i produkci BA a PA [24]. Přítomnost rozpuštěných látek jako je například chlorid sodný může mít inhibiční tak i stimulační účinek na tvorbu BA. Záleží také na druhu příslušného mikroorganizmu [45]. Nižší koncentrace solí spíše tvorbu BA podporuje, se zvýšenou koncentrací chloridu sodného je to spíše naopak. Vyšší koncentrace chloridu může snížit schopnost mikroorganizmů tvořit histamin [22].

2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V PIVU

Zastoupení a koncentrace BA v pivu jsou ovlivněny především tím, zda byly použity kvalitní suroviny pro výrobu a technologickou praxí. Tím je myšleno to, zda nedošlo k selhání technologických postupů a jestli byly dodrženy dostatečně hygienické podmínky během vaření a skladování piva. Při kontaminaci surovin, meziproduktů a hotového piva hrozí nejen poškození hotového výrobku, ale výrobek pak představuje i potenciální nebezpečí poškození zdraví spotřebitele [18, 40, 48, 50].

Zvýšené obsahy těchto látek ve fermentovaných potravinách naznačují působení mikroorganizmů a proto je zde pravděpodobnější vyšší výskyt BA než u potravin nefermentovaných. [18, 47, 48, 50].

BA přítomné v pivě lze rozdělit do skupin podle jejich původu. Vysoké hladiny polyaminů, jako jsou putrescin, agmatin, spermin a spermidin se obvykle nacházejí ve sladu a lze je považovat za běžnou složku piva. Tyramin, 2-fenyletylalanin a jiné polyaminy byly stanoveny v chmelu, ale mají malý vliv na celkový obsah BA v pivu. Další skupina se vztahuje na aminy, které jsou generovány při rmutování a chmelovaru, například tryptamin, agmatin a kadaverin. Poslední skupina se skládá s histaminu, tyraminu a kadaverinu, jejich přítomnost v hotovém pivu z pravidla ukazuje aktivitu kontaminujících bakterií během výroby piva (kvašení) [6, 18, 40].

2.1 BA v surovinách pro výrobu piva

Obsah BA v surovinách pro výrobu piva (chmel, chmelové extrakty, slad, kvasinky, voda) by měl být velmi omezený. De Borba a Rohrer (2007) tvrdí, že slad je hlavní zdrojem aminů v pivu. V ostatních surovinách (chmel, kvasinky) je obsah relativně nízký. Putrescin, spermidin, spermin i agmatin jsou považovány za přírodní složky piva, které primárně pocházejí ze sladu [49]. V ječmeni byl hlavně zpozorován obsah putrescinu, tyraminu, sperminu, spermidinu i agmatinu [40]. V menším měřítku byly detekovány histamin, fenylalanin, treonin či kadaverin během klíčení ječmene. Avšak v průběhu několika dní se obsah může zvýšit o 3 – 5,5 mg/kg/den u putrescinu, spermidinu, sperminu i agmatinu. Intenzita klíčení, teplota, ale i odrůda ječmene mají vliv na konečné množství aminů ve sladu [6]. Halász et al. (1998) prokázali obsah BA v ječmeni, sladu i mladině. Stanovili významné množství agmatinu až 71 mg/l a putrescinu okolo 21 mg/l. Po fermentaci mladi-

ny obsah BA výrazně klesl [50]. Kalač, Hlavatá a Křížek uvádí, že slad obsahoval vyšší množství tyraminu až 24 mg/kg a histaminu až 17 mg/kg [51].

Obsah BA v chmelu může být v nižších koncentracích než ve sladu či kvasnicích. Avšak dle Ercan S. (2013) se v chmelu může objevit poměrně vysoké množství putrescinu, tyraminu, sperminu, spermidinu, agmatinu i fenyletylaminu [4]. Nicméně Kalač, Hlavatá, a Křížek (1997) uvedli relativně vysoké hladiny histaminu a tyraminu v extraktu chmelu, které byly mnohem vyšší oproti obsahům BA v sušeném chmelu a chmelových granulích [51].

2.2 Výskyt BA během výroby

Největší tvorba BA bývá pozorována během hlavního kvašení v procesu výroby piva a to nejčastěji přítomností tyraminu, histaminu a kadaverinu. Během fermentačního procesu vznikají BA díky působení dekarboxyláz nebo dalšími biochemickými reakcemi během kvašení a dokvašování piva. Dochází ke změně obsahu CO_2, pH a také vznikají další látky, se kterými BA reagují, což může podpořit aktivitu bakterií mléčného kvašení, jelikož kvasinky vylučují růstové faktory (vitamíny, dusíkaté báze, aminokyseliny, atd.) do mladiny. Hladiny putrescinu a agmatinu se mohou snížit při rmutování. Nebylo prokázáno, že k tvorbě tyraminu či histaminu během fermentace napomáhají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, či by obsah nějak razantně ovlivňovaly. Produkce BA během procesu vaření piva bývá nejčastěji spojována s činností bakterií mléčného kvašení [6, 49, 66]. Avšak ve studii Halász, Baráth a Holzapfel (1998) zpozorovali během fermentace významný pokles putrescinu a agmatinu a mírný nárůst kadavedinu, který mohl být právě způsoben v důsledku autolýzy kvasinek a nárůstu obsahu aminodusíku a pH [57].

Zvýšené množství BA lze očekávat u piva kontaminovaného mléčnými bakteriemi během výroby, při nedostatečné eliminaci během filtrace a jejich nedostatečné inaktivace při pasteraci [52].

2.3 BA v konečných produktech

Nejhojněji se v pivu vyskytuje tyramin, ale i histamin, putrescin a fenyletylamin. V několika posledních letech byly shromážděny údaje o výskytu BA v různých typech piv převážně z evropských zemí. Zjištěné aminy byly rozděleny do dvou skupin. První skupina

zahrnovala putrescin, spermin, spermidin a agmatin a byly považovány za přirozeně vyskytující se složky pocházející převážně ze sladu. Druhá skupina zahrnovala histamin, tyramin a kadaverin charakterizující činnost kontaminujících bakterií mléčného kvašení během vaření piva [6]. Nejen BMK mohou být hlavními producenty BA. Kalač et al. (1997) i Halász et al. (1997) tvrdí, že schopnost produkce BA mají i pivovarské kvasinky a jejich opakované využití ve výrobě může obsah některých BA zvýšit. Toto tvrzení se rozchází s tvrzením Izquirdo-Pulido et al. (1996), který uvádí, že pivovarské kvasinky nemají schopnost produkce histaminu a tyraminu a jejich opakované využití nemá žádný vliv na tvorbu BA [50, 51, 53].

Značné množství BA bylo zjištěno výzkumníky Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích ve spolupráci s Budějovickým Budvarem, konkrétně obsah tyraminu a histaminu, které se tvoří v lahvovém pivu působením mléčných bakterií, které přežily nedostatečnou pasteraci. K tvorbě aminů docházelo i v plechovkách a sudech [52]. Buňka et al. (2012) zjistili, že skoro 25 % testovaných českých piv obsahovalo nad 100 mg/l BA, a to převážně tyramin, putrescin a kadaverin. U 6 % vzorků byly hodnoty BA nad 200 mg/l [54].

U piv s vyšší kyselostí, která jsou vhodná pro činnost bakterií mléčného kvašení, byly zpozorovány vyšší hladiny tyraminu a histaminu. Vyšší hladina BA byla také zaznamenána u piv svrchně kvašených a spontánně kvašených belgických. Jednalo se hlavně opět o tyramin a histamin, ale i tryptamin a fenyletylamin. Tento druh piv může představovat nejvyšší riziko u pacientů, kteří byli léčení inhibitory MAO. U těchto pacientů může představovat obsah tyraminu okolo hodnot 6 – 10 mg/l za nebezpečný. Alkohol a přítomnost BA v pivu umocňují toxicitu tyraminu. Naopak u zdravých jedinců hladiny tyraminu okolo 10 mg/l nepředstavují riziko. Bezpečnostní limit pro příjem BA pivem byl stanoven hromadně pro histamin, fenyletylamin, tyramin a kadaverin na 20 mg/l. [6, 55].

V roce 2003 bylo odebráno 17 vzorků polských piv z tržní sítě, kde byla zjištěna ve všech vzorcích přítomnost sperminu (0,36-15,24 mg/ml), spermidinu (0,58-9,28 mg/ml), putrescinu do 3 mg/ml a tyraminu do 5 mg/ml. Kadaverin byl detekován v maximálním množství do 0,8 mg/ml v 11 vzorcích. Histamin detekovali v pěti vzorcích a tryptamin v 8 vzorcích. Nízká hladina BA ve vzorcích tedy svědčí o dobré jakosti vstupních surovin a o pečlivém dodržování technologických a hygienických postupů [56].

Značný vliv na obsah BA v lahvovém pivu má doba skladování. Kalač, Hlavatá a Křížek (1997) detekovali významný obsah zejména tyraminu. Výskyt BA v lahvovém pivu jako tyramin, histamin a kadaverin způsobují především kontaminující bakterie mléčného kvašení. Rovněž byl potvrzen obsah tyraminu a histaminu, tvořeny především laktobacily, které mohou přežívat nedostatečnou pasteraci piva [4, 5, 51].

Halász et al. (1998) stanovili BA u náhodně vybraných vzorků piv. Vyhodnotili celkový obsah BA v rozmezích 30-250 mg/l. Koncentrace histaminu u některých vzorků výrazně překročila mezní hodnotu 2 mg/l (3-26 mg/l) [50].

3 SCHOPNOST TVORBY BIOGENNÍCH AMINŮ KVASINKAMI

Některé kvasinky jsou schopny prokazatelně tvořit BA. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mohou produkovat významné množství etanolaminu a agmatinu. Druhy *Kloeckera apiculata, Candida stellata, Metschnikowia pulcerrima, Brettanomyces bruxellensis* mohou produkovat BA v hroznovém moštu [58].

Caruso et al. (2002) sledovali 50 kmenů kvasinek různých druhů a jejich schopnost produkovat BA. Zjistili, že všechny druhy vyprodukovaly zanedbatelné množství histaminu, putrescinu, kadaverinu a tryptaminu, méně než 4 mg/l. Nejvyšší koncentrace celkových BA produkovaly druhy *Brettanomycesbrucellensis* s průměrnou hodnotou 15 mg/l, následoval druh *Saccharomyces cerevisiae* s obsahem 12,14 mg/l. Ostatní druhy tvořily méně než 10 mg/l celkových BA. Vína fermentovány s největším počtem kmenů *S. cerevisiae* měly nejvyšší obsah etanolaminu, pohybující se v rozmezí od 2,3 do 16 mg/l a agmatinu od 3,1 do 7,5 mg/l. Významná změna v produkci kadaverinu byla detekována u kmene *Candida stellata.* Kmeny *Kloeckera apiculata* a *Metschnicowia pulcherrina* prokázaly rozdílnosti v produkci fenyletylaminu a agmatinu [59]. Podle Soufleros et al. (1998) mohou být některé aminy ve víně výsledkem kvasinkové fermentační aktivity [60].

Torrea Goni et al. (2001), kteří se ve své studii zabývali vlivem různých kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* na koncentraci BA v růžových vínech a vztahem mezi koncentracemi těchto aminů a využití jejich prekurzorů aminokyselin v průběhu fermentace, tvrdí, že v závislosti na kmenu kvasinek došlo k mírnému rozdílu v obsahu BA. Vyšších koncentrací BA, přesto nebylo dosaženo. Závislost mezi obsahem BA ve víně a využití jejich prekurzorů v průběhu fermentace nebyla potvrzena [61]. Široké spektrum dostupné literatury přikládá tvorbu BA bakteriím mléčného kvašení ve fermentovaných potravinách. Stále není zcela jasné, zda aminy přítomné ve víně, tak i v ostatních potravinách, jsou výsledkem aktivity kvasinek nebo bakterií mléčného kvašení, jak tvrdí výše citované studie Caruso et al. (2002) a Soufleros et al. (1998) [59, 60].

Ve studii Constatini et al. (2009) byla sledována produkce BA kontaminujícími bakteriemi, které byly nalezeny ve startovacích kulturách používaných při výrobě vína. Překvapivě starterové kultury *Saccharomyces cerevisiae* byly schopny produkovat tyramin a histamin. Z toho důvodu, provedli další analýzu pro určení, zda samotné kvasinky mají schopnost produkovat BA, nebo zda byla produkce BA způsobená bakteriální kontaminací. Constantini et al. (2009) tvrdí na základě výsledků, že žádná z testovaných čistých kvasin-

kových kultur nebyla schopna produkovat aminy [62]. Tyto výsledky se shodují s těmi, které uvádí Landete, J. M. et al., ti nezpozorovali produkci BA kvasinkami v syntetickém médiu nebo ve víně během alkoholového kvašení [63].

Ve studii Cerutti et al. (1985) která se zabývala produkcí BA mikroorganizmy v potravinách, zkoumali vliv technologických podmínek výroby piva na tvorbu BA. Produkce BA byla stanovena u 40 italských piv a u 2 vzorků z chmelového extraktu. V zanedbatelných koncentracích byli přítomni kadaverin, fenyletylamin. tryptamin a putrescin. Rovněž byl studován vliv *Lactobacillus brevis* a *Saccharomyces uvarum* na obsah BA. *L. brevis* produkoval putrescin a tyramin, zatímco *S. uvarum* aminy neprodukovaly [64].

I Halász et al. (1994) sledoval produkci BA u komerčních kmenů pivovarských kvasinek používaných v průmyslu. Žádný z kmenů neprodukoval histamin. Avšak dle získaných výsledků byl hojně zastoupen obsah spermidinu (79-189 mg/100g), putrescinu (25-55 mg/100g), kadaverinu (13-28 mg/100g), jen u jednoho z kmene byl detekován i obsah sperminu (56 mg/100g). Což mohlo být způsobeno případným obsahem bakterií mléčného kvašení kontaminující pivovarské kvasinky [46, 50].

Wei Qi et al. (2014) sledovali vliv soli na halotolerantní kvasinky *Candida versatilis* a *Zygosaccharomyces rouxii*, zda jsou schopny produkovat BA v průběhu fermentace sójové omáčky. V práci se zaměřili na změny obsahů BA, jako histamin, tyramin, kadaverin a spermidin, v průběhu celého fermentačního procesu. Výsledky ukázaly, že obsahu BA dominoval tyramin. Koncentrace BA v sójové kaši po fermentaci byla u kmene *Zygosaccharomyces rouxii* 122,71 mg/kg a u *Candida versatilis* 69,96 mg/kg [65].

Některé kmeny, jako jsou *Debaryomyces hansenii* nebo *Yarrowia lipolytica,* jsou schopny degradovat BA, zejména etanolamin. Kmeny *D. hansenii* metabolizují široké spektrum BA hlavně v rostoucích a klidových buňkách. Lze říci, že kvasinky kmenů *D. hansenii* mohou být vhodné jako startovací kultury pro snížení BA ve fermentovaných potravinách [58].

4 PIVOVARSKÉ KVASINKY

Termín kvasinky je většinou používán v laboratorním měřítku, zatímco termín kvasnice nebo várečné kvasnice se označuje aktivní biomasa většího množství kvasinek využívaných v provozu. Průmyslová i domácí výroba piva, vína i jiných alkoholických nápojů se opírá o cílené využívání kvasinek, převážně druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Nicméně existují i jiné kvasinky zapojující se do fermentačních procesů využívaných při výrobě spontánně kvašených piv. Výrobní proces předpokládá použití standardních kvasnic s dobře definovanými vlastnostmi, pokud možná neměnnými i při opakovaném nasazení. Kvasnice jsou surovinou kontrolovatelnou jednoduchými metodami a kvalitní kvasnice zaručují bezproblémovou výrobu kvalitního nápoje [66, 67, 68].

Původní název rodu pivovarských kvasinek pochází z roku 1837 od Schwanna (*Zuckerpils* – cukerná houba). Tyto kvasinky v roce 1838 označil berlínský botanik J. F. Meyen názvem *Saccharomyces cerevisiae.* [66]. Podle European Brewery Convection (EBC) jsou pivovarské kvasinky definovány jako kulturní kvasinky používané k produkci spodně nebo svrchně kvašených piv [69]. Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganizmy, které jsou zařazeny dle taxonomie do nadříše *Eukaryota*, říše *Fungi,* třídy *Ascomycetes,* čeledě *Saccharomycetaceae* a podčeleď *Saccharomycoideae.* Podle oficiální taxonomie nejsou dále jednoznačně odlišovány kvasinky pivovarské od divokých (cizích) [67].

Průmyslová výroba piva, ale i dalších alkoholických nápojů, značně závisí na cíleném využití kvasinek. K výrobě piv nejlepší kvality je zapotřebí vysoce kvalitních pivovarských kvasinek. Takové pivovarské kvasnice zajistí optimální kvašení a konečný produkt bude mít požadovanou chuť, barvu, vůni a obsah alkoholu. V pivovarnictví se využívají dva hlavní druhy kvasinek. Mluvíme o kvasinkách pro spodně kvašené pivo a pro tzv. svrchně kvašené pivo [70, 71]. V České republice a ve většině zahraničních zemí se vyrábí piva spodním kvašením, se svrchně kvašenými pivy se můžeme setkat v podobě pšeničného piva [67].

Spodní pivovarské kvasinky *S. pastorianus (*popř. *carlsbergensis*. *uvarum)* se používají při výrobě piva typu ležáků, kvašení probíhá v teplotním rozmezí 7 - 15 °C po dobu dvou týdnů se sedimentací kvasnic na dně kvasné nádoby [66, 72].

Svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* se používají při výrobě piv typu „ale“, „porter“, „stout“, s teplotním rozmezím během hlavního kvašení 18 – 22 °C po dobu 4 až 6 dní, často s vynášením kvasnic do kvasničné deky [66].

Základní rozdíly mezi spodními a svrchními kvasinkami jsou:

- Rozdílné složení genetického materiálu;
- Kvasinky spodního kvašení na konci kvašení sedimentují na dně kvasných nádob, kvasinky svrchního jsou bublinami CO_2 vynášeny na povrch mladiny;
- Stupeň zkvašování α-rafinósy– spodní kvasinky zkvašují rafinósu úplně, kdežto svrchní pouze cca z jedné třetiny;
- Nižší schopnost sporulace u spodních kvasinek;
- Rozdílné technologicky významné vlastnosti – tvorba senzoricky významných látek;
- Vyšší maximální teplota růstu u svrchních kvasinek;
- Vyšší tepelná odolnost svrchních kvasinek [66, 67].

4.1 Divoké kvasinky

Pojmem „divoké“ nebo „cizí“ kvasinky jsou označovány kvasinky jiné než kulturní pivovarské kvasinky. Divoké kvasinky se mohou nacházet v pivu v různých fázích výroby piva. Nejčastější problémy však způsobují při hlavním kvašení produkcí nežádoucích chutí a aromat [73, 75]. V širším slova smyslu lze mezi divoké kvasinky řadit i kulturní kvasinky přítomné v jiné části výrobního procesu než je kvašení a dokvašování tedy, které nejsou využívány úmyslně a nejsou plně pod kontrolou. [76].

Dalšími projevy kontaminace může být zpomalení nebo zastavení kvašení, nebo hlubší prokvašení hotového piva. Takové pivo pak obsahuje jen minimum zbytkového extraktu a vyšší koncentrace alkoholu. Mezi divoké kvasinky pak můžeme řadit i kmeny s nežádoucími technologickými vlastnostmi, mluvíme o kmenech produkující toxiny nebo respiračně deficitní mutanty [77].

Divoké kvasinky jsou běžně rozdělovány do dvou skupin, a to kvasinky rodu *Saccharomyces* a kvasinky jiných rodů tzv. non-*Saccharomyces*, ty mohou pivu dodat různé

pachutě a příchutě [73, 78]. Při výrobě některých piv, zejména svrchně kvašených, mohou být některé příchutě výhodou, jako například kyselina ferulová, která je dekarboxylována na 4-vinylguajakol, typická příchuť (hřebíček) pšeničných piv. Pro ostatní druhy piv může být nežádoucí složkou [79].

Divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* mohou být považovány za více rizikové než non-*Saccharomyces*. A to zejména pro svou omezenou schopnost růstu a množit se za anaerobních podmínek a fermentovat cukry. Tyto kvasinky pokud nejsou z piva odstraněny pasterací nebo mikrofiltrací, mohou v pivu přežívat. Jejich přítomnost může svědčit o nízké hygienické praxi [75]. Mnohé z nich jsou schopné růst anaerobně a mohou tedy konkurovat kulturním kvasinkám při kvašení cukrů obsažených v mladině, za současné produkce nežádoucích aromatických látek. Schopnost produkovat fenolické látky dekarboxylací fenolických kyselin mladiny je charakteristická pro amylolytické (tj. kvasinky schopné štěpit dextriny) i ostatní divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* [74].

Mezi non-*Saccharomyces* kvasinky lze zařadit kvasinky rodu *Brettanomyces, Candida, Debaryomyces, Dekkera, Filobasidium, Hanseniaspora, Kloeckera, Kluyveromyces, Pichia, Rhodotolura, Torulaspora, Zygosaccharomyces* a mnoho dalších [74, 75].

Belgické pivo Lambic se vyrábí z ječného a ze 40 % podílu pšeničného sladu. Rozdíl oproti normálním pivům (kvašeným kontrolovaně pivovarskými kvasnicemi) je v tom, že se nechává spontánně kvasit mikroorganizmy přítomnými ve vzduchu a to zejména kvasinkami typu *Brettanomyces* a dalšími mikroorganizmy: kvasinky *Saccharomyces*, laktobacily, octové bakterie, enterobakterie a *Pediococcus* [80]. *Brettanomyces* mohou mít pozitivní vliv na celkové aroma fermentovaných nápojů. Využívají se hlavně u speciálních typů piv v Belgii, ale i v některých menších pivovarech po celém světě, které se jimi inspirovali [81]. Kmeny kvasinek *Torulaspora delbrueckii* jsou schopny výrazně měnit chuť a vůni chmele v pivu a využívá se v pivovarnictví pro fermentaci pšeničného piva [82, 83].

4.2 Výživa a metabolizmus kvasinek

Metabolizmus pivovarských kvasinek je ovlivňován složením mladiny, vlastnostmi kvasnic a podmínkami procesu [67]. Zahrnuje procesy katabolické, kdy buňky biochemickým odbouráváním získávají energii a následně ji spotřebovávají na tvorbu nových nezbytných látek – anabolizmus. Pro průběh těchto procesů je nezbytný přísun živin do kvasničné

buňky. Buňky kvasinek přijímají živiny celým svým povrchem a o tomto procesu rozhodují vlastnosti cytoplasmatické membrány, která tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a okolním prostředím a je chráněna buněčnou stěnou. Hlavní mechanizmy přenosu živin do kvasničné buňky se dělí na pasivní a aktivní transport. Důležitější je transport aktivní, který se podílí na přenosu anorganických iontů a jednoduchých sloučenin jako jsou sacharidy a aminokyseliny [66, 67].

Kvasinky jsou heterotrofní organizmy, jejichž přírodními stanovišti jsou povrchy rostlinných tkání, včetně květin a ovoce. Nejsou nutričně náročné, jejich hlavními zdroji energie je zdroj uhlíku (glukóza, fruktóza a sacharóza), dusíku (volné aminokyseliny, dipeptidy, tripeptidy), anorganické soli, vitamíny (biotin, pantotenová kyselina, thiamin), enzymy a v neposlední řadě kyslík. Pivovarské kvasnice jsou fakultativně anaerobní, což znamená, že mohou sacharidy využívat oxidačním i fermentačním metabolizmem [66, 67].

Z pivovarského hlediska je metabolizmus kvasinek charakterizován, jako látková přeměna zkvasitelných cukrů na alkohol a oxid uhličitý za účasti řady enzymů a koenzymů. Metabolizmus kvasinek souvisí s mnoha dalšími složkami mladiny a vzniká při tomto procesu široké spektrum vedlejších produktů, které ovlivňují charakter konečného produktu [67].

Během kvašení a dokvašování piva má nezastupitelný význam obsah aminokyselin. Hlavně pro pomnožení a metabolizmus kvasinek. Při výrazně nedostatečném obsahu aminokyselin v substrátu probíhá pomnožení buněk a kvašení pomalu, prokvašení mladého piva je nízké a senzorické vlastnosti mohou být narušeny. Jednotlivé kmeny pivovarských kvasinek využívají aminokyseliny s rozdílnou rychlostí a mírou absorpce i v závislosti na jejich množství v mladině. Kmenová odlišnost a dobrý fyziologický stav kvasinek mají vliv také na míru redukce karbonylů během kvašení. Na druhou stranu aminokyseliny blokují degradaci trans-2-nonenalu během kvašení, protože s ním tvoří komplexy typu Schiffových bází, a tím je chrání před kvasinkovou populací [84]. Přítomnost volných aminokyselin v substrátu je jedním z hlavních faktorů pro vznik BA. Pokud by kvasinky produkovaly větší množství BA v rámci svého metabolizmu, byl by to jednoznačně negativní vliv ve výrobním procesu. Pokud by však kvasinky BA odbourávaly a jejich spotřeba substrátu by převládala nad aktivitou laktobacilů, mohly by tak kvasinky potlačit produkci BA laktobacily a aktivně by snižovaly obsah BA.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části diplomové práce bylo provést primární screening, zda jsou schopné vybrané kvasničné kmeny produkovat, nebo naopak odbourávat BA za podmínek *in vitro*.

V rámci primárního screeningu bylo cílem zjistit, zda vybrané kmeny kvasinek, získané z ústavu Pivovarského a sladařského v Praze, vykazují schopnost produkce/degradace BA při dvou kultivačních teplotách 12 a 30 °C.

Současně byl sledován vliv vybraných faktorů na dekarboxlázovou či deaminooxidázovou aktivitu, resp. zda kmeny mohou být citlivé vůči působení teploty (30 °C), izo-α-hořkých látek (20 mg/l) a etanolu (0,4 % (v/v)).

K naplnění cílů této diplomové práce bylo nutné po kultivaci kmenů a derivatizaci vzorků dansylchloridem, stanovit obsah BA a polyaminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

6 MATERIÁL

6.1 Použité mikroorganizmy

Pro primární screening produkce BA *in vitro* bylo použito 44 kmenů kvasinek získaných z ústavu Pivovarského a sladařského v Praze (Research Institute of Brewing and Malting; RIBM). Jednalo se o kulturní kvasinky využívané pro výrobu piva a divoké kvasinky: *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pastorianus, Debaryomyces hansenii, Dekkera bruxellensis, Hanseniaspora uvarum, Kluveromyces marxianus, Pichia fermentans* a *membranifaciens*, *Rhodotrula* sp., *Torulaspora delbrueckii, Zygosaccharomyces bailli, Lindera saturnus, Candida* sp..

6.2 Zařízení, přístroje, pomůcky, chemikálie a pomocné látky

Analytické váhy, A&D GH-200 EC, Mettler Toledo, Česká republika

Autokláv135 S, H+P VARIOKLAV (H+P Labortechnik AG), Německo

Automatické mikropipety,Biohit a Nichyrio, Finsko

Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

Box laminární BIO IIA, typ Biohazard TELSTAR, Česká republika

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

Fotometr TECAN Sunrise TW/TC, USA

Horkovzdušná sušárna, Memmert, Německo

Chladnička, Elektrolux, Švédsko

Laboratorní plasty: špičky automatických pipet, ependorfkové mikrozkumavky

Laboratorní sklo

Laboratorní třepačka Kavalier LT2,Votice, Česká republika

Odstředivka EBA 20, Hettich ZENTRIFUGEN, Německo

pH metr EUTECH INSTRUMENTS pH510, Nizozemsko

Vortex Heidolph, Reax top, Německo

1,7-heptandiamin Sigma-Aldrich, USA

Aceton, Sigma-Aldrich, USA

Acetonitril, Sigma-Aldrich, USA

Aminokyseliny: histin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin, fenylamin; Sigma-Aldrich, USA

Dansylchlorid Merck, Německo

Dusík v tlakové nádobě, Linde, Česká republika

Heptan, Sigma-Aldrich, USA

Hydrogenuhličitan sodný a uhličitan sodný bezvodý, Merck, Německo

Chlorid sodný NaCl, LachNer, Česká republika

Kyselina chloristá, Merck, Německo

Kyselina chlorovodíková, Merck, Německo

L-Prolin, Merck, Německo

6.3 Dekarboxylační média

Pro kultivaci kvasinek v rámci primárního screeningu byl použit Malt Broth (MB; HiMedia) ve dvou variantách. V první variantě bylo k médiu přidáno 0,3 % (w/v) aminokyselin (histidin, arginin, ornitin, lyzin, tyrozin), které sloužily jako prekurzory vzniku BA. Toto médium sloužilo také pro přípravu 100 µl 24-hodinového inokulátu a pro uchovávání kmenů.

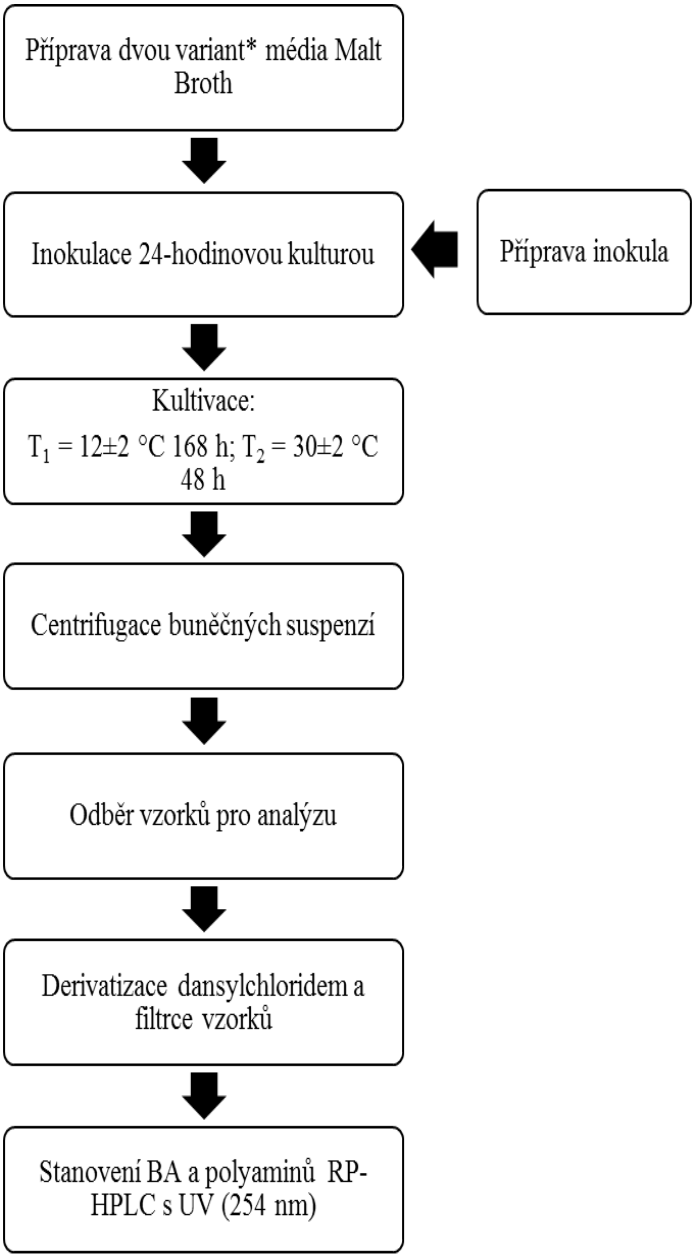
Druhá varianta připraveného média obsahovala přídavek 0,3 % (w/v) aminokyselin, 4 % (v/v) etanolu a 20 mg/l α-hořkých kyselin. Tyto koncentrace odpovídaly výčepnímu pivu. Obsah etanolu se běžně pohybuje okolo 4 % (v/v), α-hořké kyseliny bývají obsaženy v rozmezí 20 – 25 mg/l [84].

Použité médium:	Malt Broth (MB)	20 g
	Deionizovaná voda	1000 ml
	pH	4,8 ± 0,2

7 METODIKA

7.1 Screening schopnosti produkce biogenních aminů kmeny kvasinek

V experimentu byl proveden primární screening u vybraných kmenů kvasinek za podmínek *in vitro*. Byla sledována produkce BA u 44 kmenů kvasinek v médiu ve dvou variantách. Varianta I: MB s 0,3 % (w/v) aminokyselin. Varianta II: MB s 0,3 % (w/v) aminokyselin, 4,0 % (v/v) etanolu a 20 mg/l směs izo-α-hořkých látek. Čistota kmenů byla ověřena křížovým roztěrem a mikroskopicky. Supernatant, ze kterého byl odebrán 1 ml vzorku, byl dále podroben úpravnám (deprivatizace dansylchloridem) před samotným stanovením pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích s UV detekcí (Obr. 3).



Obr. 3: Schéma metodiky primárního screeningu dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů kvasinek in vitro.

**Varianta I: MB s 0,3 % (w/v) aminokyselin; Varianta II: MB s 0,3 % (w/v) aminokyselin, 4,0 % (v/v) etanolu a 20 mg/l směs izo-α-hořkých látek.*

V laboratoři byly připraveny dvě varianty média Malt Broth, na kterých byly kmeny kultivovány v pěti opakováních. První varianta dekarboxylačního média Malt Broth obsahovala přídavek aminokyselin (tyrozin, ornitin, arginin, lyzin, fenylalanin, histidin) v koncentracích 0,3 % (w/v). Druhé totožné médium bylo obohaceno faktory imitující pivo (0,3 % (w/v) aminokyselin, 4,0 % (v/v) etanolu a 20 mg/l směs izo-α-hořkých látek). Každé médium bylo připraveno navážením potřebného množství daných složek. Po smísení a dokonalé homogenizaci s deionizovanou vodou byla připravená dekarboxylační média vždy autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Kyselost živného média simulující prostředí piva byla upravena na pH 4,8 okyselením HCl o koncentraci 6 mol/l.

Připravená média byla zaočkovaná 100 µl 24-hodinovým inokulátem, jehož příprava spočívala v pomnožení kmenů kvasinek před vlastním experimentem v dekarboxylačním médiu a to Malt Broth s přídavky aminokyselin. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C v termostatu.

Zaočkovaná média s obsahem AMK byla kultivována při teplotě 12±2 po dobu 168 hodin a při teplotě 30±2 °C po dobu 48 hodin. Médium obohacené faktory imitující pivo bylo kultivováno při teplotě 30±2 °C po dobu 48 hodin.

7.1.1 Odběr vzorků pro analýzu

Po kultivaci kvasinek na živných médiích byly vzorky centrifugovány na odstředivce (3421x g; 22±1 °C; 20 minut; EBA 20 Hettich) a následně odebírány. Vždy bylo odebráno 750 µl supernatantu a zředěno se 750 µl kyseliny chloristé o koncentraci 1,2 mol/l v ependorfkové zkumavce. Takto byly připraveny i kontroly. Odebrané vzorky byly skladovány při teplotě -18 °C a následně podrobeny derivatizaci dansylchloridem a vlastnímu stanovení BA.

7.2 Stanovení obsahu biogenních aminů

Získané vzorky byly derivatizovány dansylchloridem s následnou separací a detekcí BA a polyaminů na reverzních fázích vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) s UV detekcí (λ= 254 nm) [85].

Ze získaných vzorků v ependorfkové mikrozkumavce byl odpipetován 1 ml do derivatizačních vialek. Ke každému odebranému vzorku bylo přidáno 100 µl vnitřního stan-

dardu, 1,7-heptandiaminu, v koncentraci 5 g/l, dále pak 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1-11,2 (uhličitany sodné i draselné) a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu, který byl rozpuštěn v acetonu v koncentraci 5 g/l. Poté se vzorky nechaly 20 hodin třepat v temnu. Po této době bylo do derivatizačních nádob napipetováno 200 µl prolinu a nechalo se další hodinu třepat. Následně bylo přidáno 3 ml heptanu a vzorky byly 3 minuty intenzivně ručně protřepány. Do malých vialek se odpipetoval 1 ml vrchní heptanové vrstvy s obsahem derivátu BA. Následovalo odpaření pod inertním plynem (dusíkem) při teplotě 60 °C. Vysušený odparek byl naředěn s 1,5 ml acetonitrilu.

Derivatizované vzorky byly před stanovením filtrovány (0,22 µm porozita filtru) a naneseny na kolonu ve dvojím opakování, kde proběhla separace biogenních aminů a polyaminů. Všechny separace probíhaly na koloně Agilent Zorbax Eclipse C18 s parametry 50 x 3,0 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies). Chromatograf byl dále s binární pumpou, odplyňovačem, UV/VIS-DAD detektorem, termostatem kolon a autosamplerem (LabAlliance AHLA84000). Separace byla provedena gradientovou elucí. UV detekce dansylderivátů byla provedena při vlnové délce 254 nm.

8 VÝSLEDKY

8.1 Screening produkce biogenních aminů vybranými kmeny kvasinek

U 44 kmenů kvasinek byla sledována dekarboxylázová aktivita ve dvou variantách dekarboxylačního média. Produkce, či případná schopnost odbourávat BA, byla posuzována v závislosti na množství vybraných BA, stanovených v médiu po kultivaci. Sledován byl obsah sedmi BA (fenyletylamin, histamin, kadaverin, putrescin, spermin, spermidin, tyramin) při teplotě 12 °C po dobu 168 hodin a při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Médium bylo obohaceno aminokyselinami. Ve faktory upraveném médiu byla použita teplota 30 °C s 48 hodinovou kultivací.

Kmeny pivních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM 2, 3, 6, 9, 10, 11, 15, 18, 32, 95, 96), *Saccharomyces pastorianus* (RIBM 139, 140, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153) a divokých kvasinek: *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Dekkera bruxellensis* DSM 70001, *Hanseniaspora uvarum* (RIBM A4, A7, A10 a DSM 2768), *Kluveromyces marxianus* RIBM Km, *Pichia fermentans* RIBM KI ½, *Pichia membranifaciens* (RIBM Spk 25 a BS 196), *Rhodotrula* sp. (RIBM A8 a A9), *Torulaspora delbrueckii* (RIBM T1, T2, T3, T4, T5), *Zygosaccharomyces bailli* (RIBM BS 197/B a 197/Z), *Lindera Saturnus* (RIBM Spk 8), *Candida* sp. (RIBM C6, C7 a Spk 76) produkovaly pouze velmi nízké koncentrace BA. V médiích po kultivaci a odečtení hodnot koncentrace BA v kontrole byl detekován tyramin, spermidin a spermin.

V obou variantách médií byl detekován zejména tyramin (TYR) a spermin (SPN), avšak v rozdílných koncentracích. V supernatantu po kultivaci kvasinek při 12 °C, pak můžeme spíše hovořit o degradaci BA, kdy bylo ve vzorcích detekováno nižší množství BA než v kontrole.

Produkce tyraminu a sperminu vybranými kmeny kvasinek se v obou médiích značně lišila (Tab. 1). Nejvyšší koncentrace tyraminu a sperminu byly vyprodukovány v upraveném médiu faktory, v podmínkách imitujících pivo (4,0 % (v/v) etanol; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8). U některých kmenů kvasinek (převážně divokých) byl detekován i spermidin, avšak ve velmi zanedbatelném množství. Proto jeho přítomnost nebude dále v textu práce více rozebírána.

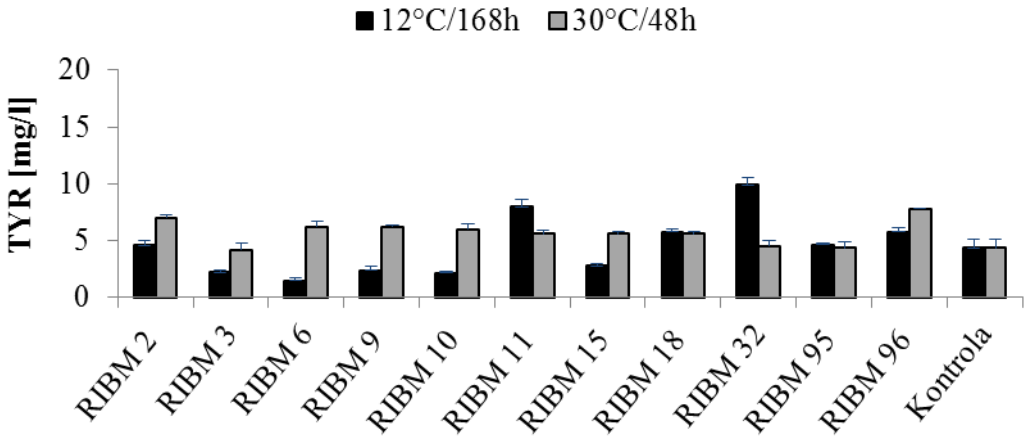
Tab. 1: Výsledky stanovení tyraminu a sperminu v dekarboxylačních médiích při teplotě kultivace 30 °C po dobu 168 h

Mikroorganizmus	N	MB s AMK	MB s faktory	MB s AMK	MB s faktory
		TYR */**/***/****	TYR */**/***/****	SPN */**/***/****	SPN */**/***/****
S. cerevisiave	11	1/3/0/0	0/0/5/0	0/9/1/0	0/0/5/0
S. pastorianus	11	2/3/0/0	0/0/11/0	0/6/1/0	0/0/7/0
Divoké kvasinky	22	0/11/0/0	0/0/17/0	0/3/14/0	0/0/18/0

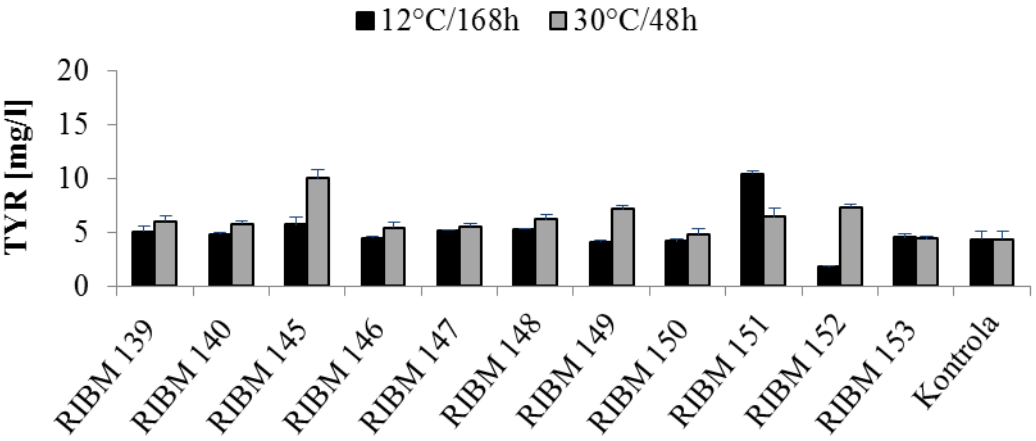
*0-2 mg/l; **2-10 mg/l; ***10-50 mg/l; ****50-100 mg/l; N…celkový počet testovaných kmenů

Dle výsledků se lze domnívat, že nižší teploty (12 °C) nepodporují tvorbu tyraminu (Obr. 4, 5 a 6) ani sperminu (Obr. 7, 8 a 9) kvasinkami, některé kmeny byly schopny tyramin a spermin odbourávat a mohly tak využít vzniklé aminy jako zdroj dusíku. Nejvyšší procento degradace tyraminu, mezi vybranými kmeny pivních kvasinek (Příloha I), bylo zaznamenáno u kmene *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 6 a *Saccharomyces pastorianus* RIBM 152. U divokých kvasinek kmeny *Candida* sp. RIBM Spk 76, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244 a *Kluveromyces marxianus* RIBM Km. Schopnost odbourávat spermin (viz. Příloha I) byl detekován u třech kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 3 a 6. Z kmenů *Saccharomyces pastorianus* ani jeden nedisponoval schopnosti odbourávat spermin. Ze skupiny divokých kvasinek nejvyšší hodnotou degradace disponoval *Rohodotrula* sp. RIBM A8 (Příloha II.). Rozsah degradace u vybraných kmenů nebyl nijak razantní, pro ověření degradace bude nutné připravit médium s přídavkem tyraminu a dalších BA, aby se ověřila schopnost kvasinek je degradovat.

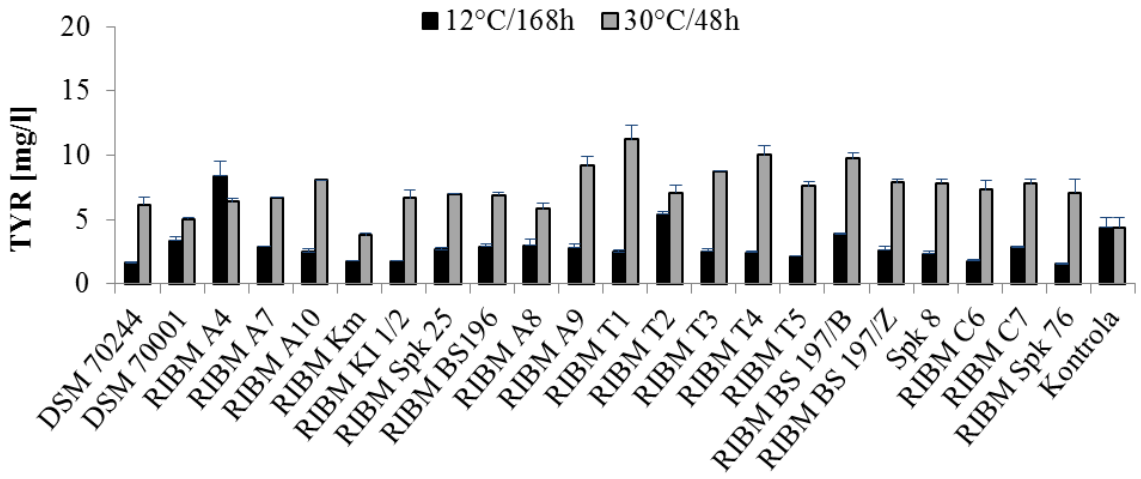
V produkci tyraminu a sperminu byly zjevné rozdíly nejen v obou zkoušených médiích, ale i mezi pivními a divokými kvasinkami (Příloha III a IV). V médiu MB s aminokyselinami při kultivaci kmenů při 30 °C byla detekována nejvyšší koncentrace tyraminu v médiu po kultivaci kmene *Torulaspora delbrueckii* RIBM T4 (5,64±0,71 mg/l). Ostatní zástupci divokých kvasinek i pivních kvasinek vykazovali produkci tyraminu v tomto médiu <5 mg/l (Obr. 4, 5 a 6). Nejvyšší koncentrace sperminu (Obr. 7, 8 a 9) byly detekovány v médiu po kultivaci kmenů *S. cerevisiae* RIBM (13,38±0,25 mg/l), *S. pastorianus* RIBM 140 (11,59±0,01 mg/l) a *Candida* sp. RIBM C6 (18,70±0,38 mg/l).



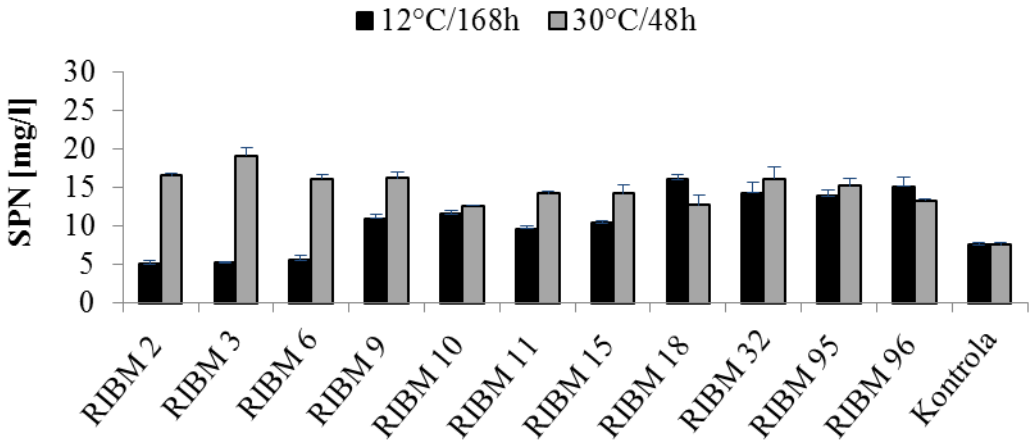
Obr. 4: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His)



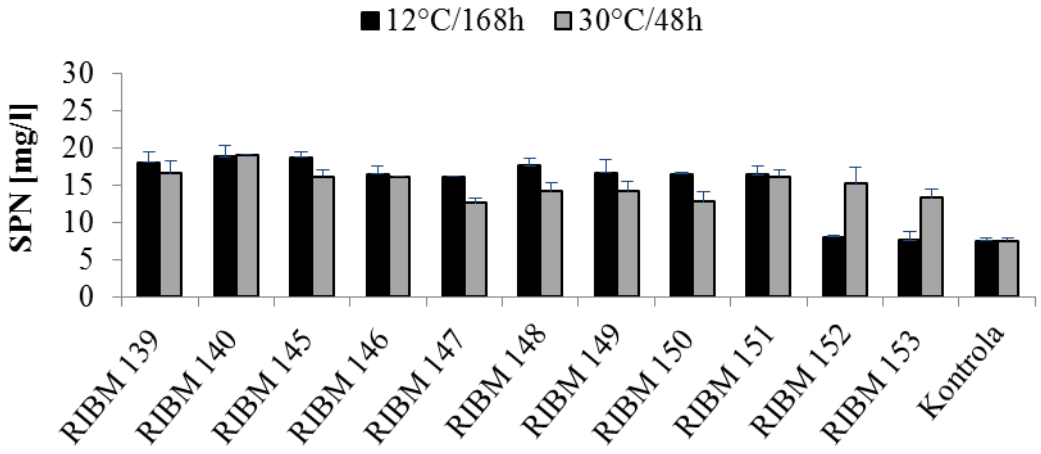
Obr. 5: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces pastorianus po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His).



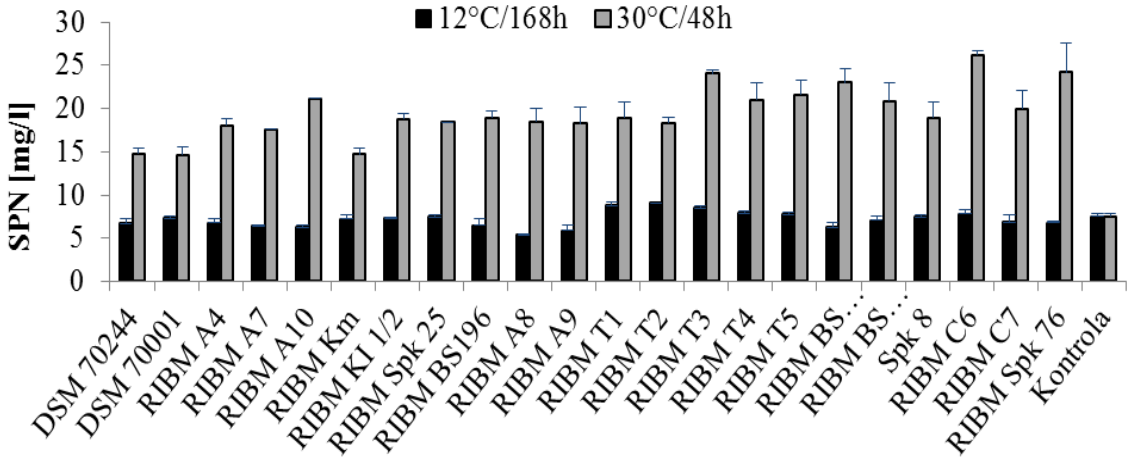
Obr. 6: Produkce tyraminu (TYR) kmeny divokých kvasinek po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His).



Obr. 7: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His).



Obr. 8: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces pastorianus po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His).



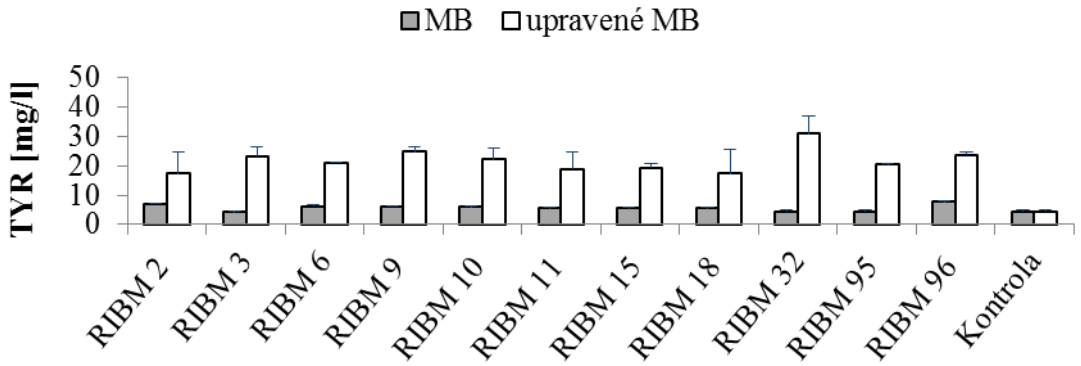
Obr. 9: Produkce sperminu (SPN) kmeny divokých kvasinek po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His).

Na Obr. 10, 11, 12 je znázorněno detekované množství tyraminu a na Obr. 13, 14 a 15 detekované množství sperminu v médiu MB s aminokyselinami a v médiu MB s faktory po kultivaci vybraných kmenů pivních kvasinek a divokých kvasinek. Koncentrace testovaných faktorů byly zvoleny tak, aby se přiblížily výčepnímu pivu. Sledoval se vliv vybraných faktorů na růst a dekarboxylázovou aktivitu.

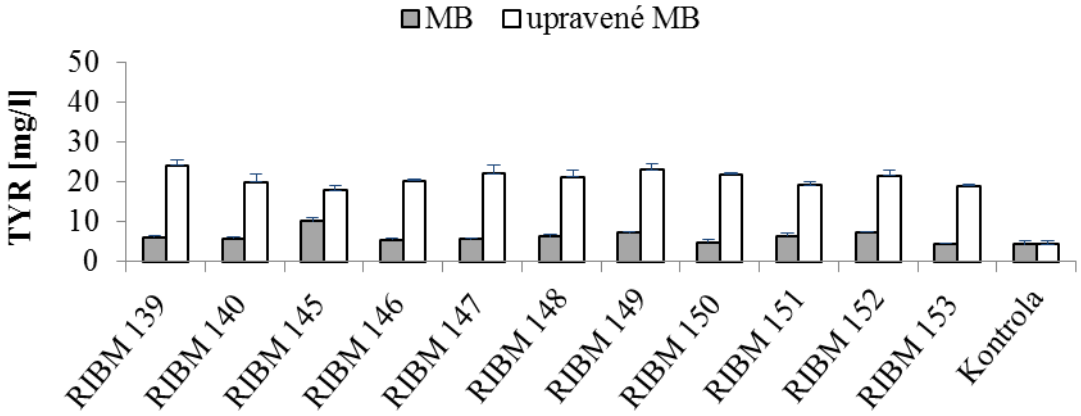
Dle výsledků v médiu s faktory simulující prostředí piva byla produkce tyraminu a sperminu mnohonásobně vyšší, než v neupraveném médiu MB s aminokyselinami. Z 11 kmenů *S. cerevisiae* produkovalo v tomto médiu 5 kmenů tyramin v koncentracích nad 10 mg/l (Obr. 10). Nejvyšší produkce byla zaznamenána u *S. cerevisiae* RIBM 9 (20,4±1,50 mg/l). Produkce sperminu byla detekována také u 5 kmenů, s nejvyšší koncentrací u kmene *S. cerevisiae* RIBM 11 (39,14±6,24 mg/l). Kmeny *S. cerevisiae* RIBM 2, 3, 10 a 18 neprodukovali ani jeden z výše zmíněných aminů.

Z kmenů *S. pastorianus* produkovaly všechny tyramin v koncentracích 10-20 mg/l (Obr. 11), s nejvyšší produkcí u kmene *S. pastorianus* RIBM 139 (19,67±1,54 mg/l). Nejvyšší koncentrace sperminu a také nejvyšší hodnota produkce z celkových výsledků, byla zaznamenána u *S. pastorianus* RIBM 153 (43,21±4,39 mg/l). Produkce sperminu byla detekována u 7 z 11 kmenů (Obr. 14).

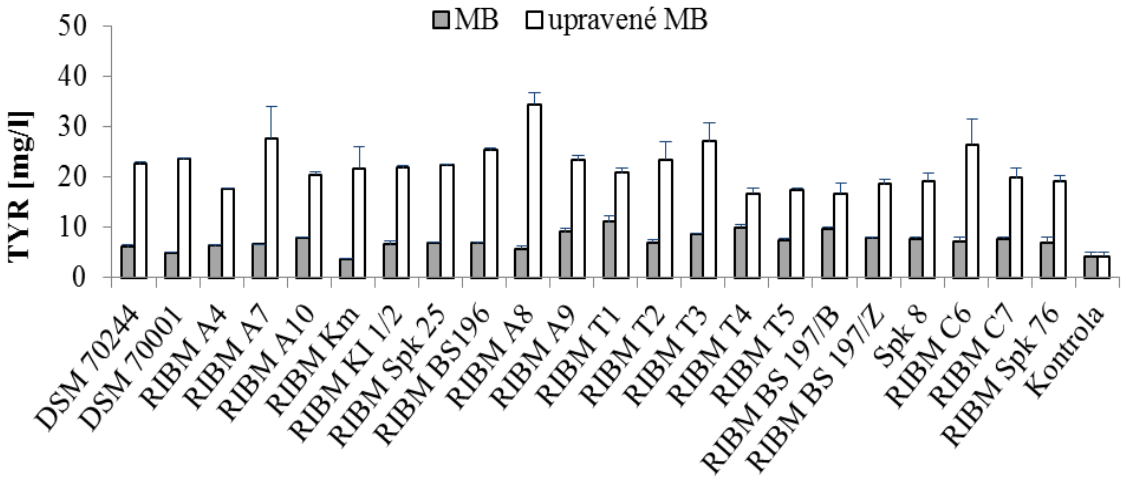
Z 22 kmenů divokých kvasinek produkovalo 17 kmenů tyramin v koncentracích nad 10 mg/l (Obr. 12). Nejvyšší produkce tyraminu byla detekována u *Rhodotrula* sp. RIBM A8 (30,10±2,42 mg/l). Produkce sperminu byla zaznamenána u 18 kmenů v koncentracích nad 15 mg/l (Obr. 15). Nejvyšší produkcí sperminu disponoval kmen *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1 (42,72±4,39 mg/l). U ostatních kmenů dekarboxylázová aktivita nebyla detekována.



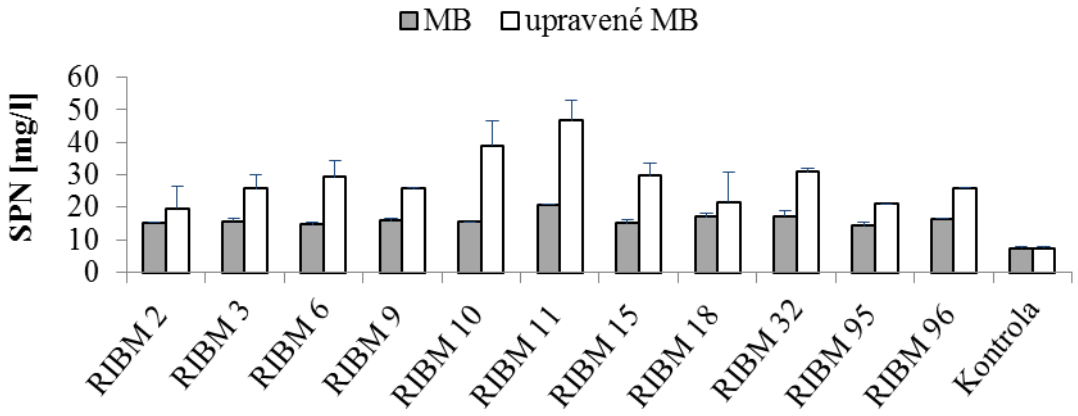
Obr. 10: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8).



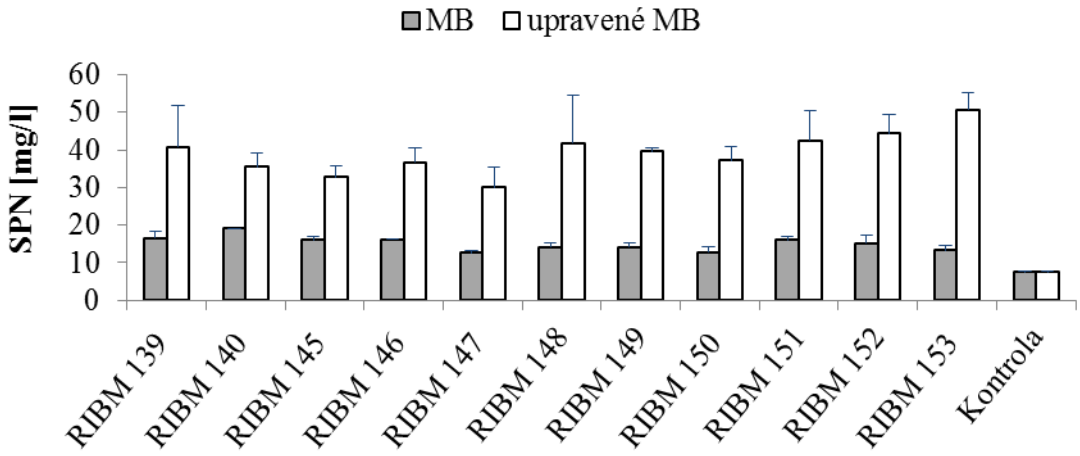
Obr. 11: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces pastorianus po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8).



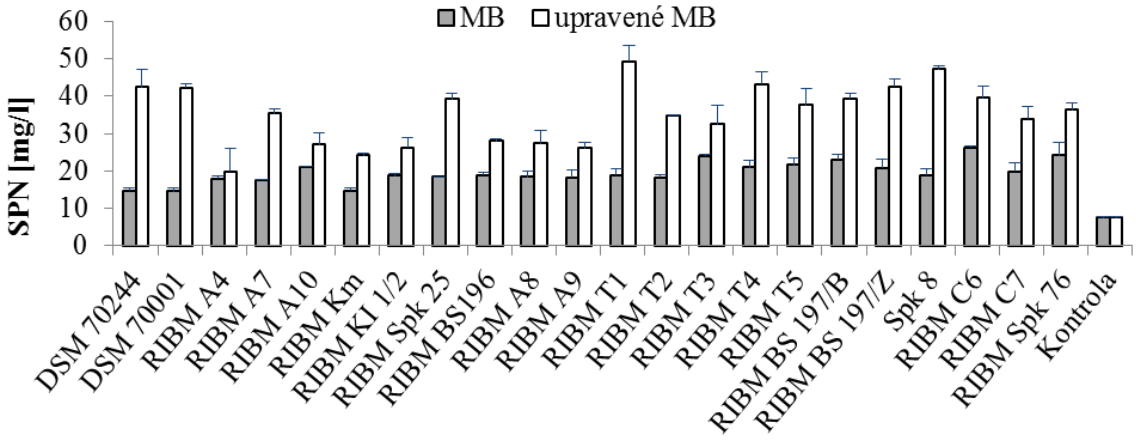
Obr. 12: Produkce tyraminu (TYR) kmeny divokých kvasinek po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8)



Obr. 13: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8).



Obr. 14: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces pastorianus po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8).



Obr. 15*: Produkce sperminu (SPN) kmeny divokých kvasinek po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8).*

9 DISKUZE

V odborných literaturách se nachází dva hlavní důvody proč sledovat BA a polyaminy v potravinách. Hlavní z nich je toxicita těchto nízkomolekulárních látek, dále pak snaha o nalezení souvislostí mezi obsahem BA a jakostí potravin. Hlavně v potravinářských provozech, kde stěžejní roli ve výrobě hraje činnost mikroorganizmů, jako je například právě výroba piva [86]. V poslední době je kladena pozornost na potenciální otravy z BA s cílem zajistit bezpečnost spotřebitelů. Požití potraviny či nápoje s vysokým obsahem BA je obecně podceňováno. Ačkoliv je výskyt BA celosvětově hlášen a rozsáhle popsán v odborných pracích, v konkrétních právních předpisech, týkající se maximální povolené koncentrace BA v potravinách, stále chybí [87].

Obsah BA v pivech je problematika, která je intenzivně sledována již několik let. Obsah BA v pivě je ovlivněn převážně kvalitou sladu. BA ve sladu jsou produkované přirozenou mikroflórou ječmene přítomnou v průběhu jeho klíčení. Slad je zdrojem agmatinu, putrescinu, spermidinu, sperminu. Hladina spermidinu a sperminu může po fermentačním procesu prudce klesat [20]. Poměrně vysoké množství tyraminu (20-24 mg/kg) ve sladu stanovili Kalač, Hlavatá a Křížek (1997). Polyaminy, jako jsou spermin, spermidin, putrescin, agmatin, mohou posílit negativní účinky histaminu, ale také mohou podpořit inhibici oxidace polynenasycených mastných kyselin, tokoferolů či karotenoidních pigmentů. V konečných produktech se hojně vyskytují tyramin a histamin, což potvrzují ve svých studiích Ertan et al. (2011) i Kalač et al. (2002) [1, 5, 51].

Z důvodu nedostatků odborných studií a literatury zabývající se možnou produkcí BA kvasinkami, byla do práce zahrnuta experimentální část, která se zabývala produkcí či případnou schopností odbourávat BA kvasinkami.

V diplomové práci byl sledován vliv vybraných faktorů na dekarboxylázovou aktivitu 22 kmenů pivních a 22 kmenů divokých kvasinek *in vitro*. Tyto kmeny byly získány z Výzkumného ústavu Pivovarského a sladařského v Praze. Primární screening byl proveden ve dvou variantách dekarboxylačních medií. Produkce, či případná degradace BA byla posuzována v závislosti na množství vybraných BA stanovených po kultivaci v médiu. Byl sledován obsah sedmi BA (fenyletylamin, histamin, kadaverin, putrescin, spermin, spermidin, tyramin) po přídavku AMK do média (Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His). Obecně je

množství produkovaných BA ovlivňěno množstvím aminokyselin dostupných v prostředí. Vyšší koncentrace prekurzorů znamená vyšší proukci BA [24].

Detekován byl pouze tyramin, spermin a spermidin, avšak obsah vyprodukovaného spermidinu byl v zanedbatelném množství, proto se práce tímto aminem dále nezabývala. Oproti tomu Halász et al. (1994, 1998) ve své studii, zabývající se produkci BA komerčními kmeny pivovarských kvasinek, detekoval významné množství spermidinu až 189 mg/100g a u jednoho kmene byl detekován obsah sperminu (56 mg/100g). To však mohlo mít za následek případná kontaminace bakteriemi mléčného kvašení [46; 50]. Polyaminy spemin a spermidin vznikají z putrescinu. Na rozdíl od samého putrescinu, bylo zjišzěno, že tyto polyaminy jsou důležité pro optimální růst kvasinek, zejména pro jejich meitickou spoluraci [88]. Dle Zotou A. (2009) koncentrace sperminu až nad 600 mg/kg může mít negativní účinky na organismus [18].

Dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů je velmi rozmanitá, především závisí na růstové fázi daného mikroorganizmu a složení média. Tvorba aminů je taktéž ovlivněna teplotou a délkou kultivace. Některé mikroorganizmy, citlivější na teplotu, mohou mít produkci BA menší při nižších teplotách (10 °C), než při optimální růstové teplotě (20 – 25 °C) většiny mikroorganizmů [46].

V rámci experimentu této diplomové práce byly použity obdobné teploty, a to 12 °C a 30 °C. Při vyšší teplotě kultivace byla prokázána vyšší dekarboxylázová aktivita. Pleva et al. (2012) se zaměřili na faktory ovlivňující produkci BA. Zjistili, že produkci tyraminu podpořila teplota kultivace 30 °C oproti teplotě 6 °C [89]. U kvasinek kultivovaných při 12 °C, pak můžeme spíše hovořit o degradaci BA, kdy bylo ve vzorcích detekováno nižší množství BA než v kontrole. Některé kmeny, jako jsou *Debaryomyces hansenii* nebo *Yarrowia lipolytica,* jsou schopny degradovat BA. Kvasinky kmenů *D. hansenii* by tak mohly být vhodné jako startovací kultury pro snížení BA ve fermentovaných potravinách [58].

BA mohou být zdrojem dusíku pro kvasinky a prekurzory pro syntézu alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů [34]. Zda kvasinky mají schopnost degradace a využívat přítomný dusík, na toto téma budou založeny samostatné experimenty, které by schopnost degradace ověřili přídavkem vyššího množství BA do médií. Dusík bývá často omezená

živina pro aktivitu *Saccharomyces cerevisie* a s bakteriemi mléčného kvašení během alkoholového kvašení o něj mohou bojovat.

Ke zvýšení obsahu BA, zejména tyraminu, může docházet během skladování. Ve spodně kvašených pivech je běžný výskyt tyraminu 5-8 mg/l. Průměrné množství BA detekované v českých pivech odpovídá hodnotám pro tyramin 6,9 mg/l [4, 6, 18, 31, 86, 90]. Koncentrace vyprodukovaného tyraminu vybranými kmeny kvasinek nepřekročila v rámci experimentu hodnoty nad 5 mg/l po kultivaci v médiu MB s aminokyselinami při 30 °C. Vyšší koncentrace tyraminu byla detekována pouze u jednoho kmene *Torulaspora delbrueckii* RIBM T4 (5,64±0,71 mg/l).

Značný rozdíl v produkci byl v médiu MB simulující prostředí piva. Z kmenu *S. cerevisiae* se produkce tyraminu nad 10 mg/l detekovala u 5 kmenů, jediný kmen *S. cerevisiae* RIBM 9 produkoval tyramin nad 20 mg/l. Všechny kmeny S. *pastorianus* produkovaly tyramin v koncentracích 10-20 mg/l. Vzhledem k těmto výsledkům je možné, že mohlo dojít ke kontaminaci kmenů *S. pastorianus.* Do budoucna by se tento jev měl ověřit, aby se tak vyloučila případná kontaminace a potvrdilo se stimulační působení faktorů.

Nejvyšší produkce tyraminu, v rámci skupiny divokých kvasinek, byla detekována u *Rhodotrula* sp. RIBM A8 (30,10±2,42 mg/l). U ostatních kmenů se produkce pohybovala okolo 10 mg/l. Tyto koncentrace vyprodukovaného tyraminu, jak u pivních kvasinek, tak divokých, by neměly ohrozit zdravotní stav konzumentů.

Množství tyraminu < 10 mg/l nemusí u zdravých jedinců představovat riziko. Nicméně u pacientů, užívající léky obsahující enzym MAO, může být koncentrace tyraminu do 6 mg/l považována za nebezpečnou. Tyramin může u těchto jedinců vyvolat rychlý vzestup krevního tlaku či migrény [4, 6, 31, 86, 90].

Spermidin a spermin jsou nepostradatelné složky všech živých buněk, důležité pro jejich růst a obnovu metabolizmu. Jsou to velmi stabilní sloučeniny, které jsou schopné odolávat vyšším teplotám, kyselému tak i zásaditému prostředí. Polyaminy nejsou obecně nebezpečné pro lidské zdraví. [20, 22, 87].

Produkce sperminu byla vyšší oproti produkci tyraminu. Vyprodukované množství sperminu testovanými kmeny za podmínek *in vitro* bylo mnohonásobně vyšší v prostředí simulující pivo. Některé mikroorganizmy mohou být rezistentní k hořkým látkám a tím pádem pivo vytváří prostředí, kde mohou růst a množit se [36].

Nejvyšší koncentrace sperminu v médiu MB s aminokyselinami při kultivaci kmenů při 30°C byla detekována u kmene *Candida* sp. RIBM C6 (nad 18 mg/l). V druhé variantě média 5 kmenů kvasinek *S. cerevisiae* disponovalo dekarboxylázovou aktivitou, koncentrace sperminu se pohybovaly v rozmezích 13 – 39 mg/l (Příloha III.). Produkce ostatních kmenů se pohybovala v rozmezích 16 – 37 mg/l. Nejvyšší hodnotou produkce sperminu z celkových získaných výsledků disponovaly kvasinky kmene *S. pastorianus* RIBM 153 (43,2±4,39 mg/l). Obdobného výsledku bylo dosaženo i u kmene divokých kvasinek *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1.

Řada autorů uvádí, že nebyl zaznamenán žádný nárůst koncentrace BA během alkoholového kvašení, že kvasinky se nezdají být zodpovědné za produkci většiny aminů. V jedné ze studií je uvedeno, že kvasinky některých druhů, jako jsou *Candida, Hanseniaspora Pichia, Rhodotrorula* a kmeny druhů *S. cerevisiae* nemají žádný potenciál k produkci biogenních aminů [63].

Na základě získaných výsledků v rámci experimentu toto tvrzení nelze potvrdit. Všechny zmíněné druhy kvasinek byly schopny produkce jak tyraminu, tak sperminu. U kmene *Rhodotrula* sp. byla detekována nejvyšší koncentrace tyraminu až 30 mg/l. Druhy *Candida, Hanseniaspora, Pichia, Rhodotrorula* byly schopny vyprodukovat koncentrace sperminu v průměru 30 mg/l sperminu (Příloha IV). Produkce byla závislá na daném kmeni. Získané údaje korespondují i s výsledky uvádějící ve své studii Romano P. et al. (2007). Ti uvádí, že kvasinky druhů *S. cerevisiae, Hanseniaspora uvarum Candida stellata* a *Brrettanomyces bruxellensis* jsou schopny produkovat BA v různých koncentracích a mít tak za následek potenciální riziko zhoršení kvality vína [91, 92].

Legislativní limity obsahu BA v potravinách nejsou v zahraničí jednotné, hodnoty se od sebe relativně liší. Do roku 2004 byly v České republice stanovené legislativní limity pro vybrané BA v sýrech, rybách, vínu a pivu. V současné době se uvádí je přípustné množství (PM) pouze pro histamin v rybách a rybích výrobcích ve výši 100 mg/kg. Legislativa také nenařizuje výrobcům potravin a nápojů uvádět obsah BA na obale potravin [93].

ZÁVĚR

Tato práce se zabývala schopností produkce BA vybranými kmeny kvasinek, zda vybrané kvasničné kmeny jsou schopny produkovat či naopak odbourávat BA za podmínek *in vitro.* Současně byl sledován vliv vybraných faktorů, zda mohou být kmeny citlivé vůči působení teploty (30 °C), izo-α-hořkých látek (20 mg/l) a etanolu (0,4 % (v/v)).

- Na základě získaných výsledků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla stanovena produkce BA tyraminu a sperminu.
- Ostatní BA nebyly detekovány a nebo v zanedbatelných množstvích (spermidin).
- Nejvyšší detekované množství sperminu bylo u kmene *S. pastorianus* RIBM 153 (43,2±4,39 mg/l) a u kmene *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1 (42,72±4,39 mg/l) v prostředí simulující pivo, tedy v médiu MB s faktory (20 mg/l izo-α-hořkých látek, 0,4 % (v/v) etanolu, pH 4,8).
- Kmeny *S. cerevisiae* nemohou být na základě provedených testů označeny za významné producenty BA. Produkce tyraminu a sperminu byla detekována v rozmezích 10-20 mg/l.
- Nižší teplota 12 °C a delší doba kultivace potvrdila možnou schopnost kvasinek odbourávat BA v médiu, které mohou s BMK soutěžit o substráty a tím omezovat samotnou produkci aminů. Na základě tohoto tvrzení budou provedeny další pokusy, které by měly potvrdit schopnost degradace BA některými testovanými kmeny.
- Výskyt BA může představovat závažné zdravotní problémy především u citlivějších jedinců z důvodu synergického účinku BA a etanolu. V rámci této diplomové práce vyprodukované množství BA za podmínek *in vitro* by však neměly ohrozit zdravého jedince.
- Tyramin ani spermin nebyly v analyzovaných supernatantech přítomny v toxikologicky významných koncentracích.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] ERTAN ANLI, R. a M. BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. England: Taylor & Francis, 2011, (25), 86-102. DOI: 10.1080/87559120802458552.

[2] HUI, Y. H. *Handbook of food science, technology, and engineering*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Food science and technology (Taylor & Francis), 148. ISBN 0849398495.

[3] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009, 2 sv. ISBN 9788024614144.

[4] ERCAN, S. Ş., H. BOZKURT a Ç. SOYSAL. Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *Journal of Food Science and Engineering*. 2013, roč. 3, s. 395-410. ISSN: 2159-5828.

[5] KALAČ, Pavel et al. Biogenic Amine Formation in Bottled Beer. *Food Chemistry*. 2002, roč. 79, s. 431-434. ISSN: 0308-8146.

[6] KALAČ, Pavel a Martin KŘÍŽEK. A Review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of The Institute of Brewing*. 2003, roč. 109, s 123-128. ISSN: 0046-9750. Dostupné také z: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.20500416.2003.tb00141.x/pdf].

[7] LINARES, D. M. et al. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, roč. 51, s. 691-703. ISSN: 1040-8398.

[8] FAROOQUI, Akhlaq A. a Tahira FAROOQUI. *Biogenic amines: pharmacological, neurochemical and molecular aspects in the CNS*. New York: Nova Science Publishers, c2010. Pharmacology-research, safety testing, and regulation series.

[9] LANDETE, J. M. et al. Molecular Methods for the Detection of Biogenic Amine-producing Bacteria on Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 117, s. 258-269. ISSN: 0168-1605.

[10] LARQUÉ, E., M. SABATER-MOLINA a S. ZAMORA. Biological Significance of Dietary Polyamines. *Nutrition.* 2007, roč. 23, s. 87-95. ISSN:0899-9007.

[11] LOZANOV, V., S. PETROV a V. MITEV. Simultaneous Analysis of Amino Acid and Biogenic Polyamines by High-performance Liquid Chromatography After Pre-column Derivatization with N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide. *Journal of Chromatography A*. 2004, roč. 1025, s. 201-208. ISSN: 0021-9673.

[12] KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 807157757X.

[13] DRÁČKOVÁ, M. et al. Stanovení obsahů polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené reflektanční spectrometrie. *Acta fytotechnica et zootechnica*. 2009, roč. 12, s. 121-126.

[14] ČERNÝ, V., E. KVASNIČKOVÁ, Š. HAVLÍKOVÁ a L. KAHOTKA. Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech. *Mlékařské listy*. 2009, roč. 16.

[15] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.

[16] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, s. 675-690. ISSN: 0963-9969

[17] PEATFIELD, R. C. Relationships between food, wine, and beer-precipitated migrainous headaches. 1995, roč. 35, s. 355-357.

[18] ZOTOU, Anastasia a Zacharenia LOUKOU. *Beer in health and disease prevention*. Method for Determining Biogenic Amines in Beer. [Online-Ausg.]. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 9780123738912.

[19] ONAL, Armagan. A Review: Current Analytical Methods for the Determination of Biogenic Amines in Foods. *Food Chemistry*. 2007, roč. 103, s. 1475-1486. ISSN: 0308-8146.

[20] ADAMS, Martin R. a M. J. Rob NOUT. *Fermentation and Food safety*. New York: Aspen Publishers. 2001, 121 s. ISBN: 0-8342-1843-7.

[21] MARINO, M. et al. Evaluation of Amino Acid-dekarboxylate MIcrobiota Throughout the Ripening of an Italian PDO Cheese Produced Using Different Manufacturing Practices. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, roč. 105, s. 540-549. ISSN: 1364-5072.

[22] KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GRIEF. Biogénne aminy v potravinách. *Potravinárstvo.*2008, roč. 2, s. 30-49. ISSN: 1337-0960. Dostupné také z: http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf

[23] ASKAR, Ahmed a Hans TREPTOW. *Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung*. Stuttgart: E. Ulmer, 1986. ISBN 3800121328.

[24] JUNEJA, Vijay K. a John Nikolaos SOFOS. *Pathogens and Toxic in foods: Challenges and Interventions*. Washington, DC: ASM Press, 2010, 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5.

[25] PLAZA-ZAMORA, J. et al. Polyamines in Human Breast MIlk for Preterm and Term Infants. *British Journal of Nutrition.* 2013, roč. 110, s. 524-528. ISSN: 0007-1145.

[26] LEDVINA, M., A. STOKLASOVÁ a J. CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. 274 s.

[27] ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The Ability of Biogenic Amines and Ammonia Production by Single Bacterial Cultures. *European Food Research Technology*. 2007, roč. 225, s. 385-394. ISSN: 1438-2377

[28] MEDINA, Miguel Ángel et al. Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2003, roč. 38, s. 23-59.

[29] AGOSTINELLI, E., M. P. M. MARQUES, R. CALHEIROS, et al. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids* [online]. 2010, roč. 38, s. 393-403. ISSN: 0939-4451.

[30] OLŠOVSKÁ, Jana, Dagmar MATOULKOVÁ, Pavel ČEJKA a Maria JURKOVÁ. Pivo a zdraví. *Kvasný průmysl.* 2014, roč. 60, s. 174-181.

[31] LORET, S., P. DELOYER a G. DANDRIFOSSE. Levels of Biogenic Amines as a Measure of the Quality of the Beer Fermentation Process: Data from Belgian Samples. *Food Chemistry*. 2005, roč. 89, s. 519-525. ISSN: 0308-8146

[32] DOYLE, Michael P. a Robert L. BUCHANAN. *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*. Vyd. 4. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2013, s. 901-913. 36. Beer. ISBN: 978-1-55581-626-1 (e-book)

[33] JAYKUS, L. A., H. H. WANG a L. S. SCHLESINGER. *Food Borne Microbes - Shaping the Host Ecosystem*. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2009, s. 161-181. 9. Using Microbial Succession to the Processor's Advantage: Food Fermentation and Biocontrol. ISBN: 978-1-55581-405-2 (e-book)

[34] SILLA-SANTOS, Maria H. Biogenic Amine: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, s. 213-231. ISSN: 0168-1605.

[35] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2003, roč. 59, s. 70-79. ISSN: 0931-7597.

[36] MATOULKOVÁ, D., P. KUBIZNIAKOVÁ a K. SINGLER. Schopnost mléčných bakterií kazit pivo a souvislost s přítomností genů horA, horC a hitA. *Kvasný průmysl*. 2012, roč. 58, s. 336-342. ISSN: 0023-5830.

[37] SUZZI, Giovanna a Fausto GARDINI. Biogenic Amines in Dry Fermented Sausages: A Review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 88, s. 41-54. ISSN: 0168-1605.

[38] CASADEI, M. A. et al. Heat Resistance of *Bacillus Cereus*, *Salmonella Typhimurium* and *Lactobacillus Delbrueckii* in Relation to PH and Ethanol. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 63, s. 125-134. ISSN: 0168-1605.

[39] SUZUKI, K. et al. A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*. 2006, roč. 112, s. 173-191. ISSN: 2050-0416.

[40] GLÓRIA, Maria. B. A. a Maria IZQUIERDO-PULIDO. Levels and Significance of Biogenic Amines in Brazilian Beers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1999, roč. 12, s. 129-136. ISSN: 0889-1575.

[41] LORENCOVÁ, E. et al. Production of Biogenic Amines by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from Dairy Products and Beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, roč. 47, s. 2086-2091. ISSN: 0950-5423.

[42] MASSON, F. et al. Effects of Physico-chemical Factors Influencing Tyramine Production by *Carnobacterium Divergens*. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, roč. 83, s. 36-42. ISSN: 1364-5072

[43] LORENCOVÁ, E. et al. Selected Factors Influencing the Ability of *Bifidobacterium* to Form Biogenic Amines. *International Journal of Food Science and Technology*. 2014, roč. 49, s. 1302-1307. ISSN: 0950-5423

[44] BUŇKOVÁ, L. et al. The Effect of Lactose, NaCl and an Aero/anaerobic Environment on the Tyrosine Decarboxylase Activity of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris* and *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 147, s. 112-119. ISSN: 0168-1605.

[45] European Food Safety Authority (EFSA), Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 2011, roč. 9, iss.10, p. 93.

[46] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorfanisms in food. *Trends in Food Science and Technology.* 1994, roč. 5, s. 42-49

[47] ROIG-SAGUÉS, A. X., C. RUIZ-CAPILLAS, D. ESPINOSA a M. HERNÁNDEZ. The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formantion. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates.*2009, s. 201-230

[48] KALAČ. P., M. B. A. GLÓRIA. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates.* 2009, s. 267-309

[49] DE BORBA, Brian M. a Jeff S. ROHRER. Determination of biogenic amines in alcohol beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A.* 2007, roč. 1155, s. 22-30. Dostupné také z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307002208

[50] HALÁSZ. A., Á. BARÁTH a W. H. HOLZAPFEL. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* A. 1998, roč. 208, s. 434-438. ISSN: 1431-4649.

[51] KALAČ, P., V. HLAVATÁ a M. KŘÍŽEK. Concentrations of Five Biogenic Amines in Czech Beers and Factors Affecting Their Formation. Food Chemistry. 1997, roč. 58. s. 209-214. ISSN: 0308-8146.

[52] *Potravinářské aktuality: Výživa, trendy v potravinářství, legislativa* [online]. Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2003, **2** [cit. 2016-05-09]. ISSN 1213-693X.

[53] IZQUIERDO-PULIDO, M., T. HERNÁNDEZ-JOVER, A. MARINÉ-FONT a M. C. VIDALCAROU. Biogenic amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, roč. 44, s. 3163-3163

[54] BUŇKA, F. el al. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing.* 2012, roč. 118, s. 213-216. ISSN: 0046-9750

[55] TANG, T. et al. Determination of Biogenic Amines i Beer with Pre-column Derivatization by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B.* 2009, roč. 877, s. 507-512. ISSN: 1570-0232

[56] *Informační centrum bezpečnosti potravin: Biogenní aminy v polských pivech* [online]. 2003 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: http://www.bezpecnostpotravin.cz/biogenni-aminy-v-polskych-pivech.aspx

[57] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH a W. H. HOLZAPFEL. The Biogenic Amine Content of Beer; The Effect of Barley, Malting and Brewing on Amine Concentration. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 1999, roč. 208, s. 418-423. ISSN: 1438-2377

[58] BAUMLISBERGER, M. et al. The Potential of the Yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microorganisms 2015.* 2015, roč. 3, s. 839-850

[59] CARUSO, M. et al. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2002, roč. 18, s. 159-163

[60] SOUFLEROS, E. et al. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 1998, roč. 49, s. 266-277

[61] TORREA GONI, Diego a Carmen Ancín AZPILICUETA. Influence of Yeast Strain on Biogenic Amines Content in Wines: Relationship with the Utilization of

Amino Acids during Fermentation. *AM. J. Enol. Vitic.* 2001, roč. 52, s 185-190. Dostupné z: http://www.ajevonline.org/content/52/3/185.abstract

[62] CONSTANTINI, 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, s. 10664-10669

[63] LANDETE, J. M. et al. Biogenic amines production by lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, roč. 18, s. 1569-1574

[64] CERUTTI, G. et al. Non-volatile Amines in Beer: Origin and Occurrence. *Monatsschr Brauwiss*. 1985, roč. 38, s. 296-299.

[65] WEI QI, et al. Effect of salt-tolerant yeast of Candida versatilis and Zygosaccharomyces rouxii on the production of biogenic amines during soy sauce fermentation. *Science of Food and Agriculture.* 2014, roč. 94, s. 1537-1542. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6454/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER

[66] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

[67] KOSAŘ, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902658-6-3.

[68] MATOULKOVÁ, Dagmar. *Klasifikace a význam kvasinek využívaných v pivovarské technologii*. Brno, 2010. Rigorózní práce. Masarykova univerzita.

[69] EBC: *European Brewery Convention: EBC Analytica-Microbiologica 2005*. 2. vyd. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl. [CD ROM]. ISBN 3-418-00780-5

[70] BERLOWSKA, Joanna et al. Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast.* 2015, roč. 32, s. 289-300. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3041/full

[71] ŠAVEL, Jan. Technologie výroby piva. Tréninkový modul. 2010. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/6/6-technologie_vyroby_piva.pdf

[72] KOPECKÁ, Jana, M. NĚMEC a D. MATOULKOVÁ. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. *J. Appl. Microbiol.* 2016. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26929399

[73] MATOULKOVÁ, Dagmar. Pivovarství a taxonomie pivovarských kvasinek. *Kvasný průmysl.* 2007, roč. 53, s. 206-214

[74] MATOULKOVÁ, Dagmar, Jana KOPECKÁ a Petra KUBIZNIAKOVÁ. Mikrobiologie pivovarské výroby – Divoké kvasinky a metody jejich detekce. *Kvasný průmysl.* 2013, roč. 59, s. 246-257

[75] BOULTON, Chris a David QUAIN. *Brewing yeast and fermentation*. Oxford [u.a.]: Blackwell Science, 2001. ISBN 0632054751.

[76] CAMPBELL, I. a Hawa S. MSONGO. Growth of aerobic wild yeast. *Journal of the Institute of Brewing.* 1991, roč. 97, s. 279-282. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1991.tb01069.x/epdf

[77] VAUGHAN, Anne, Tadhg O´SULLIVAN a Douwe VAB SINDEREN. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review. *Journal of the Institute of Brewing.* 2005, roč 111, s. 355-371. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x/epdf

[78] PIRES, E. J., J. A. TEIXEIRA, T. BRÁNYIK a A. VINCENTE. Yeast: the soul of beer´s aroma – a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014., roč. 98, s. 1937-1949.

[79] COGHE, S. et al. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase aktivity in *Saccharomyces cerevisiae. J. Agric Food Chem*. 2004, roč. 52, s. 602-608

[80] CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.

[81] STEENSELS, J. et al. *Brettanomyces yeast* – From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol*. 2015, roč. 206, s. 24-38

[82] HUTZLER. M. Getränkerelevante Hefen –Identifizierung und Differenzierung. Südwestdt. *Verl. Für Hochschulschriften* 2010, s. 276

[83] KING, A. a R. J. DICKINSON. Biotransforamtion of monoterpene alcohols by Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora *delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis. Yeast*. 2000, roč. 16, s. 499-506

[84] BASAŘOVÁ, Gabriela a Jan JANOUŠEK. Význam aminokyselin v technologii a kvalitě piva. *Kvasný průmysl.* 2000, roč. 46, s. 314-318

[85] DADÁKOVÁ, E., M. KŘÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ. Determination of Biogenic Amines in Foods Using Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, roč. 116, s. 365-370. ISSN: 0308-8146

[86] KŘÍŽEK, Martin a Věra HLAVATÁ. Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu. *Kvasný průmysl.* 1995, roč. 41, s. 265-269

[87] RUSSO, P. et al. Are consumers aware of the risks related to Biogenic Amines in food?. *Current Research.* 2010, s. 1087-1095

[88] SMIT, A. Y. et al. Biogenic amines in Wine: Understanding the Headache. S. Afr. J. Enol. Vitic. 2008, roč. 29, s. 109-127

[89] PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of Enterococcus faecium isolated from rabbit. Potravinarstvo. 2012-04-01, vol. 6, issue 2, s. 46 - 49. DOI: 10.5219/182.

[90] DAVÍDEK, T. a J. DAVÍDEK. Biogenic Amines. In: *Natural Toxic Comounds of Foods. Formation and change during processing and storage*. Boca Raton, Florida, CRC Press. 1995, s. 108-123.

[91] TORREA, D. a C. ANCÍN. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentation. *J. Agric. Food. Chem.* 2002, roč. 50, s. 4895-4899.

[92] ROMANO, P., A. CAPECE, C. POETA. Biogenic amine formation in alcohol fermentation. Bullettin OIV. 2007, s. 1-11

[93] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., VORLOVÁ, L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. Veterinářství. 2008, č. 58, s. 735-739.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
ARG	Arginin
BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
DAO	Diaminooxidáza
HCl	Kyselina chlorovodíková
HMT	Histidinmethyltransferáza
MAO	Monoaminooxidáza
MB	Malt Broth
PR-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RIBM	Research Institute of Brewing and Malting Culture Collection
SPN	Spermin
TYR	Tyramin
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Nejčastěji vyskytující se biogenní aminy a polyaminy [19] 15
Obr. 2: Schéma dekarboxylace aminokyselin [22] 16
Obr. 3: Schéma metodiky primárního screeningu dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů kvasinek in vitro. 36
Obr. 4: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) 41
Obr. 5: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces pastorianus po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His). 41
Obr. 6: Produkce tyraminu (TYR) kmeny divokých kvasinek po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His). 42
Obr. 7: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His). 42
Obr. 8: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces pastorianus po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His). 43
Obr. 9: Produkce sperminu (SPN) kmeny divokých kvasinek po 168 hodinách při 12 °C a po 48 hodinách při 30 °C v médiu MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His). 43
Obr. 10: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8). 45
Obr. 11: Produkce tyraminu (TYR) kmeny Saccharomyces pastorianus po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8). 45

Obr. 12: Produkce tyraminu (TYR) kmeny divokých kvasinek po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8)..... 46

Obr. 13: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces cerevisiae po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8)...... 46

Obr. 14: Produkce sperminu (SPN) kmeny Saccharomyces pastorianus po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8)...... 47

Obr. 15*: Produkce sperminu (SPN) kmeny divokých kvasinek po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve dvou různých médiích; MB s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) a upravené MB (4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo-α-hořkých látek; pH 4,8).*..... 47

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Výsledky stanovení tyraminu a sperminu v dekarboxylačních médiích při teplotě kultivace 30 °C po dobu 168 h ..... **Chyba! Záložka není definována.**

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Výsledky degradace tyraminu a sperminu pivních kvasinek při 12 °C po dobu 168 h v médiu MB s aminokyselinami

Příloha P II: Výsledky degradace tyraminu a sperminu divokých kvasinek při 12 °C po dobu 168 h v médiu MB s aminokyselinami

Příloha P III: Výsledky obsahů tyraminu a sperminu vyprodukované kmeny pivních kvasinek ve dvou variantách dekarboxylačního média

Příloha P IV: Výsledky obsahů tyraminu a sperminu vyprodukované kmeny divokých kvasinek ve dvou variantách dekarboxylačního média

PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY DEGRADACE TYRAMINU (TYR) A SPERMINU (SPN) PIVNÍCH KVASINEK KULTIVOVANÝCH PŘI 12°C PO DOBU 168 H V MÉDIU MB S AMINOKYSELINAMI

Mikroorganizmy	Obsah BA* [mg/l]		Degradace BA [%]	
	TYR	SPN	TYR	SPN
Saccharomyces cerevisiae RIBM 2	ND	-2,47±0,46	ND	33
Saccharomyces cerevisiae RIBM 3	-2,15±0,26	-2,30±0,07	49	31
Saccharomyces cerevisiae RIBM 6	-2,89±0,31	-1,96±0,55	66	26
Saccharomyces cerevisiae RIBM 9	-1,99±0,39	ND	46	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 10	-2,18±0,15	ND	50	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 11	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 15	-1,58±0,24	ND	36	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 18	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 32	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 95	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 96	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 139	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 140	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 145	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 146	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 147	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 148	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 149	-0,25±0,19	ND	6	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 150	-0,16±0,19	ND	4	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 151	ND	ND	ND	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 152	-2,58±0,15	ND	59	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 153	ND	ND	ND	ND

*Hodnoty po odečtení obsahu BA v kontrole

PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY DEGRADACE TYRAMINU (TYR) A SPERMINU (SPN) DIVOKÝCH KVASINEK KULTIVOVANÝCH PŘI 12°C PO DOBU 168 H V MÉDIU MB S AMINOKYSELINAMI

Mikroorganizmy	Obsah BA* [mg/l]		Degradace BA [%]	
	TYR	**SPN**	**TYR**	**SPN**
Debaryomyces hansenii DSM 70244	-2,73±0,09	-0,81±0,58	62	11
Dekkera bruxellensis DSM 70001	-0,99±0,24	-0,25±0,23	23	3
Hanseniaspora uvarum RIBM A4	ND	-0,77±0,46	ND	10
Hanseniaspora uvarum RIBM A7	-1,48±0,07	-1,15±0,07	34	15
Hanseniaspora uvarum RIBM A10	-1,90±0,22	-1,24±0,27	43	16
Kluveromyces marxianus RIBM Km	-2,61±0,05	-0,30±0,49	60	4
Pichia fermentans RIBM KI ½	-2,59±0,04	-0,24±0,16	59	3
Pichia membranifaciens RIBM Spk 25	-1,70±0,19	-0,11±0,29	39	1
Pichia membranifaciens RIBM BS 196	-1,68±0,21	-1,06±0,74	38	14
Rohodotrula sp. RIBM A8	-1,39±0,54	-2,14±0,08	32	28
Rohodotrula sp. RIBM A9	-1,58±0,35	-1,66±0,61	36	22
Torulaspora delbrueckii RIBM T1	-1,90±0,14	ND	44	ND
Torulaspora delbrueckii RIBM T2	ND	ND	ND	ND
Torulaspora delbrueckii RIBM T3	-1,88±0,24	ND	43	ND
Torulaspora delbrueckii RIBM T4	-1,97±0,15	ND	45	ND
Torulaspora delbruckeii RIBM T5	-2,23±0,06	ND	51	ND
Zygosaccharomyces bailli RIBM BS 197/B	-0,50±0,08	-1,32±0,53	11	17
Zygosaccharomyces bailli RIBM BS 197/Z	-1,75±0,30	-0,49±0,57	40	6
Lindera saturnus Spk 8	-2,05±0,19	-0,10±0,29	47	1
Candida sp. RIBM C6	-2,59±0,08	ND	59	ND
Candida sp. RIBM C7	-1,55±0,13	-0,68±0,81	35	9
Candida sp. RIBM Spk 76	-2,82±0,05	-0,72±0,08	65	10

*Hodnoty po odečtení obsahu BA v kontrole

PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY OBSAHŮ TYRAMINU (TYR) A SPERMINU (SPN) VYPRODUKOVÁNY KMENY PIVNÍCH KVASINEK VE DVOU VARIANTÁCH DEKARBOXYLAČNÍHO MÉDIA

Mikroorganizmy	MB s AMK	MB s faktory	MB s AMK	MB s faktory
	TYR [mg/l]	TYR [mg/l]	SPN [mg/l]	SPN [mg/l]
Saccharomyces cerevisiae RIBM 2	2,64±0,29	ND	7,79±2,73	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 3	ND	ND	8,20±1,03	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 6	ND	16,52±0,02	7,32±0,52	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 9	1,87±0,16	20,40±1,50	8,33±0,80	18,33±0,07
Saccharomyces cerevisiae RIBM 10	ND	ND	7,99±0,11	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 11	ND	ND	13,38±0,25	39,14±6,24
Saccharomyces cerevisiae RIBM 15	ND	15,06±1,18	ND	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 18	ND	ND	9,59±1,18	ND
Saccharomyces cerevisiae RIBM 32	ND	ND	9,82±1,48	23,38±1,27
Saccharomyces cerevisiae RIBM 95	2,64±0,29	16,02±0,48	7,79±2,73	13,52±0,07
Saccharomyces cerevisiae RIBM 96	3,46±0,03	19,31±0,86	9,03±0,14	18,53±0,19
Saccharomyces pastorianus RIBM 139	0,70±0,08	19,67±1,54	7,79±2,73	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 140	1,44±0,21	15,57±1,91	11,59±0,01	27,93±3,84
Saccharomyces pastorianus RIBM 145	5,68±0,78	13,40±1,29	8,57±0,95	25,30±3,10
Saccharomyces pastorianus RIBM 146	ND	15,87±0,29	8,63±0,07	29,13±4,06
Saccharomyces pastorianus RIBM 147	ND	17,55±2,16	5,05±0,07	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 148	ND	16,75±1,63	6,63±1,08	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 149	2,79±0,28	18,63±1,41	ND	32,06±1,12
Saccharomyces pastorianus RIBM 150	ND	17,38±0,57	ND	29,65±3,87
Saccharomyces pastorianus RIBM 151	ND	14,74±0,83	8,58±1,00	ND
Saccharomyces pastorianus RIBM 152	2,98±0,21	17,18±1,42	ND	36,95±4,85
Saccharomyces pastorianus RIBM 153	ND	14,54±0,52	ND	43,21±4,39

PŘÍLOHA P IV: VÝSLEDKY OBSAHŮ TYRAMINU (TYR) A SPERMINU (SPN) VYPRODUKOVÁNY KMENY DIVOKÝCH KVASINEK VE DVOU VARIANTÁCH DEKARBOXYLAČNÍHO MÉDIA

Mikroorganizmy	**MB s AMK**	**MB s faktory**	**MB s AMK**	**MB s faktory**
	TYR [mg/l]	**TYR [mg/l]**	**SPN [mg/l]**	**SPN [mg/l]**
Debaryomyces hansenii DSM 70244	ND	18,26±0,54	7,26±0,56	34,91±4,70
Dekkera bruxellensis DSM 70001	ND	19,26±0,25	7,09±0,97	34,67±0,94
Hanseniaspora uvarum RIBM A4	ND	13,36±0,10	10,50±0,74	ND
Hanseniaspora uvarum RIBM A7	2,34±0,00	ND	10,05±0,00	27,83±1,32
Hanseniaspora uvarum RIBM A10	3,70±0,00	16,19±0,56	ND	ND
Kluveromyces marxianus RIBM Km	ND	ND	7,16±0,65	16,91±0,43
Pichia fermentans RIBM KI 1/2	ND	17,52±0,44	11,22±0,71	18,74±2,63
Pichia membranifaciens RIBM Spk 25	ND	18,04±0,21	10,86±0,00	31,76±1,48
Pichia membranifaciens RIBM BS 196	2,52±0,17	20,97±0,49	11,42±0,78	20,54±0,41
Rohodotrula sp. RIBM A8	ND	30,10±2,42	10,94±1,56	ND
Rohodotrula sp. RIBM A9	4,84±0,72	18,99±1,09	ND	18,62±1,46
Torulaspora delbrueckii RIBM T1	ND	16,53±0,91	ND	42,72±4,39
Torulaspora delbrueckii RIBM T2	ND	ND	10,82±0,57	27,40±0,08
Torulaspora delbrueckii RIBM T3	4,41±0,04	22,79±3,54	16,49±0,38	ND
Torulaspora delbrueckii RIBM T4	5,64±0,71	12,42±1,10	13,45±1,98	35,63±3,32
Torulaspora delbruckeii RIBM T5	3,22±0,40	13,22±0,38	14,09±1,70	30,08±4,28
Zygosaccharomyces bailli RIBM BS 197/B	5,37±0,46	ND	15,50±1,51	31,84±1,52
Zygosaccharomyces bailli RIBM BS 197/Z	3,51±0,22	14,31±0,93	13,35±2,11	35,10±2,08
Lindera saturnus Spk 8	3,45±0,32	14,95±1,55	11,42±1,81	39,69±0,91
Candida sp. RIBM C6	ND	ND	18,70±0,38	31,99±3,10
Candida sp. RIBM C7	3,41±0,34	15,57±1,88	ND	26,45±3,21
Candida sp. RIBM Spk 76	ND	14,74±1,21	ND	28,76±1,95