

Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z moravských vín

Bc. Zdeňka Foltýnová

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zdeňka Foltýnová**
Osobní číslo: **T12540**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z moravských vín**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se ve vínech.
2. Charakteristika a výskyt biogenních aminů
3. Biogenní aminy ve vínech a možnosti jejich detekce

II. Praktická část

1. Chromatografické stanovení produkce biogenních aminů mikroorganismy izolovanými z moravských vín.
2. Vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií.
3. Vyhodnocení a zpracování výsledků.
4. Diskuze a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á, SIMON-SARKADI, L. AND HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994, 5, 42-49.

BARTOWSKY E.J., HENSCHKE P.A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine ? a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 125, 60-70.

ANCÍN-AZPILICUETA C., GONZÁLEZ-MARCO A., JIMÉNEZ-MORENO N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, 48, 257-275.

ANLI, E. R., BAYRAM, M. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. 2009, 25, 86-102.

MORENO-ARRIBAS M.V., POLO M.C. Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005, 45, 265-286.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan



Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

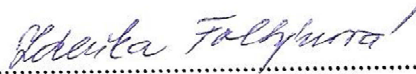
ředitel ústavu

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 2. 5. 2014


.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá dekarboxylázovou aktivitou bakterií izolovaných z moravských vín. V teoretické části je stručně představena technologie výroby vína a popsány mikroorganismy, které se uplatňují v rámci technologie výroby, nebo které mohou mít neblahý vliv na výsledný produkt. Dále jsou charakterizovány biogenní aminy, jejich rozdělení, vznik, výskyt a význam pro lidský organizmus. V praktické části byl proveden skríníng 145 kmenů bakterií vyizolovaných z vín z pěti odrůd (Frankovka, Ariana, Cerason, Mi-5-70 a Cabernet Sauvignon) na jejich dekarboxylázovou aktivitu. Na základě získaných výsledků byl založen experiment s kmenem vykazujícím nejvyšší dekarboxylázovou aktivitu a byla sledována produkce biogenních aminů v závislosti na zvolených faktorech (pH, teplota, přídavek cukru).

Klíčová slova: víno, kvasinky, bakterie, plísně, biogenní aminy

ABSTRACT

Diploma thesis deals with decarboxylase activity of bacteria isolated from Moravian wines. In the theoretical part, winemaking technology is briefly described as well as microorganisms involved in vinemaking or which can have adverse influence on the final product. Then, biogenic amines are characterized, and their classification, formation, occurrence and importance for human organism are stated. In the practical part, screening of decarboxylase activity of 145 bacterial strains isolated from five wine varieties (Frankovka, Ariana, Cerason, Mi-5-70 and Cabernet Sauvignon) was carried out. On the basis of the results obtained, experiment with a strain proving the highest decarboxylase activity was set up and biogenic amines production depending on chosen factors (pH, temperature, addition of sugar) was monitored.

Keywords: wine, yeast cells, bacteria, moulds, biogenic amines

Za odborné vedení a cenné rady, podněty a připomínky při zpracování bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D.

Dále chci poděkovat Ing. et. Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při hledání cizojazyčné literatury, přípravy praktické části a práci v laboratoři.

Poděkování patří i Ing. Zitě Bastlové za pomoc v laboratoři při zpracování vzorků.

Velké poděkování moji rodině za trpělivost a podporu během psaní diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA	12
1.1 VÝSKYT MIKROORGANIZMŮ BĚHEM VÝROBY VÍNA	12
1.1.1 Kvasinky	13
1.1.1.1 Rod <i>Saccharomyces</i>	14
1.1.1.2 Rod <i>Hansenula</i>	15
1.1.1.3 Rod <i>Pichia</i>	15
1.1.1.4 Rod <i>Metschnikowia</i>	15
1.1.1.5 Rod <i>Candida</i>	16
1.1.2 Bakterie	16
1.1.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	16
1.1.2.2 Rod <i>Pediococcus</i>	18
1.1.2.3 Rod <i>Leuconostoc</i>	19
1.1.2.4 Rod <i>Oenococcus</i>	19
1.1.2.5 Bakterie octového kvašení	20
1.1.3 Jablečno-mléčné kvašení.....	22
1.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIOLOGICKÉ ODBOURÁVÁNÍ KYSELIN	23
1.2.1 Hodnota pH	23
1.2.2 Teplota.....	24
1.2.3 Obsah oxidu siřičitého.....	24
1.2.4 Plísně	25
1.3 MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE.....	25
1.3.1 Mikroorganismy způsobující choroby vína	25
1.3.1.1 Těkavé kyseliny (octovatění).....	26
1.3.1.2 Křísovatění.....	26
1.3.1.3 Myšina	26
1.3.1.4 Vláčkovatění	26
1.3.1.5 Mléčné a manitové kvašení.....	27
1.3.1.6 Kvasinkové a bakteriální zákalý	27
1.3.1.7 Bílá hniloba.....	27
1.3.1.8 Máselný tón.....	27
1.3.1.9 Hnilobný tón (šedá hniloba)	27
1.3.1.10 Pelargoniový tón	28
1.3.1.11 Pachuť po plísni	28
2 BIOGENNÍ AMINY.....	29
2.1 DĚLENÍ A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	29
2.1.1 Rozdělení biogenních aminů.....	29
2.1.2 Vznik biogenních aminů	29
2.2 VÝZNAM A PŮSOBENÍ NA LIDSKÝ ORGANIZMUS	30
2.2.1 Význam biogenních aminů a polyaminů.....	30
2.2.2 Toxikologické působení biogenních aminů a polyaminů	30
2.2.2.1 Histamin.....	30
2.2.2.2 Tyramin a fenyletylamin.....	31
2.2.2.3 Putrescin, kadaverin, spermin a spermidin	31

2.3	VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH	32
2.4	HYGIENICKÝ VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH	32
2.5	LEGISLATIVNÍ LIMITY BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	33
2.6	MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	33
2.6.1	Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách	34
3	BIOGENNÍ AMINY VE VÍNECH A MOŽNOSTI JEJICH DETEKCE	36
3.1	TVORBA BIOGENNÍCH AMINŮ VE VÍNĚ	36
3.1.1	Tvorba aminů během alkoholového a jablečno-mléčného kvašení	38
3.1.1.1	Tvorba aminů během alkoholového kvašení	38
3.1.1.2	Tvorba aminů během jablečno-mléčného kvašení.....	38
3.2	MOŽNOSTI DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ VE VÍNĚ.	38
II	PRAKTICKÁ ČÁST	40
4	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	41
5	MATERIÁL A METODY	42
5.1	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	42
5.2	KULTIVACE MIKROORGANIZMŮ	42
5.3	DETEKCE DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY MIKROORGANIZMŮ	42
5.4	ULTRAÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (UPLC).....	43
5.5	STANOVENÍ NÁRŮSTU BUNĚK.....	44
5.6	MĚŘENÍ PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA.....	44
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
6.1	SKRÍNING PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI IZOLOVANÝMI Z MORAVSKÝCH VÍN	45
6.2	MONITORING ZMĚN MNOŽSTVÍ BIOGENNÍCH AMINŮ VYPRODUKOVANÉHO KMENEM V ZÁVISLOSTI NA SLEDOVANÝCH FAKTORECH	50
6.3	SOUHRNNÁ DISKUZE	63
	ZÁVĚR	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK.....	77

ÚVOD

Již od nepaměti provází víno člověka v průběhu jeho života bez ohledu na náboženství, rasu a původ. Také u nás si víno našlo své příznivce a dalo základ tradičnímu řemeslu, které se stalo součástí kulturního dědictví naší země. Kvalitní víno dnes považujeme za přirozený doplněk životního stylu moderního člověka. Současné vinařství využívá moderní šetrné technologie, které umožňují neustálé zlepšování kvality.

Víno je již od starověku považováno za nápoj, který povznáší lidskou mysl a přispívá k dobrému tělesnému stavu člověka. Pravidelné, ale přiměřené pití vína předchází různým onemocněním, uvolňuje naši psychiku, pomáhá odbourat stres, zapomenout na starosti a navodit příjemnou náladu. Víno je složitý komplex látek, které se navzájem ovlivňují, a proto zkoumání účinků na lidské zdraví stále není uzavřenou kapitolou.

Víno je alkoholický nápoj, vzniklý kvašením moštu, získaného z bobulí hroznů révy vinné. Jedná se o fermentační proces, v jehož průběhu dochází k mnohým mikrobiologickým přeměnám, které jsou uskutečňovány převážně kvasinkami a bakteriemi. Tyto mikroorganismy se během technologického procesu výroby vína vzájemně ovlivňují, mění se jejich zastoupení a hrají nezanedbatelnou roli v konečné kvalitě finálního produktu.

Obsah biogenních aminů v potravinách je v dnešní době často diskutovaným problémem. Biogenní aminy jsou látky v lidském organismu přirozené a významné. Ve vyšších koncentracích ovšem mohou vyvolat značné zdravotní komplikace (bolest hlavy, zvýšení srdeční činnosti a krevního tlaku, nevolnost a různé alergické reakce). Jednou ze skupin potravin rizikových na výskyt biogenních aminů jsou fermentované výrobky. Jde o širokou skupinu, která zahrnuje fermentovanou zeleninu, nápoje, fermentované výrobky masného průmyslu a většinu mléčných výrobků. Jejich výskyt je v potravinách závislý zejména na dekarboxylázové aktivitě přítomných mikroorganismů. Aplikace startovacích kultur *Saccharomyces cerevisiae* při alkoholové fermentaci a *Oenococcus oeni* při malolaktické fermentaci jsou zárukou snížení resp. potlačení vzniku biogenních aminů ve víně (www.agronavigator.cz).

Biogenní aminy mohou tedy sloužit jako indikátory procesu fermentace potravin, jejich kažení, ale také špatné výrobní praxe a hygieny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA

Výroba vína je složitý proces, který se liší pro danou odrůdu a výrobce. Zjednodušené schéma výroby vína je zobrazeno na obrázku 1. K hlavním fázím výroby patří zpracování hroznů – mletí a odzrňování hroznů, vznik rmutu, macerace, lisování, odkalení moštu, dále pak úprava cukernatosti a obsahu kyselin a kvašení moštů (Pavloušek, 2010). K dalším krokům je řazeno školení a zrání vína a závěrečné operace. Celý způsob výroby ovlivňuje kvalitu výsledného produktu (Steidl, 2002).



Obrázek 1: Schéma celkové výroby vína (www.wineofczechrepublic.cz)

Výroba bílého a červeného vína se mírně liší. Největší rozdíl spočívá v tom, že červené víno se nakvašuje společně se slupkami, za účelem vyluhování červeného barviva a tříslovitých látek, kdež to u bílého vína kvasí pouze vylisovaný mošt. (Priewe, 2003). Stáčení vína, stabilizace a lahvování jsou operace, které se provádí jak u bílého tak červeného vína (Kraus et al., 1999).

1.1 Výskyt mikroorganismů během výroby vína

Výroby vína se účastní především kvasinky, které patří mezi nejdůležitější skupinu mikroorganismů při výrobě, určitou roli hrají i bakterie a plísňe. Rozsah, ve kterém tyto druhy rostou, určuje typ a koncentrace řady látek, které přispívají k tvorbě vůně a chuti vína (Fleet a kol., 1984).

1.1.1 Kvasinky

Kvasinky mají klíčovou roli při výrobě vína. Jsou nepostradatelné při alkoholovém kvašení, ale v pozdějších fázích výroby mohou způsobit vady vína. Některé rody kvasinek se přirozeně vyskytují na bobulích hroznů v době sklizně nebo se nacházejí na vinařském zařízení (Šilhánková, 2002). V tabulce 1 jsou shrnuty kvasinky přítomné během výroby vína.

Tabulka 1: Obsah kvasinek v moštu během kvašení (upraveno dle Bae, 2005; Flamini, 2008).

Počáteční kvašení	Hlavní kvašení	Závěrečné dokvácení
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , subsp. <i>cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , subsp. <i>cerevisiae</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , subsp. <i>uvarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , subsp. <i>bayanus</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , subsp. <i>bayanus</i>	
<i>Kloeckera corticis</i>	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	
<i>Candida crusei</i>	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	
<i>Hansenula anomala</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	
<i>Pichia mermentas</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	
<i>Pichia membranaefaciens</i>		

Alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení je proces, při kterém dochází k přeměně jednoduchých cukrů pomocí různých druhů kvasinek v moštu na alkohol, oxid uhličitý a teplo podle rovnice:



Nejdůležitějšími kvasinkami jsou *Saccharomyces cerevisiae*, které se považují za glukofilní. Dalším důležitým druhem je *Saccharomyces bayanus* (Malík, 2003). Na první fázi alkoholového kvašení se podílejí kvasinky rodu *Hanseniaspora* sp., *Candida* sp., *Metschnikowia* sp. a *Pichia* sp. a někdy i *Kluyveromyces* sp.. Jejich koncentrace se snižuje, protože se zvyšuje obsah etanolu (Heard G. M. and Fleet G. H., 1985).

Alkoholové kvašení je nejdůležitější fází výroby, jedná se o biochemický proces, který vyžaduje kontrolu během jeho průběhu. Rozlišujeme kvašení řízené a spontánní. V moderním vinařství se však mnohem více využívá řízené kvašení, pro které se používá

tzv. „čistá kultura kvasinek“. Pod tímto označením se skrývá kultura kvasinek vytvořena selekcí jednoho druhu, bez následné kontaminace jinými mikroorganismy. Další část kapitoly bude věnována popisu významnějších rodů kvasinek, které se podílejí na alkoholovém kvašení (Otáhal, 2010; Pavloušek, 2010).

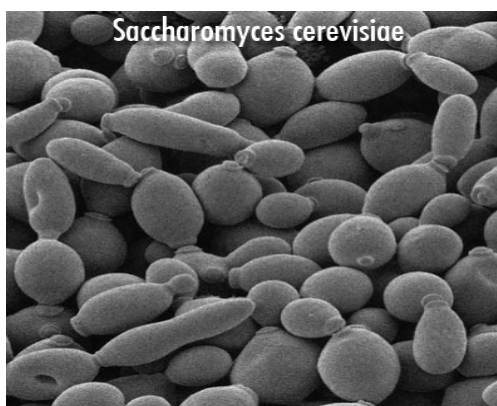
1.1.1.1 Rod *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae

Buňky mají elipsoidní až ovoidní tvar. Délka buňky je 5 – 10 μm a šířka 3 – 7 μm . Tvar buňky je udržovaný pevnou buněčnou stěnou, která obklopuje cytoplazmatickou membránu. Zkvašuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu a z části rafinózu. Řadí se do skupiny kvasinek velmi dobře kvasících a dále se označuje, jako ušlechtilá vinná kvasinka. Produkuje 10 – 15 % (v/v) alkoholu a je odolná vůči SO_2 . V malém množství se nachází na povrchu hroznů a můžeme je nalézt i na povrchu sklepního vybavení. Do moštu se nejčastěji dostává v sušené formě jako čistá kultura kvasinek. Některé vinařské kmeny mají protáhlé elipsoidní buňky a dříve se označovaly jako samostatná varianta *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Šilhánková, 2002)

Saccharomyces cerevisiae* subsp. *bayanus

Tvoří oválné až protáhlé buňky. Zkvašuje glukózu, maltózu, sacharózu a do jedné třetiny rafinózu (Minárik, 1986). Má velmi dobrou zkvašovací schopnost. Je označována jako tzv. „dokvašující kvasinka“. Při kvašení zodpovídá za dokvašení mladých vín, respektive za vykvašení posledního zbytku cukru. Snáší dobře SO_2 a používá se také jako čistá kultura se *Saccharomyces cerevisiae* (Steidl, 2010). Druh *Saccharomyces cerevisiae* je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2: Rod *Saccharomyces cerevisiae*

(<http://www.athiestmonk.com/2011/11/beer-bugs.html>)

Začátek kvašení trvá 2 – 3 dny, je charakteristický pozvolným množením kvasinek a pomalým začátkem prokvašování cukrů. Bouřlivé kvašení začíná třetí až čtvrtý den a trvá několik dnů až týdnů, intenzivně vzniká a uvolňuje se oxid uhličitý. Ten strhává i aromatické a těkavé buketní látky. Teplota se zvyšuje nad 25 °C a musí se zpět regulovat na 15 – 18 °C, u chladnomilných druhů kvasinek až do rozmezí 10 – 12 °C. Dokvášení je poslední fáze kvašení po poklesu obsahu cukru na 2 – 5 g/l a trvá několik měsíců. Dochází k zastavení činnosti kvasinek, zastaví se vývin oxidu uhličitého, kvasinky sedimentují na dno nádoby a usazují se i kaly. Dokvašené víno se odděluje od sedimentu do čistých zasířených kvasných tanků (Steidl, 2002).

1.1.1.2 Rod *Hansenula*

Kvasinky tohoto rodu jsou kulaté, oválné, válcovité až protáhle, morfologicky značně podobné kvasinkám *Pichia* sp. se kterými mají společnou vlastnost, tvorbu dobře vyvinuté kožky (Minárik, Švejcar, 1981). Druh *Hansenula anomala* tvoří na moštu matnou, suchou, bělavou kožku, která silně vzlíná. Tvorba pseudomycelia je dobrá. Kvasinky asimilují a zkvašují glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu do 1/3. Produkce alkoholu je velmi nízká, 3 – 5 % (v/v), tyto kvasinky rovněž produkují estery. Největší výskyt těchto kvasinek je zejména v okrajových vinohradnických oblastech (Minárik, Švejcar, 1981).

1.1.1.3 Rod *Pichia*

Rod *Pichia* patří mezi rody s nízkými kvasnými schopnostmi, neboť jeho druhy zkvašují buď jen glukózu, nebo nezkašují žádný cukr. Vyskytují se v málo alkoholických vínech nebo jako kontaminace, hlavně ve špatně uzavřených lahvích, kde tvoří křís, tj. křehkou vzlínavou blanku na povrchu kapaliny (Šilhánková, 2002). Buňky jsou různého tvaru – od oválných až k dlouze válcovitým. Vyznačují se tvorbou bohatého pseudomycelia stromečkového tvaru. Rozmnožují se pučením, spóry mají kulaté, někdy polokulovité, jsou 1 až 4 ve vřecku (Minárik, Švejcar, 1981). Tento druh se vyznačuje tzv. killerovým faktorem. Vylučuje bílkovinu, která prostupuje buněčnou stěnou citlivých kvasinek a během několika hodin je usmrcuje (Kraus, 1999).

1.1.1.4 Rod *Metschnikowia*

U tohoto rodu se vyskytuje druh *Metschnikowia (Candida) pulcherrima*. Jsou to kvasinky vyskytující se ve všech našich vinohradnických oblastech a tvoří dominantní po-

díl mikroflóry hroznů. Společně s *Kloeckera apiculata* jsou zodpovědné za zahájení spontánního kvašení moštů. Ve vínech se nevyskytují, protože mají malou prokvašující schopnost, 1 – 2 % (v/v) alkoholu. Buňky jsou kulatého až oválného tvaru. V mošttech při spontánním kvašení se rychle rozmnožují, ale jsou také brzy potlačeny jinými vitálnějšími kvasinkami (Minárik, Švejcar, 1981).

1.1.1.5 Rod *Candida*

Kvasinky tohoto rodu jsou z vinařského hlediska zajímavé zejména svým výskytem. Někteří zástupci rodu *Candida* se zásadně vyskytují na hroznech a jsou zodpovědní za zahájení alkoholického kvašení, jiné např. druh *Candida vini* jsou zase velmi častou složkou mikroflóry mladých vín (Minárik, Švejcar, 1981). Výskyt druhu *Candida krusei* je u nás méně častý. Buňky jsou oválné až protáhlé, často v řetízcích. V tekutém prostředí tvoří vzlínavou šedobílou kožku a bohaté pseudomycelium. Zkvašují a asimilují glukózu. Ostatní cukry nevyužívají. Tyto kvasinky podobně jako *Candida vini*, mohou za vhodných podmínek způsobit vznik křísu. Výrazným znakem druhu *Candida vini* je tvorba silné, matné, vysoko vzlínající kožky a dokonalá tvorba bohatě vyvinutého pseudomycelia. Cukry nejsou zkvašovány, pouze je asimilovaná glukóza. V moštu je výskyt těchto kvasinek velmi vzácný. Naproti tomu však tvoří dominantní část kvasinkové flóry mladých vín téměř ve všech našich vinohradnických oblastech. Příliš velké zastoupení těchto mikroorganismů v méně alkoholických vínech může vést, společně s dalšími křísotvornými druhy, ke křísovatění vína (Minárik, Švejcar, 1981).

1.1.2 Bakterie

Bakterie patří k další významné skupině mikroorganismů uplatňující se při výrobě vína (např. ovlivňují jeho chuť). Nejdůležitějšími bakteriemi během výroby vína jsou bakterie mléčného kvašení, ale nejsou jediné, které hrají významnou roli (Osborne a Edwards, 2005; Remize et. al., 2006; Rojo-Bezares et. al., 2006).

1.1.2.1 Rod *Lactobacillus*

Zástupci tohoto rodu jsou grampozitivní, nesporulující bakterie, které mohou být dlouhé a štíhlé tyčinky, někdy mohou být zahnuté. Buňky se vyskytují v řetízcích a jsou mikroaerofilní. Tvoří malé kolonie (2 – 5 mm), které mají celistvé okraje, jsou vypouklé, hladké, lesklé a bez pigmentu. Teplotní optimum je 30 – 40 °C, ale mohou růst v teplotním rozmezí 2 – 53 °C (Osborne a Edwards, 2005). Laktobacily rostou, rozmnožují se a meta-

bolizují za anaerobních podmínek, ale i při sníženém obsahu kyslíku ve všech prostředích, které poskytují dostatek fermentovatelných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin a vitaminů skupiny B. Upřednostňují mezofilní a mírné termofilní teploty. Při fermentaci sacharidů se tvoří kyseliny, které snižují kyselost prostředí až pod pH 4,0. Kyselina mléčná a octová jsou v kyselém prostředí málo disociované a v tomto stavu působí spolu se sníženým pH inhibičně až mikrobicidně na ostatní mikroorganismy v prostředí, s výjimkou jiných BMK a kvasinek (Görner, Valík, 2004).

V přírodě se lactobacily nacházejí na povrchu neporušených rostlin a rostou ve velkém množství na kazícím se ovoci. Z tohoto důvodu mají velký význam při výrobě mnoha rostlinných fermentovaných výrobků a také při kažení poživatin a krmiv rostlinného původu, jako je kysané zelí, kvašené okurky, kvašená zeleninová směs, siláž, pivo, víno, ovocné šťávy a jiné (Görner, Valík, 2004).

Mezi celosvětově rozšířené druhy rodu *Lactobacillus* izolované z hroznů a vína patří *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. cellobisus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. homohiochii*, *L. jensenii*, *L. leichmanii*, *L. plantarum*, *L. sake* a *L. trichodes* (Fugelsang a Edwards, 2007).

Výskyt druhů *Lactobacillus* ve víně je vysoce závislý na pH a obsahu etanolu, na přítomnosti SO₂, teplotě a dostupnosti živin (Du Plessis et.al., 2004). Při vysokém pH (>3,5) druhy rodu *Lactobacillus* často převládají, zatímco při nižších hodnotách pH převládají jiné bakterie mléčného kvašení jako je *Oenococcus oeni*. Tolerance k etanolu závisí na druhu *Lactobacillus* (Osborne a Edwards, 2005).

Rod *Lactobacillus* se vyskytuje v alkoholických nápojích a může přispívat ke zlepšení kvality těchto nápojů, ale také může způsobovat kažení, záleží na druhu a kmeni laktobacilů a také na tom, v které fázi výroby vína se nachází (Hammes et.al., 1992), (Du Plessis et.al., 2004). Jeho nekontrolovatelný růst může vést ke zvýšení kyselosti vína nebo k tvorbě dalších nežádoucích pachů a chutí. Některé druhy produkují velké množství kyseliny octové. Další nežádoucí účinek laktobacilů je pomalé nebo váznoucí kvašení. V mnoha případech, ve kterých „divoké“ laktobacily způsobují kažení vína, nepoužívají vinaři přidávání oxidu siřičitého a počáteční pH vín bylo kolem 3,5, což jsou podmínky podporující růst rodu *Lactobacillus* (Osborne a Edwards, 2005).

Nežádoucí účinek heterofermentativních laktobacilů ve víně je jejich schopnost degradovat arginin. Dochází k tvorbě amoniaku, citrulinu, ornitinu, ATP a CO₂. Tvorba amoniaku způsobí zvýšení pH vína a tím dojde ke zvýšenému růstu nežádoucích bakterií,

kteří mohou využívat tvořící se ATP. Citrulin je toxický, je totiž prekurzorem tvorby karcinogenního uretanu (Orduña a kol., 2001).

Některé rody *Lactobacillus* se účastní jablečno-mléčného kvašení, patří mezi ně *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. hilgardii*, *L. trichodes*, *L. fructivorans*, *L. desidiosus* a *L. mali* (Hammes a kol., 1992; Orduña a kol., 2001)

1.1.2.2 Rod *Pediococcus*

Zástupci tohoto rodu jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující bakterie, které mají kulovitý tvar. Jsou to jediní zástupci bakterií mléčného kvašení, kteří se dělí ve dvou rovinách a tak tvoří tetrády nebo shluky buněk. Jsou aerobní až mikroaerofilní, chemoorganotrofní a vyžadují komplex růstových faktorů a aminokyselin. Všechny druhy vyžadují kyselinu nikotinovou, pantotenovou a biotin. Jsou kataláza i cytochrom negativní, avšak některé kmeny mohou tvořit pseudokatalázu, zvláště když rostou na médiích s nízkým obsahem sacharidů (Osborne a Edwards, 2005). Nacházejí se na rostlinách a ovoci, ale jen v malém počtu. Můžeme je také najít ve kvašeném rostlinném materiálu, jako jsou siláže, okurky nebo olivy, zde se rychle pomnožují a převládají nad ostatními bakteriemi mléčného kvašení v počátečních fázích alkoholového kvašení. Dalším přirozeným místem výskytu pediokoků jsou sýry, sójová omáčka, pivo, čerstvé i konzervované maso, syrové klobásy, čerstvé a marinované ryby (Weiss, 1992).

Pediococcus se může dostávat do vína z půdy, z bobulí révy vinné, z vinařského vybavení. Jejich přežívání ve víně je zvýhodněno při pH vyšším než 3,5. Druhy, které se nacházejí ve víně, jsou *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. pentosaceus* a *P. parvulus* (Davis et. al., 1986).

Růst pediokoků ve víně je považován za nežádoucí, produkují látky ovlivňující chuť a vůni, mezi které patří acetoin a diacetyl. Ty vznikají ve vysoké koncentraci. Některé druhy rodu *Pediococcus* jsou schopny degradovat glycerol na akroletin, látku, která reaguje s fenolovou složkou antokyanů. Tak vzniká hořká chuť vína. Za určitých podmínek však může být růst pediokoků ve víně prospěšný, někdy totiž mohou tvořit vůně a příchutě pro víno žádoucí. Kromě produkce nežádoucích látek ve víně může tento rod tvořit β -D-glukany, což jsou extracelulární polysacharidy. Tyto glukany jsou tvořeny z glukózy a obsahují trisacharidovou opakující se jednotku spojenou 1 \rightarrow 3 vazbou v hlavním řetězci a 1 \rightarrow 2 vazbu, která připojuje vedlejší řetězce jedné D-glukopyranosyl skupiny. Způsobují zvýšení viskozity vína a mají zvýšenou odolnost k etanolu (Osborne a Edwards, 2005).

1.1.2.3 Rod *Leuconostoc*

Zástupci tohoto rodu jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující bakterie, které mají kulatý až čočkovitý tvar, zvláště rostou-li na agaru. Buňky se vyskytují v párech nebo v řetízcích, jsou fakultativně anaerobní (Garvie, 1986). Jsou relativně necitlivé ke kyslíku, avšak lepší růst je pozorován v redukované atmosféře (Holzapfel a Schillinger, 1992). Tvoří malé kolonie, obvykle menší než 1 mm, které jsou hladké, kulaté, bíložedé. Teplotní optimum je 20 – 30 °C, ale mohou růst v teplotním rozmezí 5 – 30 °C po dobu 2 až 10 dnů. (Garvie, 1986). V živných půdách vyžadují přítomnost růstových faktorů, aminokyselin a vitaminy skupiny B (Görner, Valík, 2004). Růst je podmíněn přítomností fermentovatelného sacharidu. Glukózu fermentují všechny druhy pomocí kombinace hexózonofosfátových a fosfoketolázových metabolických drah. Tvoří kyselinu mléčnou, CO₂ a etanol. Některé kmeny mají i oxidativní mechanismus, tyto produkují na místo etanolu kyselinu octovou (Görner, Valík, 2004). *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a další bakterie mléčného kvašení se nacházejí na povrchu bobulí i listů révy vinné a jsou přítomny i v moštu, avšak nedokáží přežít alkoholové kvašení, nejsou uzpůsobeny růstu při vysoké koncentraci etanolu (Holzapfel a Schillinger, 1992).

1.1.2.4 Rod *Oenococcus*

Kmeny nacházející se ve víně patřící do rodu *Leuconostoc* byly původně klasifikovány jako *Leuconostoc oenos* Garviesem v roce 1967. Později fylogenetické studie odhalily, že *Lc. oenos* tvoří odlišný dílčí článek mezi dalšími druhy *Leuconostoc*, proto v roce 1995 byl zpětně reklasifikován Dicksem a kolektivem na nový rod *Oenococcus* (Dicks et al., 1995).

Zástupci tohoto rodu jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující bakterie, které mají elipsoidní nebo kulovitý tvar a vyskytují se obvykle v párech nebo v řetízcích. Tvoří kolonie menší než 1 mm, které jsou hladké, kulaté, šedobílé (Garvie, 1986). Jsou acidofilní, preferují pH 4,8, dokážou však růst i při pH 3,5, a na médiích obsahujících 10 % etanolu. Mají stejné požadavky na komplex růstových faktorů a aminokyselin jako leukonostoky, navíc vyžadují glukózo-deriváty kyseliny pantotenové, které jsou známé jako tomato juice faktor. Jsou fakultativně anaerobní až mikroaerofilní, ale mohou růst i v anaerobním prostředí. Optimální teplota růstu je 20 – 25 °C, preferují spíše 20 °C (Holzapfel a Schillinger, 1992), ale dokážou růst v teplotním rozmezí 5 – 30 °C (Garvie, 1986). *O. oeni* se spolu s dalšími bakteriemi mléčného kvašení vyskytuje na površích listů, bobulí révy vinné a

také v nízkých hladinách v moštu, ale pouze jako jediný dokáže přežít během alkoholového kvašení. Je nejvíce zapojen v jablečno-mléčném kvašení ve víně. To je v závislosti na typu vína, regionu a výrobních technikách považováno za prospěšné nebo škodlivé (Holzapfel a Schillinger, 1992).

Jablečno-mléčné kvašení je nežádoucí u australských vín, která mají vysoké pH. Dochází u nich ke snížení kvality a růstu bakterií, které způsobují kažení vína. Růst *O. oeni* a poměr jablečno-mléčného kvašení je ovlivňován pH vína, koncentrací etanolu, SO₂, kmenem kvasinek používaných při alkoholovém kvašení, teplotou, a inhibičními složkami jako jsou mastné kyseliny, fenolové kyseliny a taniny (Holzapfel a Schillinger, 1992). Glukóza a fruktóza, dva hlavní sacharidy zastoupené ve víně, mohou sloužit jako zdroj energie pro růst *O. oeni*. Také dusíkaté požadavky na výživu hrají roli při optimalizaci jablečno-mléčného kvašení a je nutné vzít v úvahu interakce jablečnanového metabolismu a metabolismu dalších uhlíkových zdrojů, které jsou přítomny ve víně po alkoholovém kvašení. Kofermentace sacharidů a jablečnanu je závislá na kmeni *O. oeni* a na kultivačních podmínkách, jako jsou pH a koncentrace biomasy. V přítomnosti glukózy dochází k potlačení jablečno-mléčného kvašení v 65 – 70 %. Také galaktóza, manóza, maltóza a trehalóza dokáží potlačovat tento typ kvašení v 60 % (Remize a kol., 2006). Během jablečno-mléčného kvašení *O. oeni* dochází k degradaci kyseliny citrónové. Při této degradaci vzniká jako meziprodukt diacetyl, který je považován za důležitou látku, která ovlivňuje vůni vína. Ve vysokých koncentracích způsobuje „máslové“ nebo „oříškové“ aroma. Zdroj diacetylu je α -acetomléčná kyselina, což je nestabilní složka, která podléhá spontánní nebo bakteriální dekarboxylaci na acetoin, který je oxidován na diacetyl. Diacetyl je redukován *O. oeni* na acetoin a 2,3-butandiol, které v normálních koncentracích neovlivňují vůni vína (Nielsen a Richelieu, 1999).

1.1.2.5 Bakterie octového kvašení

Bakterie octového kvašení (AAB = acetic acid bacteria) jsou gramnegativní nebo gramvariabilní, aerobní, chemoorganotrofní, kataláza pozitivní, tyčinky nebo elipsoidní bakterie, které se vyskytují v párech nebo v řetězcích. Mohou být pohyblivé pomocí peritrichálních bičků nebo pomocí 1 – 8 polárních bičků nebo nepohyblivé. Jejich teplotní optimum je 25 – 30 °C, optimální pH je 5 – 6, (De Ley et. al., 2005; Jackson, 2008). Patří do čeledi *Acetobacteraceae*, její nejvýznamnější rody jsou *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter*. *Acetobacter* a *Gluconobacter* byly izolovány

z květin, ovoce, vína, moštu, piva, včel a medu. Jsou to primární mikroorganismy zahrnuté v produkci octa. *Acetobacter* může být také nalezen v zahradní půdě a odpadní vodě (De Ley et. al., 2005).

Gluconobacter oxydans, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter liquefaciens* a *Gluconacetobacter hansenii* jsou spojovány s hrozny a vínem. Během kvašení a skladování převládají rody *G. oxydans*, *A. pasteurianus* a *A. aceti*. Druhy rodu *Gluconobacter* jsou běžně izolovány z hroznů a šťávy, ale vymizí na počátku alkoholového kvašení díky jejich nízké toleranci k etanolu nebo díky ztrátě kyslíku. *Gluconobacter oxydans* je nejvýznamnější druh, který se nachází na zdravých, nehnílych hroznech. *Acetobacter* je více tolerantní k etanolu než *Gluconobacter* a může přežívat i během alkoholového kvašení. *A. aceti* a *A. pasteurianus* izolovány z hroznů a šťávy běžně dosahují populace 10^6 buněk na gram poškozených hroznů. Tyto druhy jsou časté na kazících se hroznech. Kvasinky přítomné na poškozených hroznech mohou metabolizovat hroznové cukry a tak produkovat etanol, který je těmito bakteriemi oxidován na kyselinu octovou. (Osborne a Edwards, 2005).

Protože jsou bakterie octového kvašení aerobní povahy, jsou přirozeně potlačovány v anaerobním prostředí, které je spojeno s alkoholovým kvašením. Kromě přítomnosti kyslíku je růst bakterií octového kvašení značně ovlivňován pH moštu (Osborne a Edwards, 2005). Bakterie octového kvašení tvoří kyselinu octovou skrz oxidaci etanolu pomocí dvou enzymů vázaných na membránu, alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy. Alkoholdehydrogenáza oxiduje etanol na acetaldehyd, který je dále oxidován na kyselinu octovou pomocí aldehyddehydrogenázy (Saeki et. al., 1997).

Během růstu ve víně využívají bakterie octového kvašení glukózu jako zdroj uhlíku, ačkoliv glukóza je lepší zdroj uhlíku pro *Gluconobacter* než pro *Acetobacter*, protože ne všechny kmeny *Acetobacter* mohou účinně využívat tento cukr. Druhy *Acetobacter* metabolizují cukry skrz hexóza-monofosfátovou cestu, také přes Embden-Meyerhof-Parnasovu cestu a Entner-Doudoroffovu cestu a produkují octan a mléčnan. Tyto látky mohou být později oxidovány některými kmeny na oxid uhličitý a vodu skrz cestu trikarbonových kyselin. Na rozdíl od rodu *Acetobacter*, druhy rodu *Gluconobacter* využívají jen pentóza-fosfátovou cestu k tvorbě energie. Tyto organismy neobsahují funkční cyklus trikarbonových kyselin, proto nemohou oxidovat octan a mléčnan až na oxid uhličitý a vodu. Kromě glukózy mohou bakterie octového kvašení využívat i další cukry, které se mohou

nacházet ve víně, jako jsou arabinóza, fruktóza, galaktóza, manitol, manóza, ribóza, sorbitol a xylóza (De Ley et. al., 2005).

A. aceti a *A. pasteurianus* jsou často spojeny s kažením vína pomocí produkce vysoce těkavých kyselin. Tyto bakterie jsou aerobní, ale jsou běžně izolovány z vína ze dna tanků a barelů, proto jsou schopny přežít a možná i růst v anaerobních a semi-anaerobních podmínkách. Hlavní význam bakterií octového kvašení při kažení vína je v produkci nadměrného množství kyseliny octové v přítomnosti nízké koncentrace kyslíku (Bartowsky et. al., 2003). Další hlavní produkt, který ovlivňuje kvalitu vína, je etylacetát. Bylo prokázáno, že bakterie octového kvašení produkují etylacetát až do koncentrace 140 mg/l ve víně a 30 mg/l v moštu (Osborne a Edwards, 2005).

Další nežádoucí látky pro kvalitu vína kromě kyseliny octové a etylacetátu, které produkují bakterie octového kvašení, jsou acetaldehyd, acetoin a dihydroxyaceton (Osborne a Edwards, 2005). Drysdale a Fleet uvedli, že byla zjištěna zvýšená koncentrace acetaldehydu ve víně, kde rostly bakterie octového kvašení. Koncentrace acetaldehydu nad smyslový práh ve víně (což je 100 – 125 mg/l) je nepříjemná kvůli „zelené“, „travnaté“ a „rostlinné“ vůni. Dihydroxyaceton může být produkován *A. aceti* a *G. oxydans* přes metabolismus glycerolu v aerobních podmínkách. Tato látka může ovlivňovat smyslovou kvalitu vína sladkou/esterickou chutí a může také reagovat s prolinem za tvorby „kůrové“ vůně. Kromě toho acetaldehyd a dihydroxyaceton mohou vázat oxid siřičitý ve víně za tvorby látek, které jsou neúčinné jako antimikrobiální agens. Některé druhy *Acetobacter* mohou využívat laktát za produkce acetoinu, prekursoru diacetylu (Osborne a Edwards, 2005).

Nejvyšší riziko kažení vína bakteriemi octového kvašení je během rozsáhlého skladování ve sklepech před stáčením do lahví. Toto riziko může být sníženo zabráněním vystavení vína kyslíku, nebo přidáváním SO₂ (Bartowsky et. al., 2003).

1.1.3 Jablečno-mléčné kvašení

Hroznový mošt obsahuje celou řadu organických kyselin. Největší podíl celkové kyselosti tvoří kyseliny vinná a jablečná. Obsah kyseliny jablečné je závislý na vnějších podmínkách, zatímco obsah kyseliny vinné je poměrně stabilní (Minárik, 1986). Jablečno-mléčné kvašení (JMK) je druhotné kvašení způsobené růstem některých bakterií mléčného kvašení. JMK mohou započít mléčné bakterie přirozeně se vyskytující ve víně, ale v dnešní době ho vinaři spíše vyvolávají za pomoci komerčních startovacích kultur.

Mezi preferované druhy, které provádí JMK, patří *Oenococcus oeni* – především díky své vysoké toleranci k etanolu a aciditě a *Lactobacillus plantarum* (Bae, 2005). Při aplikování čisté kultury je třeba si uvědomit, že důležitý není jen samotný kmen bakterií, ale hlavně jeho přizpůsobení se danému prostředí. Proto je třeba kmeny mléčných bakterií nejdříve adaptovat na prostředí s nízkým pH a s kyselinou jablečnou (Minárik, 1986). Hlavní úlohou mléčných bakterií při kvašení je přeměna kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou a oxid uhličitý, který z prostředí uniká. Tím se z dikarboxylové kyseliny produkuje slabá monokarboxylová, takže dochází ke snížení kyselosti vína (Minárik, 1986; Bae, 2005; Osborne a Edwards, 2005; Remize et. al., 2006; Rojo-Bezares et. al., 2006). Jablečno-mléčné kvašení začíná už ve fázi dokvašení, když část kvasinkových buněk sedimentuje a zčásti i autolyzuje (Minárik, 1986).

Mezi nejznámější rody bakterií mléčného kvašení nacházející se v hroznech a ve víně patří rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Oenococcus* (Rojo-Bezares et. al., 2006).

1.2 Faktory ovlivňující biologické odbourávání kyselin

Proces biologického odbourávání kyselin ovlivňuje několik faktorů. Patří mezi ně zejména hodnota pH moštu nebo vína, jeho teplota a obsah oxidu siřičitého (Steidl, 2010).

1.2.1 Hodnota pH

Hodnota pH je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují průběh JMK. Obvyklá hodnota je v rozmezí 3,0 – 3,6 pH. Čím vyšší je hodnota pH moštu nebo vína, tím snadněji dochází k rozmnožování mléčných bakterií a k rychlejšímu průběhu JMK (Steidl, 2010).

Zvýšení hodnoty pH u moštů způsobí, že takové mošty a vína jsou potom náchylnější na růst divokých mléčných bakterií. Nízká hodnota pH brzdí naopak růst a vývoj rodu *O. oeni*. Jestliže je hodnota vysoká, dochází k rozvoji bakterií rodů *Pediococcus* a *Lactobacillus* nebo také k rozvoji kvasinek rodu *Brettanomyces*. Ve vínech s hodnotou pH < 3,5 jsou dominantní kmeny bakterie rodu *Oenococcus oeni*. Ve vínech s hodnotou pH > 3,5 se mohou častěji vyskytovat bakterie rodů *Pediococcus* a *Lactobacillus* a mohou se stát dominantními. Neřízená JMF, zejména při hodnotách pH > 3,5 může vytvářet negativní sensorické vlastnosti, jako jsou mléčné a jogurtové aroma, hořké tóny v chuti vína, animální a octové tóny. U vín s nízkým obsahem kyselin a hodnotou pH > 3,5 může také díky aktivitě

bakterií rodů *Pediococcus* a *Lactobacillus* dojít k odbourávání kyseliny vinné za vzniku kyseliny mléčné, kyseliny octové a CO₂ (Pavloušek, 2010).

1.2.2 Teplota

Teplotní optimum pro JMK leží mezi 22 – 25 °C. Ke spontánnímu nástupu a průběhu JMK většinou nedochází při teplotách pod 10 °C (Steidl, 2010).

Autolytická aktivita kvasinek na konci alkoholového kvašení upravuje koncentraci aminokyselin, peptidů a bílkovin ve víně. Při autolýze se uvolňují glukany a mannoproteiny. Mannoproteiny mohou stimulovat růst bakterií dvěma způsoby. Buď tím, že poutají některé nežádoucí mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem a tím zbavují víno látek, které jsou pro mléčné bakterie toxické, nebo dodávají živiny díky enzymatické hydrolyze. Ponechání kvasničných kalů ve víně po vykvašení proto může být pro nástup JMK pozitivní. Nehledě na skutečnost, že kvasničné kaly vytvářejí reduktivní prostředí a brání tím oxidaci vína, neboť z důvodů aktivace JMK není možné aplikovat SO₂ (Pavloušek, 2010).

Optimální podmínky pro JMK lze shrnout takto: teplota alespoň 18 °C, minimální aplikace oxidu siřičitého, úprava pH pomocí chemického odkyselení, delší ponechání vína na kvasnicích a vyšší podíl kalových částic, aplikace čisté bakteriální kultury (Steidl, 2010).

1.2.3 Obsah oxidu siřičitého

Obsah oxidu siřičitého (SO₂) velmi dobře eliminuje populaci všech bakterií. Významný je obsah volného SO₂. Vázaný SO₂ má výrazně nižší antimikrobiální působení než volný SO₂. Slabé síření moštu většinou nemá negativní vliv na proběhnutí JMK, protože v průběhu alkoholového kvašení se obsah volného SO₂ zpravidla sníží a většina mladých vín nemá větší obsah než 25 – 40 mg/l celkového SO₂. Aplikace SO₂ do mladých vín může naproti tomu velmi negativně ovlivnit nástup a průběh JMK. V takovém případě může i aplikace SO₂ v množství 20 mg/l působit negativně (Steidl, 2010).

V moštech s nedostatečným obsahem živin mohou některé kmeny kvasinek vytvářet vyšší obsah SO₂, který může následně brzdit rozvoj mléčných bakterií. (Rauhut et. al., 2004) v této souvislosti uvádí, že přidavek cysteinu a glutationu po ukončení alkoholového kvašení přispívá ke stimulaci růstu mléčných bakterií (Pavloušek, 2010).

1.2.4 Plísně

Rody *Aspergillus* a *Penicillium* patří mezi nejrozšířenější mikroskopické houby, které se vyskytují často jako kontaminanty hroznových bobulí. Je možné je označit za škodlivé. Na rozdíl od *Botrytis cinerea* napadají téměř výlučně bobule poškozené hmyzem, ptáky, kroupami apod. Pro svoje typické zelené mycelium se kontaminace nazývá „zelenou hnilobou“. Houby rodu *Penicillium* se ve vinohradech vyskytují kromě *Botrytis cinerea* (ta je z vinařského hlediska velice důležitá) nejčastěji. Kontaminované hrozny mají ve stádiu zralosti snížený obsah cukru, dusíku a kyseliny vinné. Důsledkem tvorby kyseliny glukonové a kyseliny citronové z cukru se celkový obsah kyselin zvyšuje. Typická je tvorba hořkých látek. *Penicillium expansum* produkuje prchavé substance, které se projevují známou „plísňovou“ vůní a chutí (Minárik, 1986).

1.3 Mikrobiální kontaminace

Mikrobiální kontaminace nebo choroby způsobené rozvojem mikroorganismů mohou negativně ovlivňovat kvalitu vína. Révový mošt, který je bohatý na cukry a živiny, je vhodným substrátem pro mnoho druhů mikroorganismů a to kvasinky, bakterie a plísňové houby (hniloby). Po ukončení alkoholového kvašení snižuje přítomnost alkoholu potenciál pro rozvoj mnoha mikroorganismů, ale v konečné fázi výroby mohou být přesto některé kvasinky a bakterie stále ještě aktivní (www.ekovin.cz).

Využití cukrů při dýchání vytváří více energie, než kvašení. Dýchání je podporované v důsledku rychlého rozmnožování populace kvasinek v průběhu průmyslové výroby selektovaných kvasinek (www.ekovin.cz).

1.3.1 Mikroorganismy způsobující choroby vína

Na kontaminaci vína se mohou podílet všechny skupiny mikroorganismů. V dnešní technologii se dá těmto mikroorganismům předcházet a případně zastavit jejich činnost, aby neohrožovaly chuť a vlastnosti hotového vína. Choroby vína jsou způsobeny mikroorganismy, které se nacházejí v hroznech, mošttech a ve víně. Tyto mikroorganismy vytvářejí vlastní, negativně působící produkty své látkové přeměny nebo mohou měnit či likvidovat látky obsažené ve víně a tím podstatně ovlivňují kvalitu vína (Pavloušek, 2010).

1.3.1.1 Těkavé kyseliny (octovatění)

Víno postižené touto chorobou má tmavší barvu, je mírně zakaleno a může mít na povrchu jemnou křísovou pokožku. Voní kysele po octu a chuť je ostře kyselá. Původcem této choroby jsou především octové a mléčné bakterie (Steidl, 2010).

Velké nebezpečí hrozí u vín, kde začíná jablečno-mléčná fermentace, protože mají vyšší obsah zbytkového cukru. Vysoký obsah těkavých kyselin se může vyskytovat také u hroznů napadených šedou hnilobou. Tvorba kyseliny octové se zvyšuje i při oxidaci a tvorbě křísu, především u červených vín, kde se víno oxidaci záměrně vystavuje. Na octovatění mohou mít vliv také divoké kvasinky, hlavně rody *Hanseniaspora*, *Kloeckera* nebo kvasinky rodu *Brettanomyces* (Pavloušek, 2010).

1.3.1.2 Křísovatění

Křísovatění je způsobeno kvasinkami, které vytvářejí na povrchu vína bílý povlak. Vůně vína je zatuchlá a chuť je slabá, prázdná, zvětralá a může chutnat po žluklém másle (Steidl, 2010). Křísovatění způsobují především kožkotvorné kvasinky. Jedná se hlavně o druhy *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *Candida vini*, *Candida zeylanoides*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Debaromyces hansei* (Pavloušek, 2010).

1.3.1.3 Myšina

Myšina patří mezi nepříjemné choroby vína. Postihuje aromatický a chuťový projev. Myšina se projevuje v dochuti vína, na zadním patře úst. I vůně vína je zatuchlá a oxidativní, často naoctělá. Často se vyskytuje u mladých vín se zbytkovým cukrem, u vín s nízkým obsahem kyselin a vysokým pH a také při nedostatečné aplikaci oxidu siřičitého.

Nejpravděpodobněji způsobují myšinu mléčné bakterie – rody *Lactobacillus*, *Oenococcus* a druh *Leuconostoc mesenteroides*. V chladnějších vinařských oblastech to mohou být kvasinky rodu *Brettanomyces*, které jsou také známé produkcí těkavých fenolů (Pavloušek, 2010).

1.3.1.4 Vláčkovatění

Vláčkovatění vína je způsobováno především bakteriemi mléčného kvašení, které kromě kyseliny jablečné, mohou přetvářet i cukr na polysacharidy zvyšující viskozitu (Steidl, 2010) Na tvorbě slizu se podílejí především bakterie kmenů *Pediococcus*, *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. Jedná se především o *Pediococcus damnosus*, *Leuconostoc mesen-*

teroides a *Leuconostoc dextranicum* (Eder et al., 2006) Vláčkovatění se rozvíjí hlavně při vysokých hodnotách pH (nad 3,5), při ležení vína na kvasnicích a vyšší teplotě sklepa (Kraus, Hubáček, Ackermann, 2004). Vína napadená touto chorobou jsou na pohled hustší a ulpívají na stěnách láhve nebo sklenice. Chuť je fádňí bez významného aroma (Pavloušek, 2010).

1.3.1.5 Mléčné a manitové kvašení

Mléčné, tzv. nečisté kvašení se objevuje u vín s nízkým obsahem kyselin a tříslovin, ihned po ukončení kvašení při vyšších teplotách ve sklepě. Může vzniknout činností některých druhů mléčných bakterií. Bakterie mléčného kvašení rozkládají cukr v dokvážejícím víně na kyselinu mléčnou, octovou a oxid uhličitý (Otáhal, 2010).

1.3.1.6 Kvasinkové a bakteriální zákal

Po nesterilním lahrování vína se za vhodných podmínek mohou rozmnožovat kvasinky nebo bakterie. Víno se vyznačuje ostrou, neharmonickou chutí a kvasnou, moštovou vůní. Na okraji nádoby se může vytvářet pěnový kruh a bublinky plynu (Steidl, 2010).

1.3.1.7 Bílá hniloba

Původcem této hniloby je houba *Metasphaera diplodiella*. Postihuje především dřevo révového keře a bobule, které získávají mléčné zbarvení u bílých odrůd a kávově hnědé u modrých odrůd. Na bobulích napadených bílou hnilobou dochází k rozvoji octových bakterií. Získají tak typickou octovou vůni. Choroba se rozšiřuje především za teplého a vlhkého počasí (Pavloušek, 2010).

1.3.1.8 Máselný tón

Tato choroba se ve víně nejčastěji projevuje chuťovým dojmem „žluklého másla“. Způsobují ji bakterie máselného kvašení rodu *Clostridium*. Výskyt máslového tónu je obvyklý u vín s nízkým obsahem kyselin nebo vysokým pH. Může se vyskytovat u vín, u nichž proběhlo chemické odkyselení (Pavloušek, 2010).

1.3.1.9 Hnilobný tón (šedá hniloba)

Hnilobu způsobuje především plíseň šedá (*Botrytis cinerea*). *Botrytis cinerea* je jedním z mikroorganismů, který ve vinařství vykazuje pozitivní a zároveň negativní vliv.

Podle povětrnostních podmínek se rozlišuje mokrá, nezralá nebo kyselá hniloba. Při silném podílu hniloby je vinné aroma negativně ovlivněno (Eder et al., 2006).

1.3.1.10 Pelargoniový tón

Pelargoniový tón způsobuje zvláštní, mírně hořkou vůni a chuť připomínající pelargonie. Může se vyskytovat u vín, která mají zbytek cukru a byla zakonzervována kyselinou sorbovou nebo sorbany. Vzniká při jejím odbourávání mléčnými bakteriemi při kvašení. Použití kyseliny sorbové ke konzervaci je povoleno až do množství 200 mg/l (Eder et al., 2006).

1.3.1.11 Pachut' po plísni

Pachut' po plísni se do moštu a vína přenáší především z hroznů napadených a nahnilých. Víno má ostrou a zatuchlou vůni a nepříjemně dráždivou chuť (Kraus, Hubáček, Ackermann, 2004). Příčinou jsou houbové plísně, které jsou rozšířeny především na prasklých bobulích, ale mohou se šířit i moštem nebo zbytky vína ve vinařském sklepě. Nejvýznamnějšími plísněmi jsou *Penicillium* a *Aspergillus* (Steidl, 2010).

2 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou látky známé více než 100 let. V roce 1903 bychom je našli pod dnes už zastaralým názvem "ptomainy", což označovalo jedovaté látky. Dnes se ví, že biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky bazické povahy odvozené od aminokyselin. Vyskytují se v buňkách rostlinných i živočišných, kde zajišťují řadu důležitých funkcí, ale v nadměrném množství mohou způsobovat nežádoucí až toxické účinky (Komprda, 2004; Velíšek 2002).

V potravinách bylo objeveno přes 30 psychoaktivních a vazoaktivních aminů (Standara, Veselá, Drdák, 2000).

Za nejvýznamnější BA v potravinách jsou považovány histamin (HI), tyramin (TY), tryptamin (TRP), putrescin (PU), kadaverin (CAD), spermin (SP), spermidin (SPM), fenylethylamin (PHE) (Shalaby, 1997; Velíšek, 2002; Zhijun, Yongning et al., 2007).

BA lze nalézt jako důsledek mikrobiální činnosti v potravinách, jako je víno, kysané masné a rybí výrobky, sýry a fermentovaná zelenina (Suzzi, 2003).

2.1 Dělení a vznik biogenních aminů

2.1.1 Rozdělení biogenních aminů

Rozdělení biogenních aminů není pevně dané a v poslední době se objevují změny v zařazení biogenních aminů do jednotlivých skupin. Podle chemické struktury se mohou dělit na (Komprda, 2004; Smělá a kol., 2004; Kim, Mah, Hwang, 2009; Standarová, Borokovcová, Vorlová, 2009):

- alifatické: putrescin, kadaverin
- aromatické: tyramin, fenylethylamin
- heterocyklické: histamin a tryptamin
- polyaminy: spermidin, spermin, putrescin a případně i agmatin.

2.1.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají jako produkty běžné metabolické činnosti rostlin, zvířat i mikroorganismů (Smělá a kol., 2004).

Vznikají působením enzymů dekarboxyláz z aminokyselin nebo transamináz z aminokyselin a karbonylových sloučenin, při jejich transformaci na další biologicky aktivní produkty se uplatňují také oxygenázy a metyltransferázy (Shalaby, 1997).

Decarboxylace je děj, při kterém se odbourává karboxylová skupina aminokyselin (Smělá a kol., 2004). Probíhá dvěma mechanismy, bez účasti pyridoxalfosfátu jako koenzymu nebo za jeho účasti, kdy karbonylová skupina pyridoxalfosfátu reaguje s aminokyselinou za vzniku Schiffovy báze jako meziprojektu. Poté nastává dekarboxylace a vznik odpovídajícího aminu (Shalaby, 1997).

2.2 Význam a působení na lidský organizmus

2.2.1 Význam biogenních aminů a polyaminů

BA mají v organizmu významnou roli, neboť jsou zdrojem dusíku a prekurzory hormonů, nukleových kyselin či proteinů. V potravinách jsou nositeli aroma (Kalač, 2009).

Polyaminy jsou nepostradatelnou složkou pro růst a proliferaci buněk a pro normální funkci imunologického systému střeva. Přestože si tělo dokáže polyaminy samo syntetizovat, určité množství je přijímáno z potravy. Významné jsou i jejich antioxidační účinky. Polyaminy působí příznivě při zpomalování procesu opotřebenosti a stárnutí buněk. Jejich účinky spočívají ve schopnosti vyčtyávání volných radikálů (Kalač, 2009).

2.2.2 Toxikologické působení biogenních aminů a polyaminů

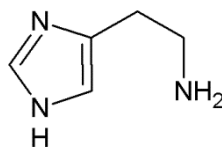
Při nadměrném příjmu biogenních aminů z potravy nebo při snížené schopnosti detoxikujícího enzymového systému, způsobují nežádoucí účinky (Velíšek, 2002, Lange et al., 2002; Komprda, 2004; Kubáň, 2007).

2.2.2.1 Histamin

Je silně bazický a velmi biologicky aktivní. Má významnou úlohu jako mediátor některých nervových spojů a při vzniku alergií. V mozku je přítomen v histaminoergních neuronech. Má vztah k řízení pozornosti, sexuálního chování a k regulaci krevního tlaku, příjmu tekutin a prahu pro bolest, vyvolává kontrakci hladkých svalů. Uvolňuje se i při poškození tkání a vyvolává místní známky zánětu (Kalač, Šavel, Křížek a kol., 2002).

Nachází se i v buňkách žaludeční sliznice, kde se podílí na sekreci žaludeční šťávy.

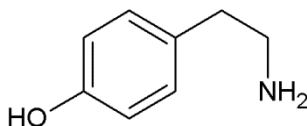
Histamin je přirozeně přítomen v krvi v koncentraci 25 – 130 mg/l. Intoxikace histaminem se projevuje příznaky, jako jsou zvracení, průjemy, bolest hlavy, svědění, návaly horka, pocení (Ibe, Saito, Nakazato et al, 1991; Silbernagl, Despopoulos, 1993; Ancín-Azpilicueta et al., 2008).



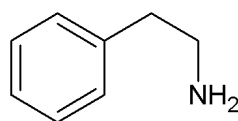
Obrázek 3: Histamin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)

2.2.2.2 Tyramin a fenyletylamin

Tyramin a podobně i tryptamin a fenyletylamin jsou vazokonstrikční aminy. Tyramin provokuje uvolnění noradrenalinu ze sympatiku a zvýšení arteriálního krevního tlaku. Působením tyraminu se také zrychluje dýchání, zvyšuje se slzení a slinění a obsah glukózy v krvi. Podobně fenyletylamin způsobuje uvolnění norefedrinu a tím také zvýšení krevního tlaku. Příznakem otravy těmito aminy jsou také záchvaty migrény (Ancín-Azpilicueta et al., 2008).



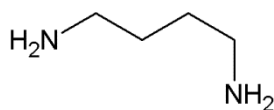
Obrázek 4: Tyramin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)



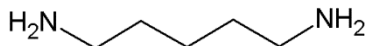
Obrázek 5: Fenyletylamin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)

2.2.2.3 Putrescin, kadaverin, spermin a spermidin

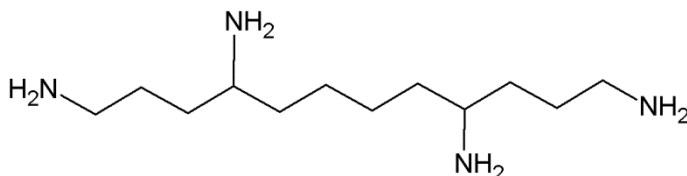
Přestože mají putrescin a kadaverin nízkou toxickou aktivitu, vstupují do reakcí s aminooxidázami, inhibují je a násobí toxický efekt histaminu a tyraminu (Novella-Rodríguez et al., 2003). Obdobné účinky jsou u sperminu a spermidinu, které zvyšují transport histaminu ve střevní stěně a mohou taktéž působit jako potenciátory účinku histaminu (Halász et al., 1995).



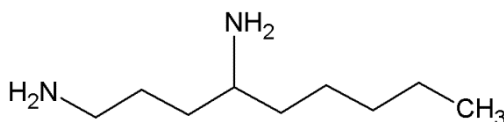
Obrázek 6: Putrescin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)



Obrázek 7: Kadaverin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)



Obrázek 8: Spermin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)



Obrázek 9: Spermidin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)

2.3 Výskyt biogenních aminů a polyaminů v potravinách

Výskyt BA lze očekávat v každé potravíně, která obsahuje proteiny či volné aminokyseliny a jsou-li v ní vhodné podmínky pro rozvoj mikroorganismů. Celkové množství BA se liší v závislosti na původu potraviny a přítomnosti mikroorganismů. BA mohou být přítomny v mnoha potravinách, jako jsou ryby a rybí produkty, masné výrobky, mléčné výrobky, vejce, víno, pivo, zelenina, ovoce, ořechy a čokoláda (Silla Santos, 2009).

Z hlediska výskytu se obvykle potraviny dělí na nefermentované, v nichž BA vznikají především činností hnilobných bakterií, a na fermentované, v nichž je rozhodující působení bakterií mléčného kvašení (Kalač, Krausová, 2005).

2.4 Hygienický význam biogenních aminů a polyaminů v potravinách

Z hygienického hlediska mohou BA u nefermentovaných potravin sloužit jako indikátory nežádoucí mikrobiální činnosti a jejich stanovení může být využito k posouzení míry rozkladu sledovaného materiálu (Standarová, Borkovcová, Vorlová, 2008).

V případě skladování potravin může být obsah BA ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování (Standarová, Borkovcová, Vorlová, 2008).

V této souvislosti byl zaveden tzv. index biogenních aminů (BAI), který využívá skutečnosti, že obsah histaminu, putrescinu a kadaverinu se v průběhu skladování daného produktu zvyšuje, na druhé straně se však množství polyaminů spermidinu a sperminu nemění nebo dokonce snižuje. SPD a SPM totiž primárně nevznikají činností mikrobiálních dekarboxyláz v potravíně, ale vstupují do ní jako původní látky z použité suroviny.

Index biogenních aminů se uvádí jako:

$$\text{BAI} = \frac{\text{HIS} + \text{PUT} + \text{CAD}}{1 + \text{SPD} + \text{SPM}} \text{ [mg/kg]},$$

čím je podíl indexu biogenních aminů vyšší, tím je kvalita a sensorické vlastnosti potravin horší (Komprda, 2004).

2.5 Legislativní limity biogenních aminů a polyaminů

V České republice je podle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 stanoven limit pouze pro histamin. A to pro produkty rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu. Povolенý limit je 100 – 200 mg/kg. A pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku vyrobených z ryb s vysokým obsahem histidinu. Pro tuto skupinu je povolený limit 200 – 400 mg/kg (EU Nařízení komise 2073/2005).

V 90. letech 20. století a v první části minulé dekády byly vyhláškou č. 298/1997 Sb. stanoveny limity pro histamin v rybách, rybích výrobcích 200 mg/kg, pivu a vínu 20 mg/kg. Dále to byl tyramin pro sýry tvrdé, měkké, zrající 200 mg/kg, olomoucké tvarůžky 350 mg/kg a pro červená vína 50 mg/kg a pro vybranou skupinu potravin ve vyhlášce označenou jako skupina A 100 mg/kg. Do skupiny A patří například tyto potraviny: mléko, kojenecká a dětská výživa, vepřové a hovězí maso, hotové pokrmy, zmrazené hotové pokrmy a polotovary, drůbež, mouka, rýže, pečivo, těstoviny, zelenina a výrobky ze zeleniny, nealkoholické nápoje, čaj a další (Vyhláška č. 298/1997).

2.6 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Mikroorganismy vyskytující se v potravě a vlastnící dekarboxylázy aminokyselin jsou začleněny do čeledi *Enterobacteriaceae* zahrnující gramnegativní rody *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* a grampozitivní rody *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Kocuria*. Dále bylo zjištěno, že i mnoho bakterií mléčného kvašení patřících do rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc* mají schopnost dekarboxylovat aminokyseliny (Suzzi, 2003).

2.6.1 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách

Podmínky vzniku biogenních aminů v potravinách jsou následující (Bover-Cid, Holzapfel, 1999):

- přítomnost aminokyselin v substrátu,
- přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou,
- nastolení vhodných podmínek pro růst, množení mikroorganismů a syntézu dekarboxyláz

Mikroorganismy a jejich enzymovou aktivitu je možno ovlivnit celou řadou faktorů jako je teplota, doba skladování, pH, obsah solí, přítomnost kyslíku, vodní aktivita nebo přítomnost kofaktorů dekarboxyláz např. pyridoxal, pyridoxin (Bover-Cid, Holzapfel, 1999).

Jedním z nejvýznamnějších faktorů, které ovlivňují aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů, je dostupnost substrátu. Význam má nejen přítomnost volných aminokyselin, ale také přítomnost využitelných cukrů v potravině. Jako optimální se uvádí koncentrace glukózy v rozmezí od 0,5 % do 2,0 %. Zatímco 3,0 % glukózy v substrátu již inhibuje syntézu enzymů (Silla Santos, 2006).

Dalším významným faktorem je teplota. Obecně platí, že množství BA se zvyšuje s dobou skladování a se zvyšující se teplotou. Tepelná úprava ovlivňuje množství vznikajících BA a PA v potravinách jen nepatrně. Obsah sperminu při vaření klesá, kdežto histamin je termostabilní a jeho koncentrace se během vaření nemění (Adams, Nout, 2001).

Optimální hodnota pH pro aktivitu většiny dekarboxylačních enzymů a produkci biogenních aminů je slabě kyselá (5,0 – 5,5). Závisí také na druhu dekarboxylačního mikroorganismu. Nižší hodnoty pH inhibují bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, zatímco bakterie mléčného kvašení jsou tolerantní proti kyselějšímu prostředí (Bover-Cid, Holzapfel, 1999).

Přítomnost solí obecně inhibuje tvorbu biogenních aminů, ale na druhé straně histamin nebo tyramin působí na některé bakterie osmoprotektivně a jeho syntéza je tedy v přítomnosti NaCl v některých případech zvýšená (Komprda, 2005).

Dalším faktorem je kyslík, ten může podporovat nebo omezovat tvorbu BA v závislosti na mikroorganizmech aerobních, anaerobních a fakultativně anaerobních.

Omezení růstu mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a tím i výskyt BA je podmíněn také přítomností konzervačních prostředků v potravinách (Adams, Nout, 2001).

Odstranění již jednou vzniklých biogenních aminů a polyaminů je velmi obtížné. K částečnému snížení obsahu aminů dochází v tepelně zpracovaných výrobcích jejich reakcí s redukujícími cukry, respektive s rozkladnými produkty cukrů v reakci Maillarda. Nejvhodnějším způsobem výroby potravin obsahujících malé množství BA je však dodržování technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku (Velíšek, 2002).

3 BIOGENNÍ AMINY VE VÍNECH A MOŽNOSTI JEJICH DETEKCE

V současné době je obsah biogenních aminů ve víně zdrojem zájmu výzkumu v mnoha zemích, pro jejich negativní účinek na lidské zdraví.

Hlavními biogenními aminy ve víně jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, metylamin, etylamin, isoamylamin a fenyletylamin (Garai, 2007).

3.1 Tvorba biogenních aminů ve víně

Tvorba biogenních aminů při technologii výroby vína je kromě nežádoucí mikrobiologické kontaminace hroznů, moštu a vína zapříčiněna alkoholovou fermentací a hlavně jablečno-mléčnou fermentací. Aminy ve víně vznikají během vinifikačních procesů. Tvorba aminů byla pozorovaná během alkoholového kvašení v metabolismu různých kmenů kvasinek (Buteau et. al., 1984; Vidal-Carou et. al., 2003). Zvýšená koncentrace biogenních aminů byla také zjištěna během jablečno-mléčné fermentace díky metabolismu mléčných bakterií (Bauza et al., 1995). Kromě toho, velká proměnlivost v koncentraci aminů existuje mezi různými druhy vín, ale zde je příliš mnoho faktorů, které by měly vliv na koncentraci biogenních aminů. Víno obecně obsahuje vyšší koncentraci aminů než některé potraviny jako čerstvá zelenina a jogurt. Ale koncentrace těchto látek ve víně je nižší než v jiných fermentovaných potravinách jako je třeba sýr (www.ekovin.cz).

Biogenní aminy mohou být přítomny již v moštu, pouze putrescin i v hroznech (což je často spojeno s deficitem draslíku). Určitý vliv na obsah má i stupeň vyzrállosti hroznů. Ve vínech ale vznikají převážně v průběhu fermentace (hlavně putrescin) a u červených vín ještě i během malolaktické fermentace a to činností mikroorganismů mléčného kvašení (především spontánní mikroflóry) (www.ekovin.cz).

Na hromadění putrescinu mají podíl některé kmeny *Oenococcus oeni*. *Oenococcus oeni* je nejčastějším bakteriálním druhem používaným jako startovací kultura k vyvolání jablečno-mléčného kvašení ve víně. Putrescin vzniká dekarboxylací volného ornitinu. Hladiny ornitinu jsou ve víně obvykle nízké. Vysoké koncentrace putrescinu vyplývají ze schopnosti *Oenococcus oeni* vyrobit ornitin degradací argininu (www.ekovin.cz).

Z celé skupiny mikroorganismů ve vinařství přítomných má ovšem největší schopnost tvorby biogenních aminů kvasinka *Brettanomyces bruxellensis*. Jejich obsah významně ovlivňuje také způsob vinifikace hroznů, hygienu rmutu i samotného vína, v menší míře

pak odrůda, poloha nebo klima. Vznikají také během zrání vína. Významným faktorem jsou také pH a obsah SO₂ (www.ekovin.cz).

Vysoká koncentrace histaminu ve víně je způsobena především přítomností histidindekarboxylázy některých bakterií mléčného kvašení (Landete, 2005). V souvislosti s kažením vína a vysokou hladinou histidinu je spojován rod *Pediococcus* (Morreno-Aribas, 2003; Landete, 2005). Bylo také zjištěno, že některé kmeny rodu *Oenococcus oeni* jsou zodpovědné za hromadění histidinu ve víně (Landete, 2005).

Ukázalo se, že zvláště vína z nahnilých hroznů vykazují vysoké koncentrace biogenních aminů. Stoupající gradací moštů, stoupá i koncentrace biogenních aminů. Pouze ledová vína vykazují nízký obsah aminů, což se dá vysvětlit technologickým postupem (koncentrace následkem mrazu). Je evidentní, že se zvyšujícím se stupněm botrytidové infekce se obsah fenyletylaminu a izopentylaminu silně zvyšuje, zatímco se naproti tomu obsah histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu prakticky nemění (Eder, et al., 2006).

Vysoké hodnoty biogenních aminů mohou indikovat bakteriální kontaminaci a následně pak rizika spojená s konzumací takového vína. Jejich vyšší obsah může být spojen se zvýšeným obsahem látek jako je kyselina máselná, mléčná, octová, etylacetát, což dokazuje zvýšenou hladinu těkavých kyselin. Červená vína mají často vyšší obsahy těchto látek a to především díky vinifikaci a způsobům zrání (www.ekovin.cz).

Na koncentraci biogenních aminů má vliv například dlouhá doba macerace a také některé technologické operace, například použití bentonitu. Ve velkém množství snižuje obsah histaminu až o polovinu, ale to nepříznivě ovlivňuje barvu červeného vína (Ancín, et al., 2008). Tento efekt závisí jednak na aplikované koncentraci a jednak koncentraci histaminu ve víně. U vyšších koncentrací histaminu a aplikovaného množství 400 g/hl bentonitu je možné snížení až o 70 %, zatímco se naproti tomu u nižších hodnot histaminu a 100 g/hl bentonitu nezjistil téměř žádný účinek. Histamin se dá také odstranit i aktivním uhlím. Vzhledem k silnému ovlivnění aroma, se doporučuje použít bentonit (Eder, et al., 2006).

Zvýšení obsahu biogenních aminů zamezíme použitím zdravých hroznů, čistým a kontrolovatelným kvašením hroznů, zamezením hodnot pH > 3,6, biologickým odbouráním čistými startovacími kulturami, potlačením nežádoucích pediokoků a laktobacilů, řádnou hygienou v provozu a ve sklepě (Eder, et al., 2006).

3.1.1 Tvorba aminů během alkoholového a jablečno-mléčného kvašení

Aminy se tvoří v různých fázích vinifikace a proto obsah aminů ve víně je mnohem vyšší než v moštu, kde je koncentrace velmi nízká. Vznik biogenních aminů byl pozorován během alkoholového kvašení, vzhledem k metabolismu různých kmenů kvasinek. Nejdůležitější pro vznik biogenních aminů je jablečno-mléčné kvašení. Dále jsou v literatuře popsány nejdůležitější aspekty o vzniku biogenních aminů v průběhu těchto dvou kvasných procesů (Radler a Fäth, 1991).

3.1.1.1 Tvorba aminů během alkoholového kvašení

Přeměna moštu na víno je výsledkem složitých procesů různých druhů kvasinek. Avšak různé kmeny kvasinek mohou ovlivnit tvorbu biogenních aminů. Buteau et al. (1984) popsal zvýšení koncentrace histaminu, tyraminu, putrescinu, agmatinu a kadaverinu během alkoholového kvašení moštů odrůdy Villard Noir. Stejně tak, Bauza et al. (1995) zjistil zvýšení obsahu histaminu, putrescinu, a fenyletylaminu během alkoholového kvašení vína z údolí Rhône, zatímco koncentrace tyraminu se navýšila až jablečno-mléčnou fermentací. Oproti tomu, Vidal-Carou et al. (2003) nezjistil tvorbu histaminu během alkoholového kvašení, i když našel tyramin ve velmi nízkých koncentracích.

3.1.1.2 Tvorba aminů během jablečno-mléčného kvašení

Jablečno-mléčné kvašení je velmi žádoucí pro alkoholovém kvašení pro téměř všechna červená vína a některá bílá vína. Při této fermentaci je odbourávána dekarboxylací hlavně kyselina L-jablečná. Stejně tak se metabolizují i jiné substráty, jako jsou aminokyseliny, ze kterých vznikají biogenní aminy. Zdá se, že pro bakterie mléčného kvašení je tvorba biogenních aminů mechanismem ochrany proti nízkému pH nebo získání metabolické energie pomocí reakce aminokyselin dekarboxylací (Lonvaud-Funel, 2001). Kromě toho tvorba polyaminů, jako je putrescin, může být ovlivněna dalšími fyziologickými funkcemi u bakterií, jako je osmotický stres či oxidační stres a další odezvy bakteriálních buněk jako je cross-talk. Mnoho autorů se domnívá, že mléčné bakterie mají vliv na velkou kumulaci biogenních aminů ve víně (Bauza et al, 1995).

3.2 Možnosti detekce biogenních aminů ve víně.

Pro stanovení biogenních aminů v potravinách byla vyvinuta celá řada metod (Smělá a kol., 2007).

Vzhledem k různé struktuře těchto látek a charakteru vzorku není jednoduché vybrat vhodnou metodu (La Torre et. al., 2010). Ke stanovení biogenních aminů se nejčastěji používají chromatografické metody. Jako je kapalinová chromatografie (HPLC), iontově – výměnná chromatografie (IEC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a plynová chromatografie (GC) (Karovičová, Kohajdová, 2005).

K dalším metodám patří elektromigrační metody (kapilární elektroforéza (CE), enzymatické (ELISA) a imuno-enzymatické metody (Moreno-Arribas, Polo, 2009).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo sledovat faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií izolovaných z různých druhů vín. Jednalo se zejména o bakterie vyskytující se v procesu výroby vína a bakterie cíleně používané při biologickém odbourávání kyselin.

Dílními cíli bylo:

1. Skríníng vybraných sbírkových kultur bakterií z různých druhů vín (kontaminantů nebo využívaných při biologickém odbourávání organických kyselin ve vínech) na produkci biogenních aminů.
2. Selekcce kmenů pozitivních na produkci biogenních aminů, zvlášt' těch, které jsou schopné za optimálních podmínek vyprodukovat významnější detekovatelná množství biogenních aminů.
3. S těmito kmeny založit experimenty, v rámci kterých by byly sledovány vlivy vnějších faktorů na množství produkovaných biogenních aminů. Sledovány byly faktory, které dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mohou výrazně ovlivnit (pH, teplota, cukr).
4. Sledování kinetiky tvorby biogenních aminů na základě změny vnějších faktorů.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Použité mikroorganismy

Bakteriální kmeny (cca 145 kmenů) izolovaných z vín v letech 2005 – 2006 byly poskytnuty RNDr. Ludmilou Tvrzovou, Ph.D. z Oddělení mikrobiologie Ústavu experimentální biologie Masarykovy univerzity v Brně.

5.2 Kultivace mikroorganismů

Bakterie byly kultivovány v příslušných půdách podle jejich rozdělení a charakteristických vlastností. Skupiny mikroorganismů, které byly sledovány, jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Skupiny sledovaných mikroorganismů.

Skupina mikroorganismů	Živná půda
celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních bakterií	Plate Count Agar (PCA, HiMedia, Bombai, Indie)
bakterie octového kvašení	Acetobacter Agar (ACA), případně na těžce půdě obohacené o glukózu (AGA; HiMedia, Bombai, Indie)
bakterie mléčného kvašení (zejména bakterií rodu <i>Lactobacillus</i>) a příbuzných	deMan-Rogosa-Sharpe Agar (MRS, HiMedia, Bombai, Indie)

Kultivace probíhala s ohledem na acidofilní povahu a na komplex jejich růstových požadavků při optimální teplotě 30 ± 1 °C po dobu 48 – 72 hodin.

Všechny používané bakteriální kmeny byly uchovávány ve zkumavkách na šikmých agarrech na příslušné kultivační půdě při teplotě 4 ± 2 °C. Kmeny byly přeočkovávány po 3 – 4 týdnech. Při častějším používání byly kultury uchovávány na Petriho miskách na stejné živné půdě při téže teplotě. Dlouhodobě jsou všechny kmeny bakterií uloženy v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C v příslušném kultivačním médiu s 10 % (v/v) glycerolu.

5.3 Detekce dekarboxylázové aktivity mikroorganismů

V další fázi byla provedena detekce dekarboxylázové aktivity izolovaných kmenů pomocí účinné kapalinové chromatografie.

Analýza probíhala v bujónu obohaceném o příslušné aminokyseliny (arginin, histidin, lyzin, ornitin, fenylalanin, tyrozin a tryptofan) v koncentraci 0,2 % (w/v) (každá aminokyselina) po kultivaci bakterií. Bujón o objemu 7 ml (vysoký sloupec hladiny ideální pro nárůst anaerobních nebo mikroaerofilních bakterií mléčného kvašení) byl zaočkován 50 µl suspenze bakterií narostených přes noc. Každá kultura byla očkována pětkrát. Kultivace probíhala za optimálních teplot po dobu 48 hodin.

5.4 Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC)

Bujón po kultivaci testovaných bakterií byl centrifugován a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (w/v) kyselinou chloristou ($c = 1,2 \text{ mol/l}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Okyselená směs byla podrobena derivatizaci podle Dadáková et al. (2009). Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Derivatizované vzorky byly filtrovány filtrem s velikostí pórů $0,22 \text{ µm}$ a nanášeny na kolonu (kolona Cogent HPLC column HPS C18-5 µm 120A, Cogent USA; termostat s kolonou Agilent technologies 1260 Infinity G1316A 1260 TCC, Agilent USA; detektor Agilent Technologies 1200 G1315A 1260 DAD VL+, Agilent USA; pumpa a sampler LabAlliance, USA). Podmínky separace a detekce sledovaných biogenních aminů byly voleny podle publikace Smělá et al. (2004). Každý z pěti bujónů (pro jeden testovaný mikroorganismus) byl derivatizován dvakrát a každá derivatizovaná směs nanášena na kolonu ve dvojnásobném opakování ($n = 20$).

Vyselektované kmeny byly podrobeny analýze na produkci 8 biogenních aminů - tyraminu, tryptaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, fenyletylaminu, sperminu a spermidinu, ultraúčinnou chromatografií (UPLC) s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

V dalším experimentu byla sledována kinetika produkce biogenních aminů u vybraného kmene pozitivního na produkci některého z biogenních aminů. V závislosti na sledovaných vnějších faktorech byly MRS bujóny s přídavkem 0,2 % (w/v) příslušných aminokyselin (každá aminokyselina v koncentraci 0,2 %), obohaceny o látky upravující faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu. Vnější faktory byly voleny tak, aby byl zjištěn jejich vliv na produkci biogenních aminů během technologického procesu výroby vína, s ohledem na možnosti růstu mikroorganismů za daných podmínek:

- pH 4; 5 a 6

- teplota 10 °C, 20 °C, 30 °C
- cukr (glukóza, fruktóza v poměru 1:1) 0,5; 1; 2; 4; 7; 10 % (w/v).

Odběry byly provedeny v časových intervalech:

- 10 °C – 0 den; 3 den; 7 den; 10 den; 12 den; 14 den
- 20 °C – 0 den; 1 den; 2 den; 3 den; 5 den; 7 den
- 30 °C – 0 hodin; 3 hodiny; 6 hodin; 9 hodin; 12 hodin; 24 hodin; 48 hodin.

Sledované faktory byly použity ve vzájemných kombinacích. Jako kontrolní vzorky sloužily zkumavky s příslušnými MRS bujóny bez zaočkovaných mikroorganismů.

Kromě produkce biogenních aminů byl u všech odebraných vzorků sledován také nárůst buněk a pH bujónu po kultivaci.

5.5 Stanovení nárůstu buněk

Nárůst buněk byl sledován v příslušných časových intervalech kultivačně plotnovou metodou. Odběr vzorků probíhal souběžně s odběrem vzorků pro analýzu obsahu biogenních aminů. Daný kmen byl ředěn desítkovým ředěním, vyset na misky a kultivován na půdě MRS při 30 °C po dobu 48±2 hodiny. Výsledky byly přepočteny a vyjádřeny jako CFU/ml.

5.6 Měření pH kultivačního média

V důsledku produkce kyseliny mléčné nebo produkce biogenních aminů byly sledovány změny pH kultivačního média. Měření pH kultivačního média probíhalo, stejně jako stanovení nárůstu buněk, v příslušných časových intervalech. Všechny vzorky byly měřeny nejméně ve trojím opakování (pH metr HANNA INSTRUMENTS, digitální elektroda s integrovaným teplotním čidlem, HI 10530, Romania).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V první části experimentu byl proveden skríníng 145 kmenů vyizolovaných z vína. Tyto kmeny byly kultivovány na živných půdách uvedených v tabulce 2. Výsledky stanovení jsou shrnuty v tabulkách 3, 4 a 5. Devadesát kmenů bylo kultivováno na živné půdě PCA, 50 kmenů na ACA a 5 kmenů na MRS. Bylo sledováno 8 biogenních aminů (tryptamin, histamin, putrescin, fenyletylamin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin).

6.1 Skríníng produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z moravských vín

U 90 kmenů kultivovaných na živné půdě PCA nebyly detekovány tryptamin, putrescin a histamin u žádného kmene, fenyletylamin byl stanoven u tří kmenů a to u kmenů 11, 23, 38 a toto množství nepřesáhlo 32 mg/l. Kadaverin byl detekován u 19 kmenů v množství do 3 mg/l. Tyramin produkovaly všechny kmeny mimo kmen 74, množství nepřesáhlo hranici 25 mg/l. Spermidin byl produkován všemi kmeny, protože spermidin je zařazen do skupiny polyaminů, které se podílí na stavbě buněk (Patočka, 2000; Murray, 2002). Spermin byl stanoven u 7 kmenů do 15 mg/l.

Tabulka 3: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě PCA.

Vzorky	Biogenní aminy								Suma
	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
1	-	-	-	-	-	10,1	2,2	4,8	17,0
2	-	-	-	-	-	9,5	1,7	6,9	18,1
3	-	-	-	-	-	6,4	1,6	5,4	13,4
4	-	-	-	-	-	6,9	2,1	6,8	15,8
5	-	-	-	-	-	4,6	1,8	5,2	11,6
6	-	-	-	-	-	7,1	2,4	-	9,5
7	-	-	-	2,0	-	7,3	2,4	-	11,8
8	-	-	-	1,6	-	6,4	2,1	-	10,1
9	-	-	-	1,8	-	5,7	2,1	-	9,7
10	-	-	-	1,4	-	6,4	2,2	-	10,0
11	-	3,5	-	1,9	-	5,2	2,2	-	12,8
12	-	-	-	-	-	6,9	2,3	-	9,2
13	-	-	-	1,7	-	5,5	1,8	-	9,1
14	-	-	-	2,1	-	3,9	2,2	-	8,2
15	-	-	-	2,1	-	4,1	2,4	-	8,6
16	-	-	-	2,1	-	4,5	2,0	-	8,5
17	-	-	-	-	-	4,3	1,9	-	6,3
18	-	-	-	2,2	-	4,4	2,5	-	9,0

Tabulka 3 - pokračování: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě PCA.

Vzorky	Biogenní aminy								Suma
	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
19	-	-	-	-	-	4,2	1,8	-	6,0
20	-	-	-	1,8	-	5,0	1,8	-	8,6
21	-	-	-	2,1	-	5,8	2,0	-	9,9
22	-	-	-	2,4	-	4,3	2,4	-	9,1
23	-	31,7	-	2,5	-	4,3	2,7	-	41,2
24	-	-	-	2,3	-	3,9	2,0	-	8,2
25	-	-	-	2,5	-	2,8	1,8	-	7,2
26	-	-	-	2,5	-	2,7	2,1	-	7,2
27	-	-	-	-	-	17,3	3,1	-	20,4
28	-	-	-	-	-	17,0	2,6	-	19,5
29	-	-	-	-	-	19,9	2,2	11,1	33,3
30	-	-	-	-	-	14,9	2,0	9,9	26,8
31	-	-	-	-	-	13,4	2,0	-	15,4
32	-	-	-	-	-	20,0	2,7	-	22,6
33	-	-	-	-	-	23,9	2,3	-	26,1
34	-	-	-	-	-	16,7	1,7	-	18,4
35	-	-	-	-	-	16,8	2,6	-	19,4
36	-	-	-	-	-	23,7	2,7	-	26,4
37	-	-	-	1,7	-	19,0	2,1	-	22,8
38	-	1,5	-	-	-	21,0	2,8	-	25,3
39	-	-	-	-	-	15,9	3,2	-	19,1
40	-	-	-	1,7	-	15,7	3,0	-	20,4
41	-	-	-	-	-	14,7	3,6	-	18,3
42	-	-	-	-	-	14,9	3,4	-	18,2
43	-	-	-	-	-	18,5	3,4	-	21,9
44	-	-	-	-	-	17,0	2,8	-	19,8
45	-	-	-	-	-	16,4	2,6	-	19,0
46	-	-	-	-	-	15,9	3,2	-	19,1
47	-	-	-	-	-	13,9	3,4	-	17,3
48	-	-	-	-	-	11,2	2,9	-	14,1
49	-	-	-	-	-	19,4	2,3	-	21,7
50	-	-	-	-	-	12,7	2,3	-	14,9
51	-	-	-	-	-	12,7	2,5	-	15,2
52	-	-	-	-	-	10,8	3,3	-	14,2
53	-	-	-	-	-	13,8	3,6	-	17,4
54	-	-	-	-	-	15,4	3,0	-	18,4
55	-	-	-	-	-	12,2	3,2	-	15,4
56	-	-	-	-	-	15,6	3,3	-	18,9
57	-	-	-	-	-	10,4	3,6	-	14,0
58	-	-	-	-	-	12,8	3,6	-	16,4
59	-	-	-	-	-	11,1	2,9	-	14,1
60	-	-	-	-	-	15,0	3,5	-	18,5
61	-	-	-	-	-	12,8	2,6	-	15,4

Tabulka 3 - pokračování: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě PCA.

Vzorky	Biogenní aminy								Suma
	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
62	-	-	-	-	-	11,4	3,2	-	14,6
63	-	-	-	-	-	12,4	3,7	-	16,1
64	-	-	-	-	-	10,5	3,5	-	14,0
65	-	-	-	-	-	9,5	3,5	-	13,0
66	-	-	-	-	-	11,5	2,7	-	14,2
67	-	-	-	-	-	4,8	1,7	-	6,6
68	-	-	-	-	-	8,6	2,3	-	10,9
69	-	-	-	-	-	5,6	2,2	-	7,8
70	-	-	-	-	-	5,9	2,0	-	7,9
71	-	-	-	-	-	5,4	1,9	-	7,3
72	-	-	-	-	-	5,6	2,2	-	7,8
73	-	-	-	-	-	5,1	1,9	-	7,0
74	-	-	-	-	-	-	2,8	-	2,8
75	-	-	-	-	-	6,3	3,5	-	9,8
76	-	-	-	-	-	9,8	4,4	-	14,2
77	-	-	-	-	-	8,2	2,6	-	10,8
78	-	-	-	-	-	8,0	2,1	-	10,0
79	-	-	-	-	-	6,8	2,4	-	9,1
80	-	-	-	-	-	5,5	2,3	-	7,8
81	-	-	-	-	-	8,3	2,1	-	10,4
82	-	-	-	-	-	7,9	2,1	-	10,0
83	-	-	-	-	-	5,5	2,0	-	7,6
84	-	-	-	-	-	5,6	2,6	-	8,2
85	-	-	-	-	-	6,1	1,9	-	8,0
86	-	-	-	-	-	4,9	2,2	-	7,2
87	-	-	-	-	-	5,7	2,1	-	7,8
88	-	-	-	-	-	6,8	2,3	-	9,1
89	-	-	-	-	-	6,8	1,6	-	8,4
90	-	-	-	-	-	4,5	2,1	-	6,6

- biogenní amin nebyl detekován

U 50 kmenů kultivovaných na živné půdě ACA nebyl tryptamin, putrescin, histamin, fenyletylamin, kadaverin a spermin detekován u žádného kmene. Tyramin produkovaly všechny kmeny a množství nepřesáhlo množství 20 mg/l (Tabulka 4). Spermidin byl produkován všemi kmeny, kromě kmenů 3, 4, 5 a 8 a stanovené množství nepřesáhlo hranici 2 mg/l.

Tabulka 4: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě ACA.

Vzorky	Biogenní aminy								Suma
	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
1	-	-	-	-	-	5,4	2,7	-	8,1
2	-	-	-	-	-	7,8	2,8	-	10,6
3	-	-	-	-	-	7,4	-	-	7,4
4	-	-	-	-	-	4,3	-	-	4,3
5	-	-	-	-	-	5,4	-	-	5,4
6	-	-	-	-	-	6,2	1,3	-	7,4
7	-	-	-	-	-	6,5	1,3	-	7,8
8	-	-	-	-	-	5,5	-	-	5,5
9	-	-	-	-	-	6,7	1,5	-	8,3
10	-	-	-	-	-	5,4	1,3	-	6,7
11	-	-	-	-	-	4,9	1,5	-	6,5
12	-	-	-	-	-	5,6	1,5	-	7,1
13	-	-	-	-	-	3,9	1,3	-	5,2
14	-	-	-	-	-	2,8	1,0	-	3,8
15	-	-	-	-	-	6,2	1,2	-	7,4
16	-	-	-	-	-	6,7	1,6	-	8,3
17	-	-	-	-	-	6,9	1,1	-	8,0
18	-	-	-	-	-	7,6	1,5	-	9,1
19	-	-	-	-	-	7,6	1,7	-	9,3
20	-	-	-	-	-	7,1	1,7	-	8,8
21	-	-	-	-	-	6,9	1,6	-	8,4
22	-	-	-	-	-	6,9	2,0	-	8,8
23	-	-	-	-	-	11,2	1,5	-	12,7
24	-	-	-	-	-	6,4	1,5	-	7,9
25	-	-	-	-	-	5,4	1,7	-	7,1
26	-	-	-	-	-	5,9	1,0	-	6,9
27	-	-	-	-	-	6,3	1,6	-	7,9
28	-	-	-	-	-	11,3	1,1	-	12,4
29	-	-	-	-	-	9,1	1,5	-	10,6
30	-	-	-	-	-	7,3	0,7	-	8,0
31	-	-	-	-	-	7,6	1,6	-	9,2
32	-	-	-	-	-	7,5	1,7	-	9,2
33	-	-	-	-	-	8,7	1,3	-	10,0
34	-	-	-	-	-	11,6	1,1	-	12,6
35	-	-	-	-	-	8,2	1,7	-	9,9
36	-	-	-	-	-	8,1	1,3	-	9,3
37	-	-	-	-	-	7,5	1,0	-	8,5
38	-	-	-	-	-	7,9	1,0	-	8,9
39	-	-	-	-	-	7,0	1,0	-	8,0
40	-	-	-	-	-	9,0	1,4	-	10,3
41	-	-	-	-	-	16,7	0,8	-	17,5
42	-	-	-	-	-	14,3	1,3	-	15,6
43	-	-	-	-	-	14,9	1,2	-	16,1
44	-	-	-	-	-	15,8	0,8	-	16,6

Tabulka 4 - pokračování: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě ACA.

Vzorky	Biogenní aminy								Suma
	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
45	-	-	-	-	-	14,3	1,5	-	15,7
46	-	-	-	-	-	13,7	1,2	-	14,9
47	-	-	-	-	-	16,8	1,0	-	17,8
48	-	-	-	-	-	18,1	0,7	-	18,8
49	-	-	-	-	-	15,4	1,0	-	16,4
50	-	-	-	-	-	19,3	0,8	-	20,1

- biogenní amin nebyl detekován

Na živné půdě MRS bylo kultivováno 5 kmenů. Čtyři kmeny produkovaly tyramin do 21 mg/l a spermidin do 1 mg/l. Kmen s kódem 2 vykazoval významnou produkci tyraminu, kde množství přesáhlo 1950 mg/l, dále to byla produkce fenyletylaminu 36 mg/l a spermidinu do 1 mg/l (Tabulka 5).

Tabulka 5: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě MRS.

Vzorky	Biogenní aminy								Suma
	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
1	-	-	-	-	-	16,0	0,5	-	16,5
2	-	36,7	-	-	-	1955,3	1,0	-	1993,0
5	-	-	-	-	-	20,5	0,4	-	20,9
6	-	-	-	-	-	19,0	0,6	-	19,6
8	-	-	-	-	-	16,0	0,6	-	16,6

- biogenní amin nebyl detekován

Celkové množství vyprodukovaných biogenních aminů se pohybovalo v rozmezí 3,8 – 42 mg/l. U jednoho sledovaného kmene, který byl silně produkční, bylo celkové množství biogenních aminů 1993 mg/l. Zvýšená množství biogenních aminů byla stanovena celou řadou autorů, protože víno patří mezi potraviny, ve kterých se mohou vyskytovat mikroorganismy, které mají pozitivní dekarboxylázovou aktivitu. Dále během výroby vína dochází k nárůstu volných aminokyselin, jako prekurzorů biogenních aminů (Moreno-Arribas, Polo, 2009).

6.2 Monitoring změn množství biogenních aminů vyprodukovaného kmenem v závislosti na sledovaných faktorech

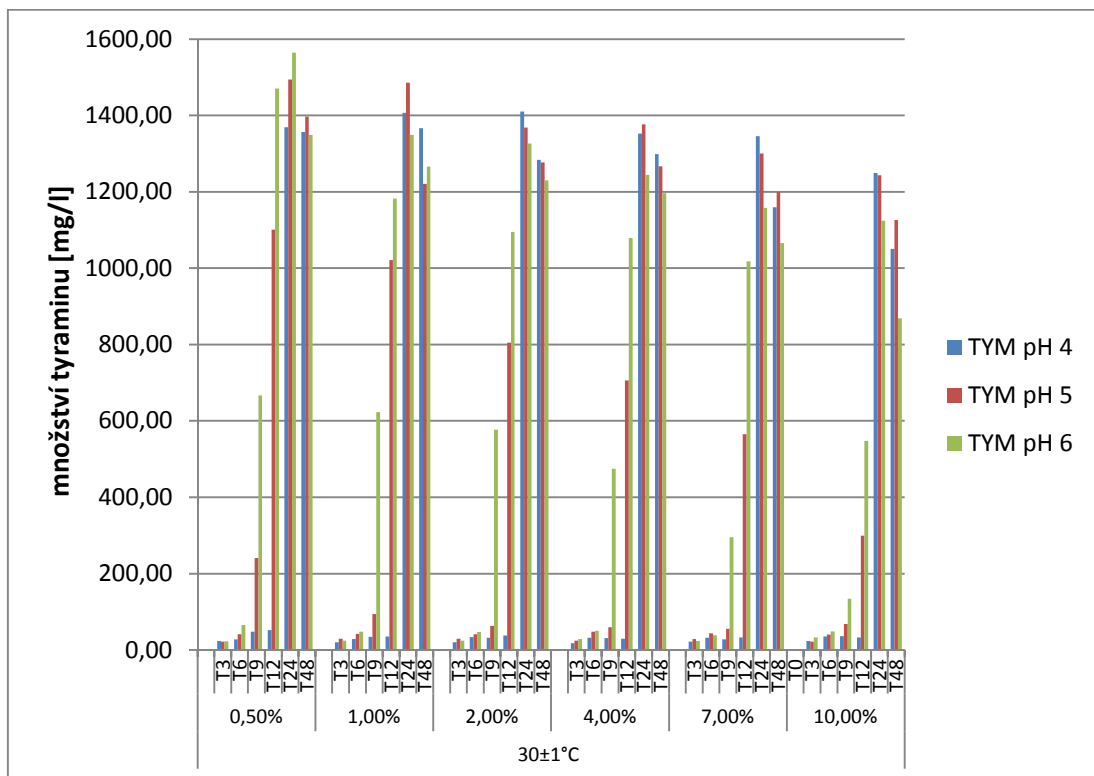
K této části experimentu byl vybrán kmen číslo 2 (grampozitivní krátké tyčinky) z předešlé série testování. Tento kmen byl kultivován na živné půdě deMan-Rogosa-Sharpe Agar (MRS). Byl sledován vliv vybraných faktorů, u kterých je předpoklad, že jsou schopny ovlivňovat produkci biogenních aminů a polyaminů během technologického procesu výroby vína. Vybrané faktory byly následující: kultivační teplota (10 ± 1 °C; 20 ± 1 °C a 30 ± 1 °C), pH (4; 5 a 6). Při teplotě $t = 10 \pm 1$ °C bylo použito pH 5, 6, protože při nižším pH daný kmen nevykazoval růst kolonií. Dalším faktorem byl přídavek cukru v poměru glukózy a fruktóza 1:1, cukry byly přidávány v rozmezí koncentrací 0-10 % (w/v). Tyto faktory byly zvoleny tak, aby co nejvíce vystihly podmínky při zpracování a skladování vína. Ke sledovaným biogenním aminům a polyaminům patřil tyramin (TYM), fenyletylamin (PEA), spermin (SPM) a spermidin (SPD).

Produkce tyraminu při teplotě 30 °C.

V médiích obohacených o jednotlivé koncentrace cukrů se produkce tyraminu v čase zvyšovala. Během 24 hodin kultivace dosáhla produkce maximálních hodnot a po 48 hodinách došlo k nepatrnému snížení množství detekovaného tyraminu při všech testovaných pH.

Nejvýznamnější produkce byla sledována při přídavku 0,5 % (w/v) cukrů. Během prvních 6 hodin kultivace byl tyramin detekován v nízkých hodnotách, které nepřesáhly hranici 70 mg/l. Tento trend byl zaznamenán u všech sledovaných pH. Po 9 hodinách kultivace při pH 5 a 6 se množství tyraminu znásobilo a dosáhlo hodnot cca 500 mg/l u pH 5 a 700 mg/l u pH 6. U pH 4 bylo sledováno pozvolné zvyšování produkce tyraminu až na hodnoty ≈ 50 mg/l. Větší množství bylo detekováno po 12 hodinách kultivace při pH 5 a 6 a množství se blížilo k hranici $\text{TYM} < 1000$ mg/l. Produkce tyraminu při pH 4 byla nízká, detekovaná koncentrace se pohybovala do 55 mg/l. Maximální množství tyraminu bylo stanoveno po 24 hodinách kultivace při pH 6 v přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru a to v množství $\text{TYM} > 1300$ mg/l (obrázek 10). Produkce tyraminu se při zvyšující se koncentraci přídavku cukru snižovala. Tento trend byl zaznamenán i v závislosti na sledovaných pH. Pokles produkce byl pozvolný a nejvíce byl zaznamenán při pH 6, kde hodnoty tyraminu klesly na hodnoty z 1600 mg/l na 800 mg/l.

U pH kultivačních médií nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1. Grafické znázornění výsledků produkce tyraminu při $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ je zobrazeno na obrázku 10.



Obrázek 10: Produkce tyraminu při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Produkce tyraminu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Množství tyraminu, které bylo stanoveno v bujónu po kultivaci bakterií při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, bylo vyšší než u teploty $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro pH 5 a 6 dosáhlo množství vyprodukovaného tyraminu $> 500\text{ mg/l}$ již v první den odběru, zatímco při pH 4 byla zaznamenána nízká produkce tyraminu a množství nepřesáhlo 40 mg/l (obrázek 11).

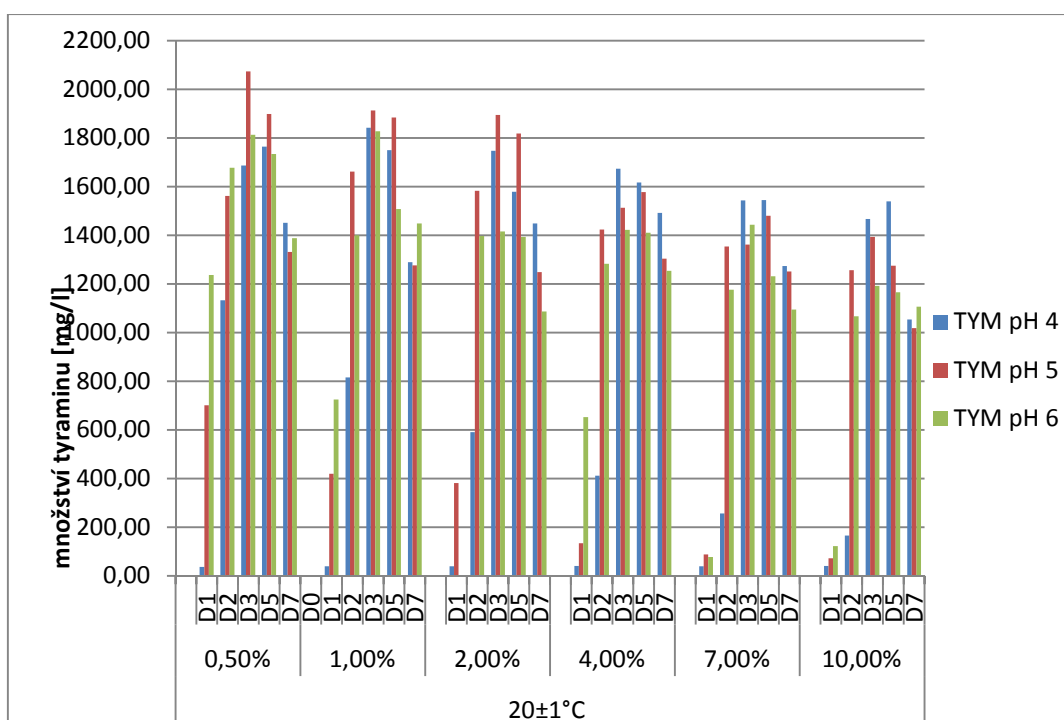
V jednotlivých koncentracích cukru se produkce tyraminu v čase zvyšovala. Během tří dnů kultivace dosáhla produkce maximálních hodnot a při kultivaci 7 dní došlo k nepatrnému snížení množství detekovaného tyraminu při všech testovaných pH.

Nejvýznamnější produkce byla zaznamenána při přidavku $0,5\%$ (w/v) cukru (glukóza a fruktóza v poměru 1:1). Během prvního dne kultivace byl tyramin detekován v nízkých hodnotách, které nepřesáhly hranici $< 50\text{ mg/l}$. Tento trend byl zaznamenán u pH 4. Pro pH 5 a 6 byla atakována hranice TYM $> 500\text{ mg/l}$ již v první den odběru. U pH 4 bylo sledováno rychlé navýšení produkce tyraminu z 50 mg/l na hodnoty 1000 mg/l během

jednoho dne kultivace. Produkce tyraminu při pH 5 a 6 se pohybovala v hodnotách 1000 mg/l hned v prvním dnu odběru. Maximální množství tyraminu bylo stanoveno po třech dnech

při pH 5 v přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru a to v množství vyšším než 2000 mg/l. Produkce tyraminu se se zvyšující se koncentrací přidaného cukru snižovala. Tento trend byl zaznamenán i v závislosti na sledovaných pH. Pokles produkce byl pozvolný a hodnoty tyraminu klesly na hodnoty 1000 mg/l.

U hodnot pH kultivačních médií nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1. Grafické znázornění výsledků produkce tyraminu při $t=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je zobrazeno na obrázku 11.



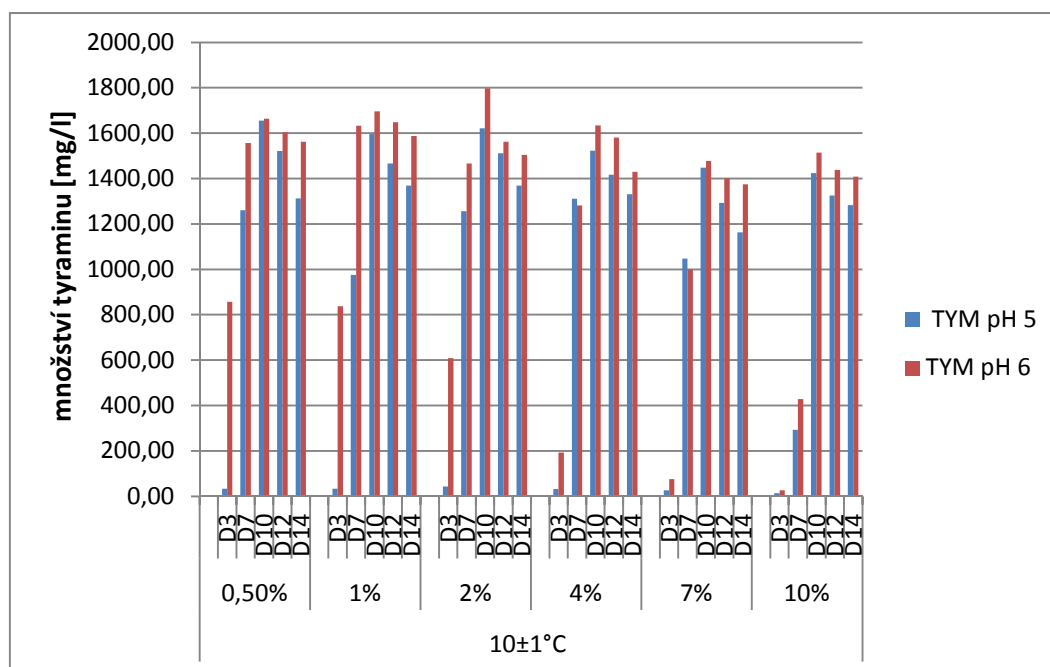
Obrázek 11: Produkce tyraminu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Produkce tyraminu při teplotě $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Množství tyraminu, které bylo stanoveno v MRS bujónu po kultivaci testovaného kmene při teplotě $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se pohybovalo ve stejném intervalu jako u teploty $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro testování faktorů při této teplotě bylo vybráno pouze pH 5 a 6, při nižším pH nebyl zaznamenán růst kolonií testovaného mikroorganismu. Produkce tyraminu byla významnější u pH 6. Zde byly zaznamenány vyšší hodnoty již během prvního dne kultivace, a to v množství $< 850\text{ mg/l}$. Při pH 5 byly po prvním dnu stanovení zjištěny nízké koncentrace tyraminu v množství $< 35\text{ mg/l}$. V jednotlivých koncentracích cukru se produkce tyraminu

v čase zvyšovala do desátého dne odběru, kde nabyla svého maxima a pak došlo ke snížení, které nastalo u obou testovaných pH (obrázek 12).

Nejvýznamnější produkce byla sledována při přidávku 2 % (w/v) cukrů glukózy a fruktózy v bujónu o pH 6. Během prvního dne kultivace byl tyramin detekován v hodnotách, které se blížily k hranici TYM < 1000 mg/l. V desátém dnu odběru nabyl hodnot 1800 mg/l a pak došlo ke snížení. U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 5,0 – 6,1. Grafické znázornění výsledků produkce tyraminu při $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ je zobrazeno na obrázku 12.



Obrázek 12: Produkce tyraminu při teplotě $10\text{ }^{\circ}\text{C}$

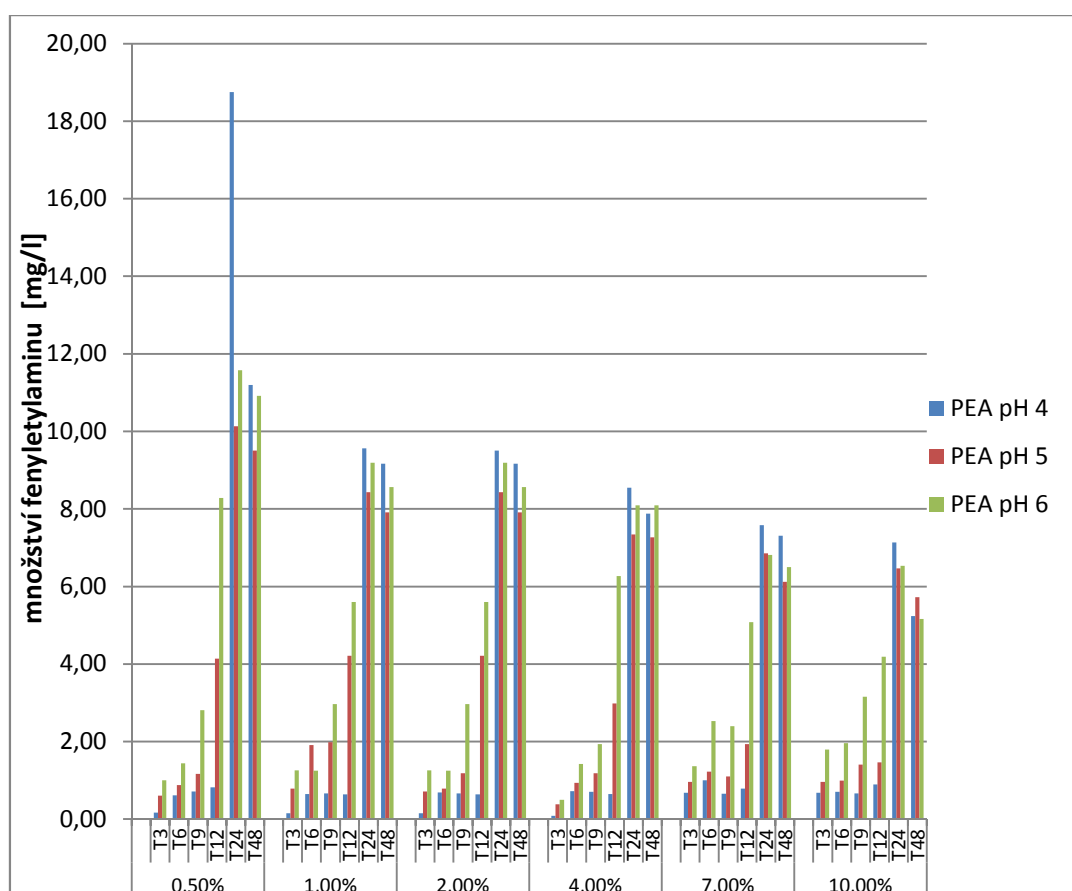
Produkce fenyletylaminu při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V MRS bujónu obsahujícím jednotlivé koncentrace cukru se produkce fenyletylaminu v čase zvyšovala. Během 24 hodin kultivace dosáhla produkce maximálních hodnot a po 48 hodinách došlo ke snížení množství detekovaného fenyletylaminu při všech testovaných pH a koncentracích sacharidů (obrázek 13).

Nejvýznamnější produkce byla sledována při přidávku 0,5% (w/v) cukrů. Během prvních 3 hodin kultivace byl fenyletylamin detekován v nízkých hodnotách, které nepřesáhly hranici 2 mg/l. Tento trend byl zaznamenán u všech sledovaných pH. V 9. hodině odběru při pH 6 se množství fenyletylaminu znásobilo a dosáhlo hodnot

> 3 mg/l. Po 12 hodinách kultivace v bujónu upraveném na pH 5 bylo nejvyšší detekované množství fenyletylaminu 6 mg/l, při pH 6 to bylo cca 9 mg/l. Produkce fenyletylaminu při pH 4 byla nízká. Pohybovala se kolem 1 mg/l. Maximální množství fenyletylaminu bylo stanoveno po 24 hodinách kultivace při pH 4 v přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru a to v množství > 18 mg/l. Produkce fenyletylaminu se při zvyšující se koncentraci přídavku cukru snižovala. Pokles produkce byl pozvolný a po 48 hodinách kultivace v bujónu s 10 % (w/v) cukru se pohybovaly kolem 6 mg/l u všech testovaných pH (obrázek 13).

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1.



Obrázek 13: Produkce fenyletylaminu při teplotě 30 °C

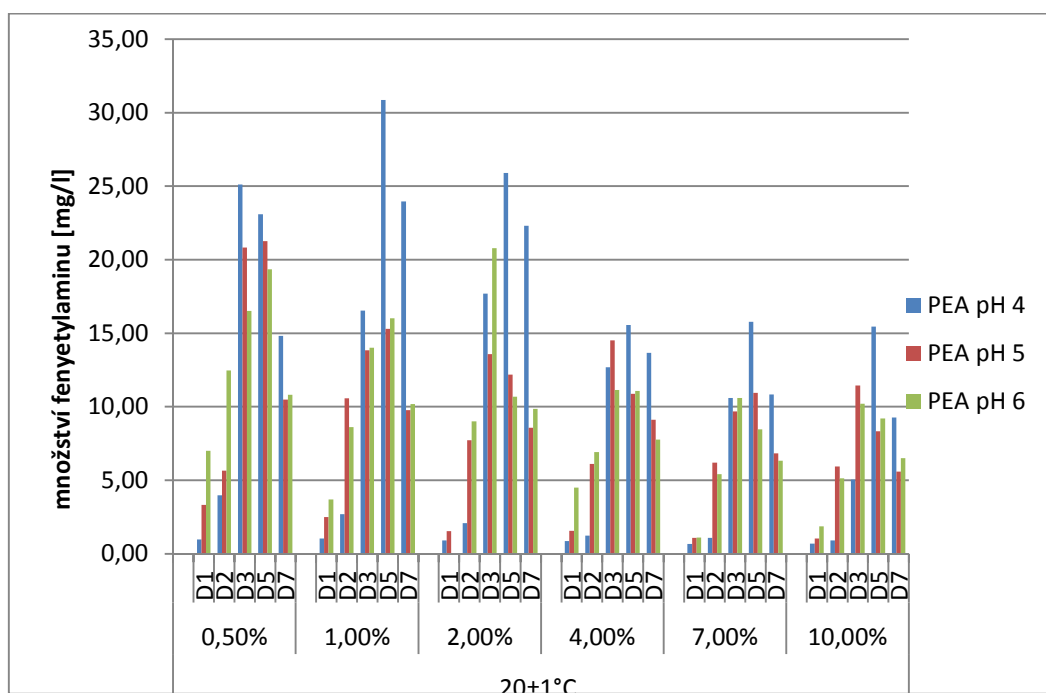
Produkce fenyletylaminu při teplotě 20 °C.

Po prvním dni byla produkce fenyletylaminu v modifikovaných MRS bujónech u všech testovaných koncentrací sacharidů a pH velmi nízká, cca do 7 mg/l. Nejvyšší produkce byla detekována při pH 4 u všech koncentrací cukru po 5 dnech inkubace, jen u koncentrace 0,5 % (w/v) cukru byla nejvyšší produkce po 3 dnech (obrázek 14).

Pokud budeme sledovat vliv pH, tak byl fenyletylamin produkován v bujónu o pH 5 v největším množství po třech dnech kultivace v bujónech s koncentrací 2 %, 4 % a 10 % (w/v) cukru a po 5 dnech u zbývajících koncentrací. Při pH 6 bylo vyprodukováno nejvíce fenyletylaminu po 3 dnech kultivace v prostředí s koncentrací 2 %, 4 %, 7 %, 10 % (w/v) cukru a u koncentrace 0,5 % a 1 % (w/v) cukru po 5 dnech inkubace. Nejvýznamnější produkce byla sledována při přidavku 1 % (w/v) cukrů, pH 4 po 5 dnech kultivace, kdy koncentrace tohoto vyprodukovaného biogenního aminu přesáhla 30 mg/l.

Sedmý den produkce pozvolna klesla a to v bujónu o pH 4 $PEA < 7$ mg/l, u pH 5 a 6 $PEA < 11$ mg/l.

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1. Grafické znázornění výsledků produkce fenyletylaminu při $t=20$ °C je zobrazeno na obrázku 14.



Obrázek 14: Produkce fenyletylaminu při teplotě 20 °C

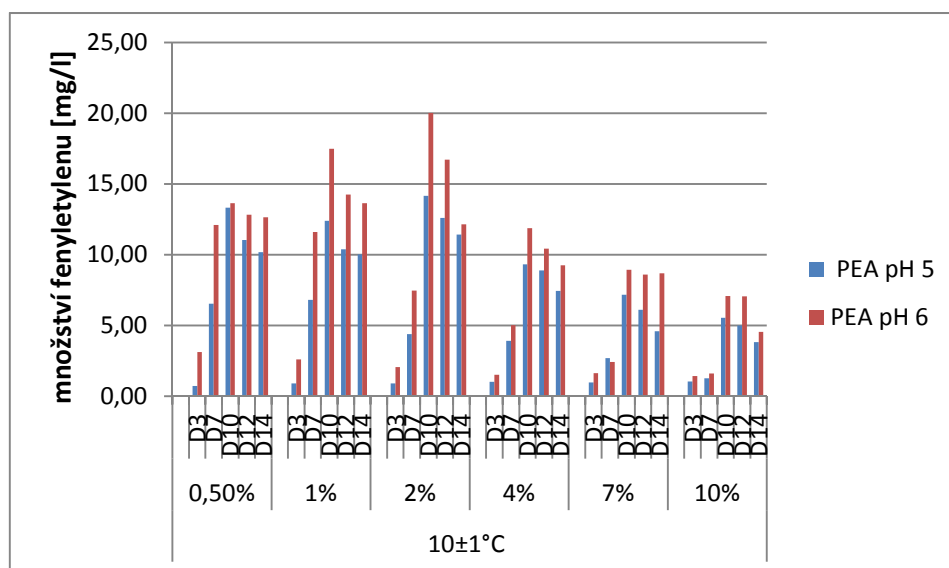
Produkce fenyletylaminu při teplotě 10 °C.

Produkce fenyletylaminu během kultivace při teplotě 10 °C vykazovala vyšší hodnoty v bujónech o pH 6, kde po 3 dnech byla produkce velmi nízká, pouze okolo 4 mg/l. Po 7 dnech kultivace u koncentrace 0,5 % a 1 % (w/v) cukru prudce stoupla trojnásobně až na hodnoty $PEA > 12$ mg/l, u ostatních koncentrací se zvedla produkce fenyletylaminu jen

nepatrně. Nejvyšší produkce byla zjištěna po 10 dnech inkubace a to hlavně u koncentrací 1 % a 2 % (w/v) cukru až na hodnoty kolem 20 mg/l.

V modifikovaném MRS bujónu o pH 5 byla nejvyšší produkce fenyletylaminu v prostředí obsahujícím 2 % (w/v) cukru po 10 dnech kultivace a to cca 14 mg/l. Analyzovaný kmen při pH 4 nevykazoval růst a proto nebyla sledována produkce fenyletylaminu. Grafické znázornění výsledků produkce fenyletylaminu při $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ je zobrazeno na obrázku 15.

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 5,0 – 6,1.



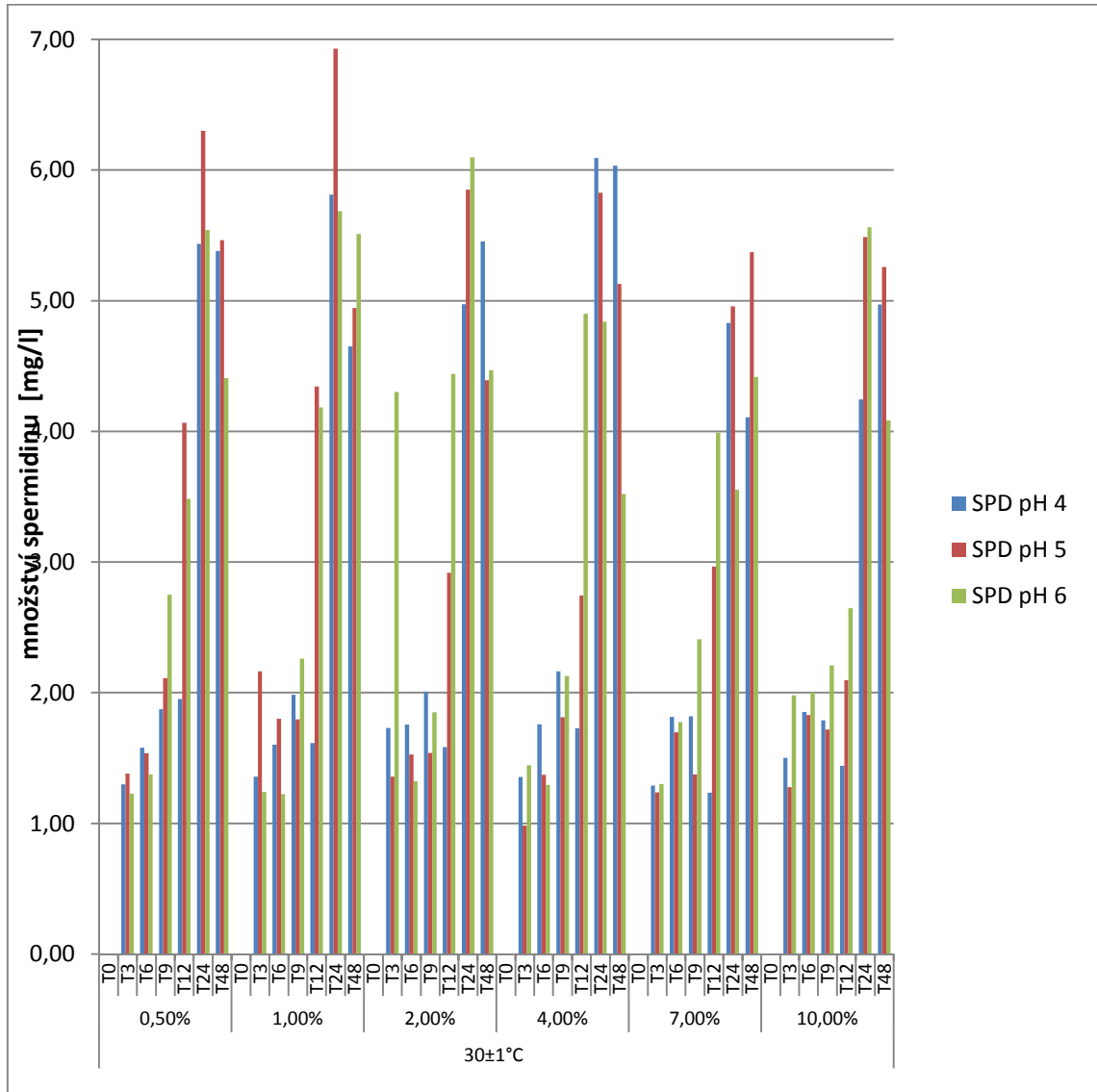
Obrázek 15: Produkce fenyletylaminu při teplotě $10\text{ }^{\circ}\text{C}$

Produkce spermidinu při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Produkce spermidinu během kultivace testovaného kmene při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ vykazovala celkově při všech testovaných koncentracích cukru a všech odběrech velmi nízké hodnoty do 7 mg/l (obrázek 16).

V bujónu o pH 4 byly nejvyšší hodnoty tohoto polyaminu (6 mg/l) zjištěny u koncentrace 4 % (w/v) sacharidů po 24 a 48 hodinách kultivace. V bujónu o pH 5 byly nejvyšší hodnoty naměřeny u koncentrací 0,5 % a 1 % (w/v) cukru po 24 hodinách kultivace (cca 7 mg/l). V bujónu o pH 6 byla zjištěna největší produkce spermidinu v prostředí se 2 % (w/v) cukru po 24 hodinách kultivace (6 mg/l).

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1. Grafické znázornění výsledků produkce spermidinu při $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ je zobrazeno na obrázku 16.



Obrázek 16: Produkce spermidinu při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

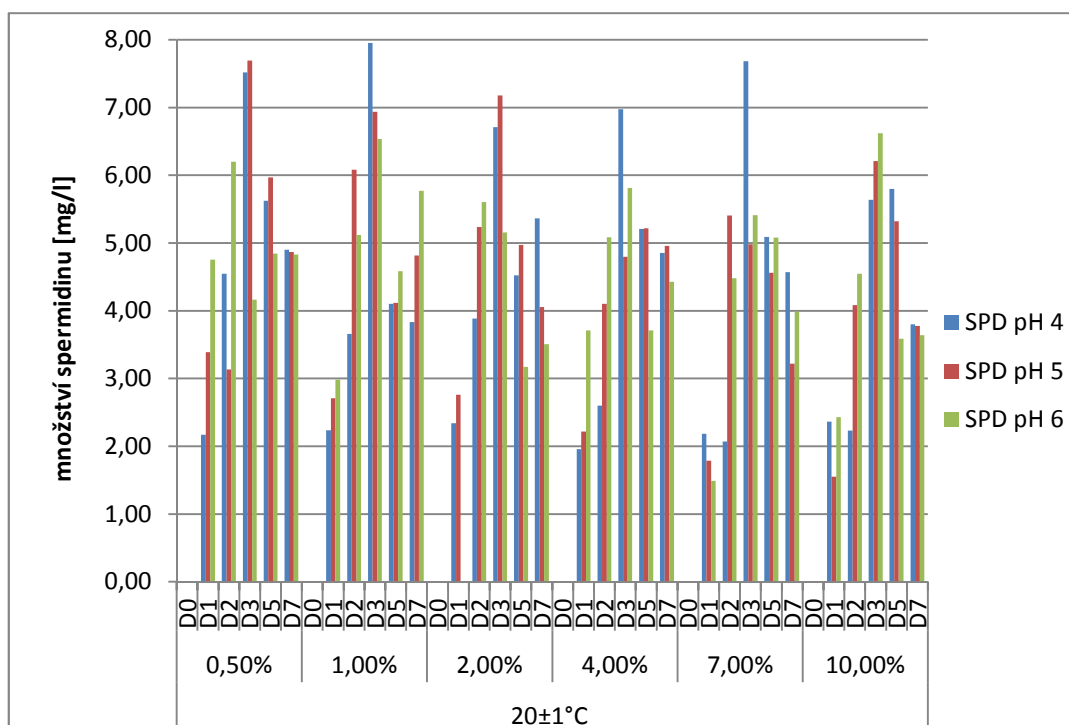
Produkce spermidinu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

U jednotlivých koncentrací cukru se produkce spermidinu během kultivace při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v čase zvyšovala (obrázek 17).

Nejvýznamnější produkce byla zjištěna v bujónu o pH 4 po 3 dnech inkubace u koncentrací 0,5 %, 1 %, 4 % a 7 % (w/v) cukru a dosáhla hodnot vyšších než 7 mg/l. U pH 5 byla zjištěna největší produkce tohoto polyaminu také po 3 dnech inkubace, a to u všech testovaných koncentrací směsí sacharidů. Nejvyšší hodnota byla detekována v mo-

difikovaném MRS bujónu obsahujícím 0,5 % (w/v) cukru, a to cca 8 mg/l. Produkce spermidinu při pH 6 byla nejvyšší po třech dnech kultivace u koncentrací 0,5 %, 1 % a 10 % (w/v) cukru – SPD > 6 mg/l.

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1.



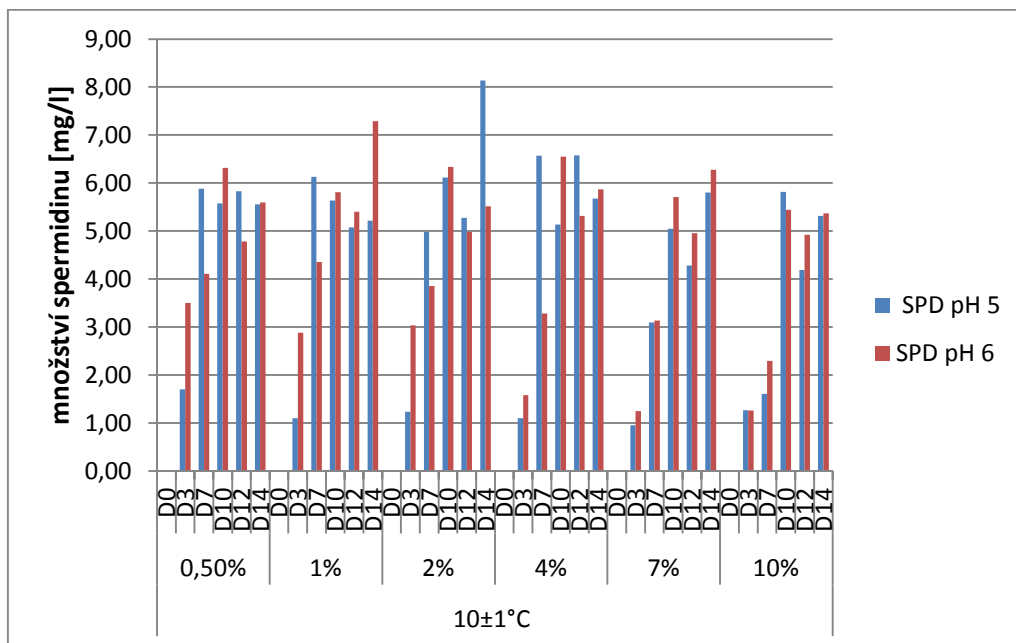
Obrázek 17: Produkce spermidinu při teplotě 20 °C

Produkce spermidinu při teplotě 10 °C.

Při testované teplotě 10 °C a pH 5 byla produkce spermidinu u všech koncentrací sacharidů nejnižší po 3 dnech kultivace (cca 2 mg/l) a po 7 dnech vzrostla zhruba trojnásobně (SPD > 6 mg/l). V čase se produkce dále zvyšovala. Nejvýznamnější byla u koncentrace 2 % (w/v) cukru po 14 dnech kultivace, kdy lehce přesáhla hodnotu 8 mg/l (obrázek 18).

V modifikovaném bujónu o pH 6 produkce spermidinu v čase také stoupala, kdy po 3 dnech inkubace u všech testovaných koncentrací sacharidů nepřesáhla hodnotu 4 mg/l. Nejvyšší hodnota byla zjištěna po 14 dnech kultivace v bujónu obsahujícím 1 % (w/v) cukru (cca 7 mg/l). Analyzovaný kmen při pH 4 nevykazoval růst a proto nebyla sledována produkce spermidinu.

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 5,0 – 6,1. Grafické znázornění výsledků produkce spermidinu při $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ je zobrazeno na obrázku 18.



Obrázek 18: Produkce spermidinu při teplotě 10 °C

Produkce sperminu při teplotě 30 °C.

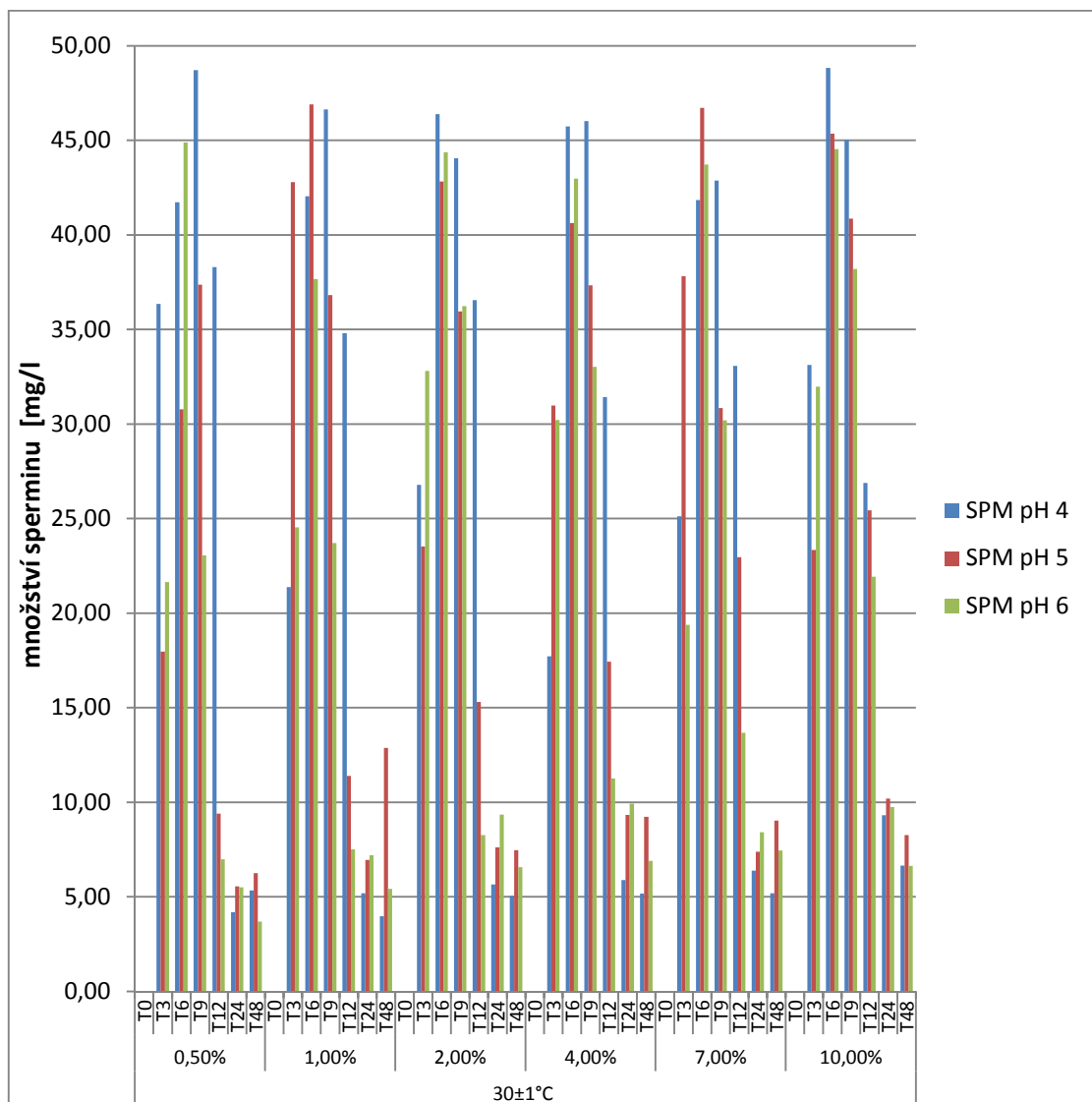
Při provedeném skríningu analyzovaného kmene nebyl spermin detekován, ale při monitoringu změn množství biogenních aminů vyprodukovaných kmenem v závislosti na sledovaných faktorech už jeho produkce byla zaznamenána, jak ukazuje obrázek 19.

Při kultivační teplotě 30 °C produkce tohoto polyaminu vykazovala vysoké hodnoty u všech kombinací bujónů během prvních 6 a 9 hodin. Dále v čase došlo k výraznému snížení produkce tohoto polyaminu (obrázek 19). V bujónu o pH 4 byla nejvyšší produkce zaznamenána po 9 hodinách inkubace u koncentrace 0,5 % a 10 % (w/v) cukru (> 48 mg/l). U ostatních koncentrací byla tato hodnota po 9 hodinách kultivace nižší než 47 mg/l. Nejnižší hodnota byla naměřena po 48 hodinách kultivace v MRS bujónu obsahujícím 1 % (w/v) cukru – SPM < 4 mg/l.

V bujónech o pH 5 byla naměřena nejvyšší hodnota při přidavku 1 % a 7 % (w/v) cukru po 6 hodinách inkubace (cca 46 mg/l). Nejnižší množství bylo vyprodukováno v bujónu obsahujícím 0,5 % (w/v) cukru po 24 hodinách inkubace (6 mg/l). Při pH 6 byly naměřeny také nejvyšší hodnoty po 6 a 9 hodinách kultivace u všech testovaných koncen-

trací sacharidů. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u koncentrací 0,5 % (w/v) cukru (44 mg/l) a nejnižší také u koncentrace 0,5 % w/v cukru, ale až po 48 hodinách kultivace (cca 4 mg/l).

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1.



Obrázek 19: Produkce sperminu při teplotě 30 °C

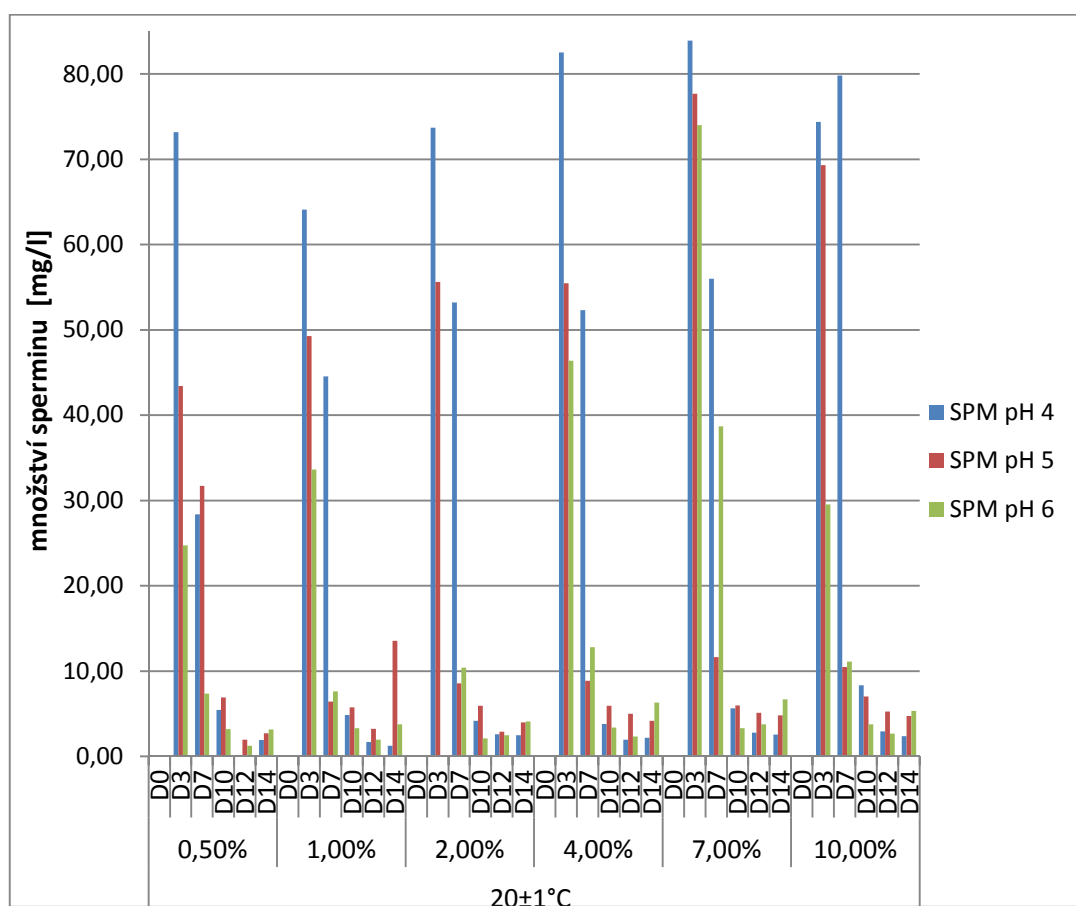
Produkce sperminu při teplotě 20 °C.

Produkce sperminu byla při 20 °C nejvyšší v bujónu o pH 4 u všech koncentrací sacharidů po 1 a 2 dnech kultivace (obrázek 20). V následujících dnech došlo k výraznému poklesu množství tohoto aminu v testovaných bujónech po kultivaci daného mikroorganismu. Nejvyšší hodnota v bujónu o pH 4 byla zjištěna po 1 dni v bujónu se 7 % (w/v) cukru (> 83 mg/l), nejnižší u koncentrace 1 % (w/v) cukru po 7 dnech (< 2 mg/l).

U pH 5 byla nejvyšší hodnota produkce sperminu detekována po prvním dnu kultivace v bujónu obsahujícím 7 % (w/v) cukru, tato hodnota se pohybovala kolem 78 mg/l. Nejnižší množství vyprodukovaného aminu bylo zjištěno v bujónu s 0,5 % (w/v) cukru po 5 dnech kultivace, kdy vyprodukované množství bylo nižší než 2 mg/l.

V bujónu o pH 6 bylo nejvíce sperminu zjištěno v bujónu se 7 % (w/v) cukru po 1 dni (> 74 mg/l) a nejnižší u koncentrace 0,5 % (w/v) cukru po 5 dnech (< 2 mg/l).

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 4,2 – 6,1.



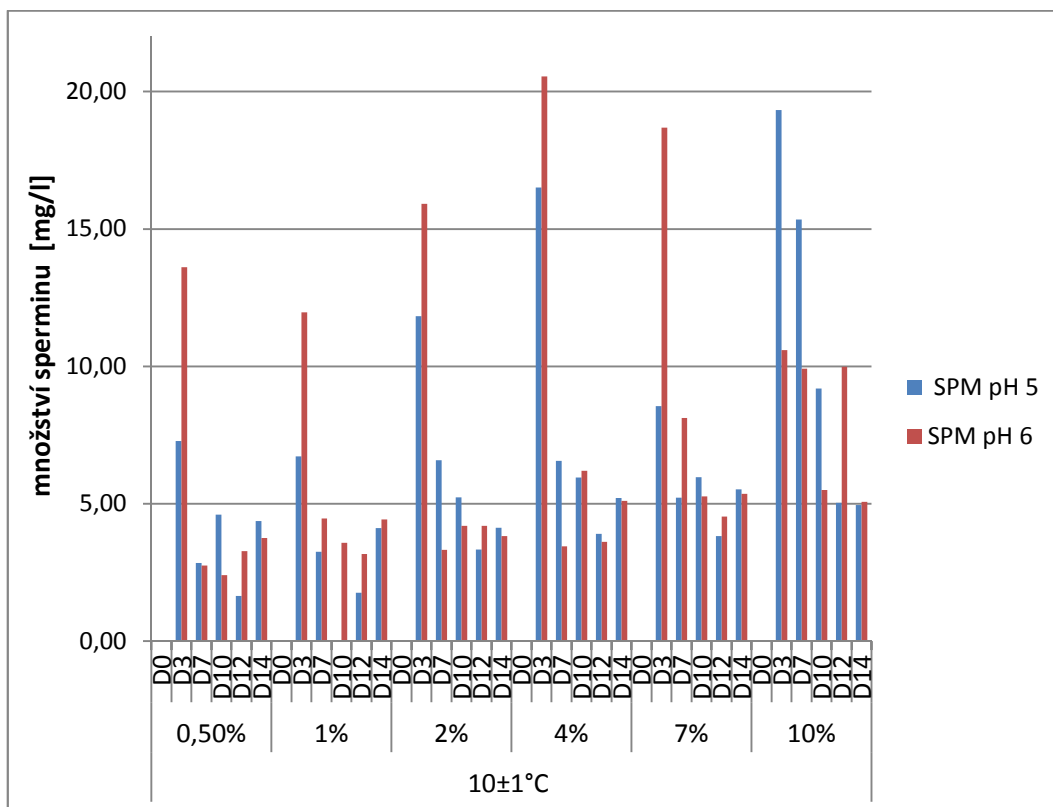
Obrázek 20: Produkce sperminu při teplotě 20 °C

Produkce sperminu při teplotě 10 °C.

Produkce sperminu během kultivace při 10 °C už byla poměrně nižší než při teplotách 20 °C a 30 °C (obrázek 21). Opět byla zjištěna po 3 dnech vyšší produkce a v postupujícím čase se snižovala. Nejvyšší produkce byla detekována při pH 5 u koncentraci 10 % (w/v) cukru po 3 dnech (> 19 mg/l) a u pH 6 rovněž po 3 dnech u koncentraci

4 % (w/v) cukru (> 20 mg/l). Nejnižší hodnoty po 14 dnech kultivace byly nižší než 5 mg/l (obrázek 21).

U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 5,0 – 6,1.



Obrázek 21: Produkce sperminu při teplotě 10 °C

Vývoj růstu mikroorganismů při teplotě 30 °C

Produkce biogenních aminů je spojena s množstvím přítomných mikroorganismů. Proto byl současně se sledováním produkce biogenních aminů pozorován i růst testovaného kmene v závislosti na vnějších faktorech. V jednotlivých časových intervalech (stejných, jako byly intervaly odběrů BA) byly mikroorganismy vysévány na misky s MRS agarem za účelem zjistit počet mikroorganismů v modifikovaných MRS bujónech. Sledovaný mikroorganismus vykazoval při teplotě 30 °C a pH 4 pozvolný nárůst do 9. hodiny, pak nastal prudší nárůst počtu kolonií do 24. hodiny. Obdobný průběh nastal ve všech koncentracích cukrů, mimo koncentraci 1 % (w/v) cukru, kde bylo zaznamenáno strmější zvyšování biomasy až do 48. hodiny.

Růst mikroorganismů při pH 5 a teplotě 30 °C byl do 6. hodiny konstantní v přítomnosti 10 % (w/v) cukru. V dalších koncentracích došlo jen k mírnému zvýšení nárůstu kolonií. K největšímu nárůstu došlo v rozmezí 6. a 24. hodiny odběru u všech koncentrací cukru. Po 24. hodině odběru došlo u koncentrace 0,5% (w/v) k zastavení růstu kolonií a u koncentrací 1 – 10 % (w/v) k mírnému nárůstu.

Zvýšení objemu počtu mikroorganismů při pH 6 a teplotě 30 °C byl do 3. hodiny konstantní v přítomnosti 1 – 10 % (w/v) cukru. Do 9. hodiny se růst mikroorganismů zrychlil a do 12. hodiny se růst významně neměnil. Od 12. hodiny se objem bakteriální masy zvýšil a dosáhl nejvyšší koncentrace ve 48. hodině odběru pro koncentrace 2 – 10 % (w/v). V koncentraci 0,5 % (w/v) byl zaznamenán nárůst do 6. hodiny. Od tohoto odběru až do 24. hodiny měl růst stejný průběh jako u ostatních koncentrací. Od 24. hodiny bylo zvýšení objemu konstantní.

Vývoj růstu mikroorganismů při teplotě 20 °C

Průběh růstové křivky při pH 4 a teplotě 20 °C vykazoval lineární růst v přítomnosti všech sledovaných koncentrací. Po sedmi dnech kultivace byla stanovena největší koncentrace bakteriální masy. Stejný průběh byl sledován při pH 5 i 6 a teplotě 20 °C s tou výjimkou, že během 2. a 3. dne byl růst zpomalen. Po 3. dnu byla produkce bakteriální masy zvýšena.

Vývoj růstu mikroorganismů při teplotě 10 °C

Zvýšení objemu počtu mikroorganismů při pH 5 a teplotě 10 °C byl do 3. dne konstantní v přítomnosti 0,5 – 10 % (w/v) cukru. Do 10. dne byl růst mikroorganismů strmější pro koncentrace 1, 2, 7 a 10 % (w/v). Růst do 14. dne byl pozvolný pro již zmíněné koncentrace. Pro koncentrace 0,5 % a 4 % (w/v) byl nárůst mikroorganismů exponenciální. Při pH 6 a teplotě 10 °C měl růst lineární závislost do 10. dne, od tohoto odběrového dne došlo jen k mírnému zvýšení počtu kolonií.

6.3 Souhrnná diskuze

V této práci byla pomocí vysokoúčinné chromatografie sledována změna koncentrace vybraných biogenních aminů (tyraminu, fenyletylaminu, sperminu a spermidinu), jejichž produkce byla závislá na vlivu faktorů vnějšího prostředí (koncentrace cukrů glukózy a fruktózy v poměru 1:1, rozdílné pH a teploty kultivace). Volené faktory by moh-

ly ovlivňovat dekarboxylázovou aktivitu kmene izolovaného ze vzorku vína. Produkce byla testována *in vitro*.

V první fázi experimentu byl proveden skrínig 145 kmenů kultivovaných na vybraných živných půdách. Bylo stanoveno 8 biogenních aminů (histamin, tyramin, fenyletylamin, putrescin, spermin, spermidin, kadaverin a tryptamin). Tyramin byl detekován u 144 kmenů, kde u jednoho kmene množství přesáhlo 1950 mg/l, fenyletylamin byl stanoven u čtyř kmenů a množství nepřesáhlo 32 mg/l, kadaverin byl detekován u 19 kmenů v množství do 3 mg/l, spermidin byl produkován všemi kmeny. Spermidin je polyamin, podílející se v buňkách na růstu, proto se může vyskytovat ve víně, kam přechází z pletiv hroznů při lisování (Patočka, 2000; Murray, 2002) a spermin 7 kmeny do 15 mg/l. Víno patří mezi potraviny, u kterých se předpokládá vznik biogenních aminů (Anli, 2009). Studium vzniku těchto látek ve víně je zájmem mnoha vědců. Martuscelli et al. ve své práci prezentují, že během celého procesu fermentace dochází k nárůstu biogenních aminů a množství se liší podle odrůdy vína. Ancin-Azpilicueta, (2008) uvádí, že biogenní aminy mohou být tvořeny během jablečno-mléčného kvašení. Tyramin a histamin je tvořen v první fázi a pak je tvořen kadaverin a putrescin. Dále je uváděno, že biogenní aminy vytváří charakteristické organoleptické vlastnosti.

V další části experimentu byla sledována závislost tvorby biogenních aminů na vnějších faktorech. Vznik biogenních aminů je závislý na obsahu aminokyselin v prostředí, a proto byly do kultivačního media přidány příslušné aminokyseliny jako jejich prekurzory. Přídavek každé z aminokyselin byl 0,2 % (w/v). Byl sledován vliv kombinace faktorů.

Z výsledků vyplývá, že při teplotě 30 °C byla produkce tyraminu nejvyšší při pH 6 v přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru TYM > 1300 mg/l, při teplotě 20 °C vykazoval tyramin největší množství při pH 5 a v rovněž přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru TYM > 2000 mg/l a při teplotě 10 °C to bylo opět pH 6, ale v přítomnosti 2 % (w/v) cukru TYM 1800 mg/l.

Produkce fenyletylaminu byla největší při 30 °C v přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru při pH 4 PEA > 18 mg/l. Ve 20 °C to bylo při pH 4 přítomnosti 1 % (w/v) cukru PEA > 30 mg/l. Zde byly hodnoty dvojnásobné než při teplotě 30 °C. Při teplotě 10 °C to bylo opět pH 6 v přítomnosti 2 % (w/v) cukru PEA > 20 mg/l.

Spermidin byl detekován v maximální koncentraci SPD > 6 mg/l při teplotě 30 °C a pH 5. Ve 20 °C to při pH 5 přítomnosti až 7 % (w/v) cukru SPD > 7 mg/l. V 10 °C byla produkce nejvýznamnější u koncentrace 2 % (w/v) cukru po 14 dnech SPD > 8 mg/l.

Spermin byl tvořen při pH 4 ve všech koncentracích cukru SPM > 40 mg/l při teplotě 30 °C. Ve 20 °C to bylo opět pH 4 přítomnosti 7 % (w/v) cukru SPM > 80 mg/l. Zde byly hodnoty dvojnásobné než při teplotě 30 °C. V 10 °C byla produkce nejvýznamnější u koncentrace 4 % (w/v) cukru při pH 6 SPD > 20 mg/l.

Vliv pH je velmi důležitý faktor v produkci biogenních aminů. Vědci se však ve vlivu pH na dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů rozcházejí. Fernández et al. (2007) ve své práci uvádí, že dekarboxylázová aktivita je vyšší při nižším pH. Naopak Gardini et al. (2001), který zkoumal produkci biogenních aminů u kmene *Enterococcus faecalis*, popisuje vyšší aktivitu při vyšším pH. Spano (2010) prezentuje, že mikroorganismy se brání nízkým hodnotám pH, tím že produkují biogenní aminy, které jim pomáhají vyrovnávat kyselé intracelulární pH. Tento fakt je v souladu s výsledky Ruiz (2012), kde uvádí, že ve vínech o pH 3,3 a vyšším probíhají procesy tvorby biogenních aminů lépe.

Ke stejnému výsledku jsme dospěli v této práci v případě tyraminu, kde byla nejvyšší produkce detekována v bujónech při pH 5. Steidl, (2010) uvádí, že čím vyšší je hodnota pH moštu nebo vína, tím snadněji dochází k rozmnožování mléčných bakterií a k rychlejšímu průběhu JMK

Dalším sledovaným faktorem byla teplota. Z výsledků práce vyplývá, že největší produkci vykazoval zkoumaný kmen při teplotě 20 °C u všech detekovaných biogenních aminů. Tento fakt může být způsoben optimální růstovou teplotou testovaného kmene, která tak může být v souladu s tím, že kmen byl vyizolován z vína. Vliv teploty byl podpořen přidavkem cukru, zatímco při teplotě 30 °C a 20 °C stačil jen 0,5% přídavek cukru, při teplotě 10 °C už využíval 2 % přítomnost cukru pro podporu tvorby biogenních aminů. Tahmouzi (2013) ve své práci uvádí, že při analyzování ryb zpracovávaných při teplotě vyšší, byla produkce biogenních aminů zvýšená oproti tomu než u ryb zpracovaných při nízkých teplotách.

Závěrem lze konstatovat, že sledované faktory mají vliv na produkci biogenních aminů, zejména na dekarboxylaci tyrozinu a fenylalaninu. Tyramin byl detekován v takovém množství, které by mohlo být pro lidský organizmus nebezpečné (Ancín-Azpilicueta et al., 2008). Pro Českou republiku platí Nařízení komise (ES) č. 2073/2005, kterým je

stanoven limit pouze pro histamin v rybách a produktech rybolovu. Povolený limit je 100 – 200 mg/kg. Pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku vyrobených z ryb s vysokým obsahem histidinu. Pro tuto skupinu je povolený limit 200 – 400 mg/kg.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení kinetiky biogenních aminů u kmene vyizolovaného z vína v podmínkách *in vitro* v závislosti na vnějších faktorech. Úkolem této práce bylo sledovat změny obsahu biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Byly zjištěny následující výsledky:

- Přítomnost biogenních aminů byla zjištěna v téměř všech bujónech po kultivaci 145 kmenů, u kterých byl proveden skrínig na dekarboxylázovou aktivitu,
- K vyprodukovaným biogenním aminům patřil tyramin, fenyletylamin, spermin a spermidin,
- Produkce tyraminu a fenyletylaminu měla se zvyšující se přítomnosti cukru klesající tendenci, nejvyšší produkce tyraminu byla zaznamenána v prostředí při pH 5 v přítomnosti 0,5 % (w/v) cukru (> 2000 mg/l); nejvyšší produkce fenyletylaminu během kultivace při 20 °C v prostředí o pH 4 a v přítomnosti 1 % (w/v) cukru (> 30 mg/l),
- Spermin a spermidin byly stanoveny v nízkých koncentracích,
- Dekarboxylázová aktivita byla nevyšší při teplotě 20 °C,
- Kmen vykazoval vysokou produkci tyraminu v koncentracích, které by mohly představovat toxikologické riziko pro některé osoby,

Testy byly provedeny *in vitro* v modelových podmínkách, bude potřeba zjistit chování testovaného kmene v reálném prostředí, ve víně. Rovněž bude potřeba vyizolovaný kmen podrobit identifikaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMS, R. M. a R. J. M. NOUT. Fermentation and food safety. *An Aspen publication*. 2001, s. 291.

Agro navigátor: Biogenní aminy ve víně [online]. 2002 [cit. 2014-04-17]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=158&ch=13&typ=1&val=10747>

ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen., Ana GONZÁLEZ-MARCO a Nerea JIMÉNEZ-MORENO. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 2008, vol. 48, no. 3, s. 257-275.

ANLI, R. E. a M. BAYRAM. Biogenic amines in wines. *Food Reviews International*. 2009, vol. 25, no. 1, s. 86-102.

BAE, S. S. Investigation of bacteria associated with Australian wine grapes using cultural and molecular methods. Sydney. 2005, s. 211. Thesis on University of New South Wales.

BARTOWSKY E. J., D. XIA, R. L. GIBSON, G. H. FLEET and P. A. HENSCHKE. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003, vol. 36, s. 307-314.

BAUZA, T., A. BLAISE, F. DAUMAS a J. C. CABANIC. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallee du Rhone by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 707. 1995, s. 373–379.

BOVER-CID, S. a H. HOLZAPFEL. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 53, s. 33-41.

BUTEAU, C. et. al. High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. *Journal of chromatography*. 1984, vol. 284, s. 201-210.

DAVIS C. R., D. J. WIBOWO, T. H. LEE and G. H. FLEET. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 51. 1986, s. 539-545.

DE LEY J., M. GILLIS a J. SWING. Family VI. Acetobacteraceae. In: Brenner, Krieg and Staley (Editors), *The Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 2005, 2nd ed., Vol II, Springer, New York. s. 267-278.

DICKS L. M. T., F. DELLAGLIO a M. D. COLLINS. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, vol. 45, s. 395-397.

DU PLESSIS H. W., L. M. T. DICKS, I. S. PRETORIUS, M. G. LAMBRECHTS a M. du TOIT. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African base wines. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, vol. 91, s. 19-29.

EDER, Reinhard. *Vady vína*. Vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903-2016-3.

EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26

FERNÁNDEZ, María, Daniel M. LINARES, Ana RODRÍGUEZ a Miguel A. ALVAREZ. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007-1-9, vol. 73, issue 6, s. 1400-1406. DOI: 10.1007/s00253-006-0596-y.

FLAMINI, Riccardo. *Hyphenated techniques in grape and wine chemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2008, xvi, 345 s. ISBN 04-700-6187-1.

FLEET G. H, S. et. al. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48. 1984, s. 1034-1038

FUGELSANG, K a Charles G EDWARDS. *Wine microbiology: tradice a současnost*. 2nd ed. /. New York, NY: Springer, c2007, xx, 393 s. ISBN 03-873-3349-5.

GARAI, G. et.al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, s. 123-147.

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 64, 1-2, s. 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. Dostupné

z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004451>

GARVIE E. I. Genus *Leuconostoc*, genus *Pediococcus*. In: Brenner, Krieg and Staley (Editors), *The Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 1986, 2nd ed., Vol II, Springer, New York, s. 1071-1079.

GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*, 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. Česká matice technická, 415. ISBN 80-967-0649-7.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trend in Food Science and Technology*. 1995, vol. 5, s. 42-48.

HAMMES W. P., N. WEISS a W. HOLZAPFEL. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows, Truper, Dworkin, Harder and Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*. 1992, 2nd ed., Vol. II, Springer-Verlag, New York, s. 1535-1595.

HEARD G. M. and G. H. FLEET. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ Microbiol.* 1985, vol. 50, s. 727-728

HOLZAPFEL W. H. and U. SCHILLINGER. The Genus *Leuconostoc*. In: Balows, Truper, Dworkin, Harder and Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*, 1992, 2nd ed., Vol. II, Springer-Verlag, New York, s. 1508-1534.

IBE, A., K. SAITO, M. NAKAZATO, Y. KIKUCHI, K. FUJINUMA a T. NISHIMA. Quantitative Determination of amines in Wine by liquid Chromatography. *Ibe et al. Assoc. off. Anal. Chem.* 1991, vol. 74, no. 4. s. 256.

JACKSON, Ronald S. a Agamemnon DESPOPOULOS. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008, 352 s. ISBN 978-012-3736-468.

KALÁČ, P., J. ŠAVEL, M. KRÍŽEK, T. PELIKÁNOVÁ a M. PROKOPCOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 2002, vol. 79, s. 431-434.

KALÁČ, Pavel a Petra KRAUSOVÁ. A preview of dietary polyamines: Formative implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 2005, vol. 90, s. 219-230.

KALÁČ, Pavel. Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*. 2009, no. 7, s. 65-74.

KAROVIČOVÁ Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, no. 1, s. 70-79.

KIM, M. K., J. H. MAH a H. J. HWANG. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry*. 2009, vol. 119, s. 87-95.

KOMPRDA, Tomáš et. al. Contents and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*. 2007, vol. 102, no. 1, s. 129-137.

KOMPRDA, Tomáš. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství č.10*. 2005, s. 646-649.

KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. Brno: MZLU, 2004, 145 s. ISBN 978-80-7175-757-7.

KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 2., dopl. vyd. Praha: Brázda, 2004, 267 s., [12] s. barev. obr. příl. ISBN 80-209-0327-5.

KRAUS, Vilém. *Réva a víno: tradice a současnost*. Vyd. 1. Praha: Knižní klub, 1999, 280 s. ISBN 80-860-3123-3.

KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Brno: MZLU, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.

LA TORRE, G., M. SAITTA, A. GIORGIA POTORTI, G. DI BELLA a G. DUGO. High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 82, no. 20, s. 8402-8405.

LANDETE, J. M. et al. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005.

LANGE, J. et al. Comparison of a capillary electrophoresis method with highperformance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*. 2002, vol. 779, s. 229-239.

LONVAUD-FUNEL, A. Lactis acid bacteria in the quality improvement and despreciation of wine. 1999.

MALÍK, Fedor. *Ze života vína: tradice a současnost*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: Filip Trend, 2003, 221 s. ISBN 80-862-8227-9.

MARTUSCELLI M., G. ARFELLI, A. C. MANETTA et. al. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines Abruzzo (Italy) *Food Chemistry*. 2013, Volume: 140, s. 590-597.

MINÁRIK, Erich. *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1986, 101 s.

MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry: a LANGE medical book*. 23. vyd., V ČR 3. vyd., V nakl. H. New York: Springer, c2009, xv, 735 s. ISBN 9780387741185-.

MORENO-ARRIBAS, M. et al. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International journal of Food Microbiology*. 2003.

MURRAY, Robert K. *Harperova biochemie*. 23. vyd. Jinočany: H H, 2002, ix, [3], 872 s. ISBN 80-731-9013-3.

NIELSEN J. C. and H. RICHELIEU. Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65. 1999, s. 740-745.

NOVELLA-RODRÍGEZ, S. et al. Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *Journal of Food Science*. 2003, vol. 68, s. 750-755.

ORDUNA M. de R., M. L. PATCHETT, S. Q. LIU a G. J. PILONE. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67. 2001, s. 1657-1662.

OSBORNE J. P. a CH. G. EDWARDS. Bacteria importatnt during winemaking. *Adv. Food Nutr. Res.* 50. 2005, s. 139-177.

OTÁHAL, Karel. *Jak z hroznů víno dělat: tradice a současnost*. Vyd. 1. Praha: Jonathan Livingston, 2010, 99 s. ISBN 978-80-86037-35-6.

PATOČKA, J. a G. KUEHN. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. *Acta Medica*. 2000, vol. 43, no. 4, s. 119–124.

PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Grada publishing, 2010, 120 s. ISBN 978-80-247-3487-3.

PIPEK, Petr. Fermentované salámy a probiotika. *Potravinářská revue*. 2008, roč. 5, č. 3, s. 13-16.

PRIEWE, Jens. *Nová škola vína*. Vyd. 1. V Praze: Knižní klub, 2003, 307 s. ISBN 80-242-1047-9.

RADLER, F. and K. P. FÄITH. Histamine and other biogenic amines in wines. In: International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. *Proceeding*. Am. Soc. Enol. Vitic. Davis: J. M. Rantz. 1991, s. 185-195.

- REMIZE F., A. GAUDIM, Y. KONG, J. GUZZO, H. ALEXANDRE, S. KRIEGER a M. GUILLOUX-BENATIER. *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Arch. Microbiol.* 185. 2006, s. 459-469.
- ROJO-BEZARES B., Y. SAENZ, P. POETA, M. ZARAZAGA, F. RUIZ-LARRERA a C. TORRES. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111. 2006, s. 234-240.
- RUIZ, Patricia, Pedro MIGUEL IZQUIERDO, Susana SESENA et. al. Malolactic Fermentation and Secondary Metabolite Production by *Oenococcus oeni* Strains in Low pH Wines. *Journal of Food Science.* 2012, vol. 77, s. M579-M585.
- SAEKI A., M. TANIGUCHI, K. MATSUSHITA. H. TOYAMA, G. THEERAGOOL, N. LOTONG a O. ADACHI. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61. 1997, s. 317-323.
- SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International.* 1997, vol.29, no.7, s. 675-690.
- SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka.* Vyd. 2. Praha: Grada, 1993. ISBN 80-856-2379-X.
- SILLA SANTOS, H. M. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology.* 2006, vol. 29, s. 213-231.
- SMĚLÁ, Dana a kol. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy.* 2004, č. 98, s. 432-437.
- SPANO, G, P RUSSO, A LONVAUD-FUNEL, P LUCAS, H ALEXANDRE, C GRANDVALET, E COTON, M COTON, L BARNAVON, B BACH, F RATTRAY, A BUNTE, C MAGNI, V LADERO, M ALVAREZ, M FERNÁNDEZ, P LOPEZ, P F DE PALENCIA, A CORBI, H TRIP a J S LOLKEMA. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2010, vol. 64, S95-S100. DOI: 10.1038/ejcn.2010.218. Dostupné z:<http://www.nature.com/doi/10.1038/ejcn.2010.218>
- STANDARA, S., M. VESELÁ a M. DRDÁK. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Die Nahrung.* 2000, vol. 44, no. 1, s. 28-31.

STANDAROVÁ, E. et. al. Biogenic Amine Production in Olomouc Curd Cheese (Olomoucké tvarůžky) at Various Storage Conditions. *Acta vet. Brno*. 2010, vol. 79, s. 147-156.

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

STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Zastoupení vybraných biogenních aminů v sýrech s bílou plísní na povrchu. *Acta fytotechnica et zootechnica - Mimoriadné číslo*. 2009, s. 610-617.

STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Valtice: Národní salon vín, 2002, 307 s. ISBN 80-903-2010-4.

STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo. Bratislava: Národní vinařské centrum, 2010, 309 s. ISBN 978-80-903201-9-2.

SUZZI, G. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003-11-15, vol. 88, issue 1, s. 41-54. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00080-1.

Dostupné

z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503000801>

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnolog: tradice a současnost*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

The Atheist Monk: Beer Bugs [online]. 2011 [cit. 2014-04-18]. Dostupné z: <http://www.athiestmonk.com/2011/11/beer-bugs.html>

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.

VIDAL-CAROU, M. C., et. al. I on-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*. 2003, vol. 998, s 235-241. ISSN 0021-9673/03.

Vyhláška č. 298/1997 Ministerstva zdravotnictví.

WEISS N. The Genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: Balows, Truper, Dworkin, Harder and Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*. 1992, 2nd ed., Vol. II, Springer-Verlag, New York, s. 1502-1507.

ZHIJUN, L., W. YONGNING, Z. GONG, Z. YUNFENG a X. CHYNHHU. A survey of biogenic amines in chinese red wines. *Food chemistry*. 2007, vol. 105, s. 1530-1535.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného
SO ₂	Oxid Siřičitý
ATP	Adenosintrifosfát
CO ₂	Oxid Uhličitý
JMK	Jablečno-mléčné kvašení
BOK	Biologické odbourávání kyselin
JMF	Jablečno-mléčná fermentace
PA	Polyaminy
TYR	Tyramin
HPLC	Kapalinová Chromatografie
ES	Evropské společenství
IEC	Iontově-výměnná chromatografie
TLC	Tenkovrstvená chromatografie
GC	Plynová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialové záření
PCA	Plate Count Agar
ACA	Acetobacter Agar
MRS	deMan-Rogosa-Sharpe Agar
DAD	Detektor diodového pole

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma celkové výroby vína (www.wineofczechrepublic.cz)	12
Obrázek 2: Rod <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Obrázek 3: Histamin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)	31
Obrázek 4: Tyramin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)	31
Obrázek 5: Fenyletylamin (Moreno-Arribas, Polo, 2009).....	31
Obrázek 6: Putrescin (Moreno-Arribas, Polo, 2009).....	32
Obrázek 7: Kadaverin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)	32
Obrázek 8: Spermin (Moreno-Arribas, Polo, 2009).....	32
Obrázek 9: Spermidin (Moreno-Arribas, Polo, 2009)	32
Obrázek 10: Produkce tyraminu při teplotě 30 °C.....	51
Obrázek 11: Produkce tyraminu při teplotě 20 °C.....	52
Obrázek 12: Produkce tyraminu při teplotě 10 °C.....	53
Obrázek 13: Produkce fenyletylenaminu při teplotě 30 °C	54
Obrázek 14: Produkce fenyletylaminu při teplotě 20 °C.....	55
Obrázek 15: Produkce fenyletylaminu při teplotě 10 °C.....	56
Obrázek 16: Produkce spermidinu při teplotě 30 °C	57
Obrázek 17: Produkce spermidinu při teplotě 20 °C	58
Obrázek 18: Produkce spermidinu při teplotě 10 °C	59
Obrázek 19: Produkce sperminu při teplotě 30 °C	60
Obrázek 20: Produkce sperminu při teplotě 20 °C	61
Obrázek 21: Produkce sperminu při teplotě 10 °C	62

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obsah kvasinek v moštu během kvašení (upraveno dle Bae, 2005; Flamini, 2008).	13
Tabulka 2: Skupiny sledovaných mikroorganismů.....	42
Tabulka 3: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě PCA.	45
Tabulka 4: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě ACA.	48
Tabulka 5: Produkce biogenních aminů (mg/l) analyzovaných kmenů na živné půdě MRS.	49