

# **Produkce biogenních aminů bakteriálními izoláty mléčného kvašení z procesu výroby piva**

Bc. Veronika Mandová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Mandová**  
Osobní číslo: **T13445**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Produkce biogenních aminů bakteriálními izoláty mléčného kvašení z procesu výroby piva**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Dekarboxylázová aktivita bakterií mléčného kvašení.
2. Faktory ovlivňující aminogenní aktivitu mikroorganismů.
3. Výskyt biogenních aminů v surovinách pro výrobu piva a původci vzniku biogenních aminů v rámci fermentačního procesu.

### II. Praktická část

1. Skrining produkce biogenních aminů u izolátů bakterií mléčného kvašení z procesu výroby piva in vitro a ve sladince metodou RP-HPLC.
2. Zpracování výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] **BASAŘOVÁ G., J. ŠAVEL, P. BASAŘ a T. LEJSEK, 2010. Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva, VŠCHT PRAHA. ISBN 978-80-7080-734-7.**

[2] **DADÁKOVÁ E., P. KRÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ, 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Food Chemistry, vol. 116, s. 365-370. ISSN: 0308-8146.**

[3] **KALÁČ Pavel a Martin Křížek, 2003. A review of biogenic amines and polyamines in beer. Journal of the institute of Brewing, vol. 109 iss. 2, s. 123-128. ISSN: 2050-0416.**

Dostupné také z:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x/pdf>.

[4] **KAROVÍČOVÁ Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ, 2005. Biogenic amines in food. Chemical Papers, vol. 59, iss. 1, s. 70-79. ISBN: 1336-9075. Dostupné také z:**

[http://www.chempap.org/file\\_access.php?file=591a70.pdf](http://www.chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf).

[5] **ÖNAL Armagan, 2006, A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. Food Chemistry, vol. 103, s. 1475-1486. ISSN: 0308-8146.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Eva Lorencová**

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

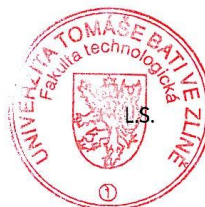
**2. února 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**22. dubna 2015**

Ve Zlíně dne 2. února 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: MANDOVÁ VERONIKA.....

Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit 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 17.4.2015

  
.....

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 užit 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 přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá dekarboxylázovou aktivitou vybraných izolátů kmenů laktobacilů z procesu výroby piva (36 kmenů). Produkce biogenních aminů (BA) byla sledována za podmínek *in vitro* a ve sladině. Studované izoláty nejhojněji produkovaly tyramin (TYR). Vzhledem k nedostatku studií zaměřených na produkci BA zástupci *Lactobacillus buchneri*, bylo v rámci této práce realizováno sledování kinetiky produkce tyraminu ovlivněné testovanými faktory (teplota kultivace, přídavky testovaných koncentrací etanolu a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin). Pro tyto účely byl vybrán kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Kmen vykazoval produkci tyraminu v toxikologicky významném množství v rámci výše uvedeného prvotního skrínungu (TYR  $332,8 \pm 23,4$  mg/l). BA a polyaminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s předkolumnovou derivatizací dansylchloridem. Nejvyšší množství TYR bylo zjištěno v supernatantech po kultivaci kmene při 30 °C s přídavkem 2 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých chmelových látek. V případě rozvoje kmene v reálném prostředí piva by mohl testovaný kmen kumulací TYR ohrozit zdraví spotřebitele.

Klíčová slova: biogenní aminy, polyaminy, dekarboxylace, *Lactobacillus buchneri*, pivo.

## ABSTRACT

This thesis was dealing with the decarboxylase activity of selected lactobacilli isolates from the production of beer (36 strains). The formation of biogenic amines (BA) was observed at *in vitro* conditions and after the cultivation in sterilized wort. The most abundantly produced BA in the tested strains was tyramine (TYR). Due to lack of studies focused on the kinetics of BA production in representatives of *Lactobacillus buchneri* it was realized the observation of TYR production influenced by tested factors (different cultivation temperatures; the addition of tested concentrations of ethanol and mixture of iso-alpha-bitter acids). For this purposes the strain *Lb. buchneri* RIBM 2-9 was selected. The strain that was able to produce toxicologically significant amounts of TYR in the frame of above mentioned preliminary screening (TYR 332,8±23,4 mg/l). BA and polyamines were analyzed by high performance liquid chromatography with UV detection after the precolumn dansyl chloride derivatization. The highest concentration of TYR was detected in supernatant after the cultivation at 30 °C in media with 2 % (v/v) ethanol and 5 mg/l bitter hop substances. In the case of the strain development in the real food matrix of beer, the tested strain can be able to endanger consumer health.

Keywords: biogenic amines, decarboxylation, *Lactobacillus buchneri*, beer.

Děkuji svému vedoucímu Ing. Evě Lorencové za odbornou pomoc, ochotu a věcné připomínky při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala laborantce Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za spolupráci a ochotu v laboratoři při měření praktické části.

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



# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ</b> .....                                    | <b>13</b> |
| 1.1 TVORBA BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH .....   | 13        |
| 1.2 BIOGENNÍ AMINY .....  | 15        |
| 1.2.1 Chemická struktura .....  | 15        |
| 1.2.2 Výskyt v potravinách .....  | 16        |
| 1.2.3 Fyziologické a toxikologické účinky biogenních aminů .....                          | 16        |
| 1.3 POLYAMINY .....   | 18        |
| 1.3.1 Chemická struktura .....  | 18        |
| 1.3.2 Výskyt v potravinách .....  | 19        |
| 1.3.3 Fyziologické a toxikologické účinky polyaminů .....                                 | 19        |
| <b>2 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY PŘÍTOMNÉ V PIVU</b> .....                                 | <b>21</b> |
| 2.1 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V SUROVINÁCH PRO VÝROBU<br>PIVA .....             | 22        |
| 2.2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V RÁMCI VÝROBNÍHO<br>PROCESU SLADU A PIVA ..... | 22        |
| 2.2.1 Výroba sladu .....  | 23        |
| 2.2.2 Vystírání a rmutování.....  | 25        |
| 2.2.3 Příprava a vaření mladiny .....   | 26        |
| 2.2.4 Kvašení a dokvašení piva.....   | 27        |
| 2.2.5 Konečné úpravy piva.....  | 29        |
| 2.3 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V PRŮBĚHU SKLADOVÁNÍ .....                                  | 30        |
| 2.4 MIKROBIÁLNÍ KONTAMINANTY PIVA .....   | 30        |
| 2.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST A AMINOGENNÍ AKTIVITU MIKROORGANISMŮ V<br>PIVU .....         | 32        |
| 2.5.1 Teplota prostředí .....   | 32        |
| 2.5.2 pH prostředí.....   | 33        |
| 2.5.3 Anaerobní podmínky.....   | 33        |
| 2.5.4 Koncentrace etanolu .....   | 34        |
| 2.5.5 Hořké chmelové látky .....  | 35        |
| 2.5.6 Přítomnost sacharidů .....  | 36        |
| 2.6 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ .....                                   | 36        |
| <b>3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ</b> .....  | <b>38</b> |
| 3.1 ROD <i>LACTOBACILLUS</i> .....  | 38        |
| 3.1.1 Taxonomie.....  | 38        |
| 3.1.2 Morfologie a růstové podmínky.....  | 39        |
| 3.1.3 Metabolismus laktobacilů — proces mléčné fermentace .....                           | 40        |
| 3.1.4 Cílená aplikace kultur laktobacilů v potravinách.....                               | 41        |
| 3.1.5 Nepříznivé projevy laktobacilů .....  | 42        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>44</b> |
| <b>4 CÍLE PRÁCE</b> .....   | <b>45</b> |
| <b>5 MATERIÁL</b> .....   | <b>46</b> |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 5.1      | POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....   | 46        |
| 5.2      | LABORATORNÍ MÉDIA A SLADINA.....  | 46        |
| <b>6</b> | <b>METODIKA .....</b>   | <b>48</b> |
| 6.1      | EXPERIMENT I.....   | 48        |
| 6.1.1    | Příprava dekarboxylačních médií v rámci Experimentu I.....                        | 49        |
| 6.1.2    | Odběr vzorků pro analýzu.....   | 50        |
| 6.2      | EXPERIMENT II.....  | 50        |
| 6.2.1    | Příprava dekarboxylačních médií v rámci Experimentu II.....                       | 51        |
| 6.2.2    | Odběr vzorků pro analýzu.....   | 52        |
| 6.2.3    | Růstové chování kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9.....                 | 52        |
| 6.3      | STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V EXPERIMENTU I A II.....                  | 53        |
| 6.4      | DOPLŇKOVÉ STANOVENÍ OBSAHU AMINOKYSELIN V DEKARBOXYLAČNÍCH<br>MÉDIÍCH .....       | 54        |
| <b>7</b> | <b>VÝSLEDKY.....</b>  | <b>55</b> |
| 7.1      | VÝSLEDKY EXPERIMENTU I.....   | 55        |
| 7.2      | VÝSLEDKY EXPERIMENTU II.....  | 61        |
| 7.2.1    | Růstové chování kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9.....                 | 61        |
| 7.2.2    | Vývoj pH kultivačního prostředí.....  | 62        |
| 7.2.3    | Kinetika produkce tyraminu kmenem <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM<br>2-9 ..... | 63        |
| <b>8</b> | <b>DISKUZE.....</b>   | <b>70</b> |
|          | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>74</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>   | <b>75</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>                                    | <b>85</b> |
|          | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>  | <b>86</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK.....</b>  | <b>88</b> |
|          | <b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>   | <b>89</b> |

## ÚVOD

V rámci technologické praxe při výrobě, zpracování a skladování potravin se klade důraz především na kvalitu, bezpečnost a zdravotní nezávadnost s cílem zaručit ochranu zdraví spotřebitelů. Nežádoucí látky mohou vznikat přímo v potravinách v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů. K těmto látkám se řadí i biogenní aminy, které jsou sice nezbytné pro řadu fyziologických pochodů v lidském organismu, nicméně jejich nadměrný příjem potravou je pro člověka toxický (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Silla-Santos, 1996, s. 223).

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací volných aminokyselin činností nativních či mikrobiálních enzymů, kterými disponuje jak kulturní, tak kontaminující mikroflóra. Tvorbu těchto látek lze tedy očekávat prakticky ve všech potravinách obsahující bílkoviny a volné aminokyseliny. Rizikovými jsou převážně potraviny fermentované, u kterých mohou být biogenní aminy tvořeny v toxikologicky závažných koncentracích (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 395-398; Marino et al., 2008, s. 540; Silla-Santos, 1996, s. 215-219).

Pivo je svým složením nepříznivé pro rozvoj mikroorganismů. Negativně působí nízké pH, nízký obsah O<sub>2</sub>, přítomnost CO<sub>2</sub>, hořkých látek a etanolu. Těmto vlivům odolává pouze malý počet rezistentních kmenů, mezi které náleží mléčné bakterie. Zástupci rodů např. *Lactobacillus* vynikají tolerancí vůči chmelovým hořkým látkám, a tudíž mohou v daném prostředí růst a množit se. Laktobacily jsou tedy nejobávanější kontaminací pivovarského procesu. Nicméně přítomnost laktobacilů při výrobě belgických piv vyráběné spontánním kvašením se nebere jako negativní jev (Basařová et al., 2010, s. 323-332; Spitaels et al., 2014, s. e95384).

Mezi hlavními producenty biogenních aminů v pivu se řadí právě laktobacily. Z důvodu přítomnosti biogenních aminů a etanolu může konzumace piva vést ke zdravotním problémům (Loret, Deloyer a Dandrifosse, 2005, s. 519-520).

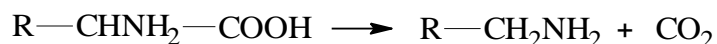
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANIZMŮ

## 1.1 Tvorba biogenních aminů v potravinách

Mikrobiální dekarboxylace aminokyselin patří k nejběžnějším způsobům syntézy biogenních aminů (BA) v potravinách (Marino et al., 2008, s. 540; Shalaby, 1996, s. 675).

Volné aminokyseliny, prekurzory BA jsou v potravinách buď přímo obsaženy, nebo jsou uvolňovány z proteinů autolytickou či bakteriální proteolýzou (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Syntéza BA pak probíhá odštěpením  $\alpha$ -karboxylové skupiny za vzniku příslušného aminu (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 395; Shalaby, 1996, s. 680), jak je názorně uvedeno na Obr. 1.



*Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin (upraveno dle Fadda, Vignolo a Oliver, 2001, s. 2015).*

Dekarboxylací vznikají pouze primární aminy: histamin, tryptamin, fenyletylamin, tyramin, kadaverin a putrescin (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31; Santos et al., 2003, s. 595). Mikroorganismy a rostliny mohou produkovat putrescin alternativní cestou z argininu přes agmatin (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 396). Z putrescinu činností enzymů spermidinsyntázy a sperminsyntázy vznikají polyaminy spermidin a spermin. K tomu je zapotřebí aminopropyl, který poskytuje S-adenosylmetionin (Kumar et al., 1997, s. 124-125; Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 88).

Na vzniku BA zmíněnou cestou (Obr. 1) se podílí enzymy, dekarboxylázy (EC 4.1.1.x). Původ těchto enzymů může být endogenní, tj. přirozeně se vyskytující v potravinách, nebo jak již bylo zmíněno, mohou pocházet z činnosti dekarboxyláza-pozitivními mikroflóry (Özogul a Özogul, 2007, s. 385). Tyto enzymy jsou specifické na L-formu aminokyselin a jejich zvýšenou aktivitu lze pozorovat zejména u bakterií (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31). Jedná se především o četné druhy hnilobných bakterií, ale také o zástupce bakterií mléčného kvašení (BMK) (Kalač, Švecová a Pelikánová, 2002, s. 349; Smělá et al., 2004, s. 432).

Mezi dekarboxyláza-pozitivními bakteriemi můžeme nalézt zástupce z rodů *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* a *Photobacterium*, rody z čeledi *Enterobacteriaceae* jako např. *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, rody z čeledi *Micrococcaceae*, jako je *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Kocuria* (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397).

Z BMK pak mohou být schopny aminogenní aktivity zástupci rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*, u kterých lze pozorovat schopnost dekarboxylace jedné či více aminokyselin (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397). Dekarboxylázová aktivita je považována za vlastnost, která je spíše kmenově závislá (Fernandez, Linares a Alvarez, 2004, s. 2521). Dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy mohou být buď součástí přirozené/startérové mikroflóry potravin anebo mohou být vneseny kontaminací před, během nebo po procesu výroby potravin (Bover-Cid et al., 2003, s. 477).

Bakteriální produkce aminů prostřednictvím dekarboxylace aminokyselin je závislá na mnoha faktorech. Mezi ně jednoznačně patří dostupnost aminokyselin (prekurzorů) v substrátu, přítomnost kmenů bakterií schopných produkce BA, příznivé podmínky pro jejich růst a jejich dekarboxylázovou aktivitu (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397; Marino et al., 2008, s. 540; Spano et al., 2010, s. 96). Dále je také aminogenní aktivita ovlivňována vnějšími činiteli, mezi které patří: teplota, pH prostředí, aero- a anaerobióza, oxidačně-redukční potenciál, zdroj uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, vodní aktivita ( $a_w$ ), koncentrace NaCl a etanolu, přítomnost sacharidů a fenolických sloučenin (Buňka et al., 2012, s. 213; Buňková et al., 2010, s. 5; Fernández et al., 2007, s. 1400). Takové faktory mají vliv na syntézu a aktivitu enzymů (Fernández et al., 2007, s. 1400).

Mimo jiné jsou BA produkty běžné metabolické aktivity rostlin a živočichů (Costantini et al., 2009, s. 10664; Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 395; Smělá, 2004, s. 432). V živých buňkách mají důležitou metabolickou roli (Lonvaud-Funel, 2001, s. 9). Pokud aminy vznikají působením živých organismů dekarboxylací aminokyselin, jsou označovány jako biogenní (Shalaby, 1996, s. 675).

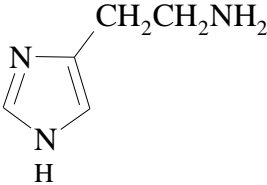
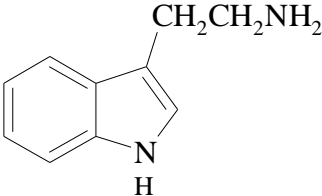
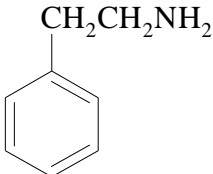
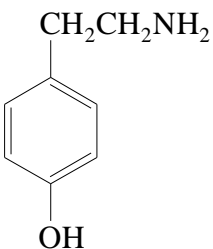
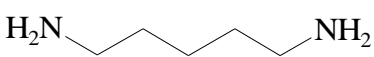
## 1.2 Biogenní aminy

Mezi BA se řadí histamin, tryptamin, fenyletylamin, tyramin a kadaverin (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70; Santos et al., 2003, s. 595). Kadaverin je již některými autory řazen mezi polyaminy (Lozanov, Petrov a Mitev, 2004, s. 201). Mnoho názvů BA je odvozeno z označení aminokyselin, ze kterých pochází. Například aminokyselina histidin je dekarboxylována na histamin, tryptofan na tryptamin, fenyletylalanin na fenyletylamin a tyrozin na BA tyramin (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 396; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71)

### 1.2.1 Chemická struktura

BA jsou nízkomolekulární dusíkaté organické báze vykazující biologickou aktivitu (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 395; Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 418). Prekurzory, chemická struktura a klasifikace BA je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Prekurzory, chemická struktura a klasifikace BA (upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).

| prekurzor   | biogenní amin | chemická struktura   | klasifikace                 |
|-------------|---------------|--|-----------------------------|
| histidin    | histamin      |  | heterocyklická,<br>monoamin |
| tryptofan   | tryptamin     |  | heterocyklická,<br>monoamin |
| fenylalanin | fenyletylamin |  | aromatická,<br>monoamin     |
| tyrozin     | tyramin       |  | aromatická,<br>monoamin     |
| lyzin       | kadaverin     |  | alifatická,<br>diamin       |

BA ve své molekule obsahují jednu nebo více aminoskupin (Cai et al., 2014, s. 9). Podle chemické struktury se dělí na alifatické, aromatické a heterocyklické (Izquierdo-Pulido et al., 1996, s. 3159).

### 1.2.2 Výskyt v potravinách

Celkové množství vytvořených BA závisí zejména na povaze potravin a přítomných mikroorganismů (Silla-Santos, 1996, s. 214).

BA jsou běžnou součástí potravinářských výrobků (Silla-Santos, 1996, s. 214). V potravinách jsou jednak přirozeně přítomny, jako součást buněčných struktur rostlin či živočichů, nebo také mohou vznikat v procesu výroby a skladování potravin jako výsledek metabolického působení mikroorganismů (Greif, Greifová a Karovičová, 2006, s. 21).

Vysoké hladiny BA můžeme pozorovat v potravinách, jako jsou např. ryby, výrobky z ryb, fermentované potraviny (maso, mléčné výrobky a zelenina), víno a pivo (Landete et al., 2007, s. 259; Spano et al., 2010, s. 95).

Přítomnost vyšších koncentrací BA v nefermentovaných potravinách slouží jako indikátory kažení (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 398; Spano et al., 2010, s. 96).

### 1.2.3 Fyziologické a toxikologické účinky biogenních aminů

V eukaryotických buňkách je biosyntéza BA nezbytná, jelikož fungují jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Některé BA plní funkce neurotransmiterů (Spano et al., 2010, s. 96).

V lidském těle jsou BA důležité z hlediska příjmu výživy, regulace tělesné teploty, snížení nebo zvýšení krevního tlaku (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70; Standarová et al., 2009, s. 189). Například histamin ovlivňuje krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy. Tyramin má vliv na kontrakci hladkého svalstva a také na krevní tlak. Tyramin může působit dokonce jako antioxidant. Antioxidační účinek je podmíněný amino i hydroxyskupinami a s koncentrací tyraminu narůstá (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 36-37).

V prokaryotických buňkách lze význam produkce spatřovat v obranném mechanismu proti překyselení buňky, kdy bakterie produkují bazické BA, aby alkalizovaly příliš kyselé růstové prostředí. Syntéza BA je také možný způsob získávání energie, především pro anaerobní mikroorganismy (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 396; Spano et al., 2010, s. 95-96).



Navzdory důležitým fyziologickým účinkům může konzumace potravin s vysokým množstvím BA způsobit nežádoucí zdravotní komplikace (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397; Kaláč, Hlavatá a Křížek, 1997, s. 209). Ve vysokých koncentracích se tyto látky chovají jako psychoaktivní a vazoaktivní (Choi et al., 2012, s. 767). Psychoaktivní aminy ovlivňují centrální nervový systém působením na neurotransmitery a vazoaktivní aminy působí na cévní systém (Shalaby, 1996, s. 676). Za nejvíce toxické jsou považovány aromatické aminy: histamin a tyramin. (Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 365; Tang et al., 2009, s. 507).

Histamin způsobuje nejčastěji alimentární intoxikace (Juneja a Sofos, 2010, s. 260). Farmakologické účinky se projevují vazbou na receptory buněčných membrán, které se nacházejí v kardiovaskulárním systému a v různých sekrečních žlázách (Shalaby, 1996, s. 676). Mezi příznaky patří: bolesti hlavy, nízký krevní tlak, bušení srdce, otoky, zvracení a průjem (Landete et al., 2007, s. 259).

Za nejúčinnější vazoaktivní BA je považován tyramin (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 39). Jeho účinek spočívá v nepřímém uvolňování noradrenalinu od sympatického nervového systému, který způsobuje zvýšení krevního tlaku, a tím i zvýšení srdečního výkonu (Shalaby, 1996, s. 678). Symptomy hypertenzní krize se projevují silnou bolestí hlavy, bušením srdce, nevolností, pocením, zmateností, ztuhlostí krku, nebo v krajním případě mohou vyvrcholit mrtvicí (Juneja a Sofos, 2010, s. 263). Dále tyramin rozšiřuje zorničky, způsobuje zvýšené slinění, slzení, dýchání a podporuje nárůst obsahu cukru v krvi (Shalaby, 1996, s. 676-678).

Nařízení Komise (ES) 2073/2005 stanovuje limit pro histamin v rybách a produktů rybolovu z druhů ryb (zejména druhy ryb čeledí *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) do 200 mg/kg (Evropská unie, 2005). U ostatních potravin byly maximální limity pouze doporučeny nebo navrženy. Například je pokládáno za bezpečné množství 2 mg histaminu na litr alkoholického nápoje. Obecně platí, že v alkoholických nápojích se za toxickou dávku považuje množství 8-20 mg/l pro histamin a 25-40 mg/l pro tyramin (Spano et al., 2010, s. 97).

Maximální přípustná úroveň histaminu a tyraminu v potravinách by měla být v rozmezí 50-100 mg/kg a 100-800 mg/kg. Množství více než 1080 mg/kg tyraminu je považováno za toxické (Kerry a Kerry, 2011, s. 485; Silla-Santos, 1996, s. 224).

Určení přesného prahu toxicity BA je velmi obtížné, neboť toxická dávka je silně závislá na detoxikačních mechanismech každého jednotlivce a přítomnosti jiných aminů (Silla-Santos, 1996, s. 224).

Nižší koncentrace BA přijaté stravou mohou být lidským organismem bez problémů metabolizovány, jsou-li účinné detoxikační mechanismy, které se nachází ve střevním traktu (Silla-Santos, 1996, s. 223).

Hlavní roli v detoxikačním systému mají enzymy monoaminoxidázy (MAO) a diaminoxidázy (DAO). Principem je degradace BA na fyziologicky méně aktivní formu (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397).

Nadměrný příjem BA v potravinách však zatíží detoxikační systém natolik, že pak není schopen dostatečně rychle tyto látky degradovat a jsou hromaděny v těle. K této situaci dochází i v případě alergií, při nedostatečné aktivitě MAO a DAO, u lidí se zažívacími problémy a u pacientů užívajících léky s účinkem inhibitorů MAO a DAO. (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 72; Silla-Santos, 1996, s. 223-224). Jako inhibitor enzymů MAO působí také etanol, který tímto snižuje účinnost detoxikačního systému (Buiatti et al., 1995, s. 199; Lonvaud-Funel, 2001, s. 9).

### 1.3 Polyaminy

Polyaminy byly dříve řazeny mezi BA, ale od roku 1990 byly klasifikovány jako samostatná skupina na základě svého specifického fyziologického významu a tvorby alternativní metabolickou cestou (Dračková et al., 2009, s. 121; Komprda et al., 2008, s. 29). Mezi polyaminy se řadí putrescin, spermidin, spermin a případně agmatin (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87; Özdestan a Üren, 2010, s. 101).

#### 1.3.1 Chemická struktura

Polyaminy jsou alifatické molekuly s aminoskupinami, které jsou přítomné ve všech buňkách organismu. Nejdůležitějším místem výskytu polyaminů je však cytoplazma a jádro, kde se zapojují do procesu transkripce a translace (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87). Polyaminy jsou látky ve vodě rozpustné a díky tomu mohou tvořit vodíkové můstky s molekulami rozpouštědel (vody a alkoholů) (Kumar et al., 1997, s. 124; Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87).

Prekurzory, chemická struktura a klasifikace polyaminů je uvedena v Tab. 2.

Tab. 2: Prekurzory, chemická struktura a klasifikace polyaminů (upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).

| prekurzor                       | polyamin  | chemická struktura   | klasifikace             |
|---------------------------------|-----------|--|-------------------------|
| ornitin,<br>arginin,<br>agmatin | putrescin | $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$   | alifatická,<br>diamin   |
| putrescin,<br>spermin           | spermidin | $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$                                   | alifatická,<br>polyamin |
| putrescin,<br>spermidin         | spermin   | $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ | alifatická,<br>polyamin |

### 1.3.2 Výskyt v potravinách

Jedním ze tří možných zdrojů polyaminů jsou právě potraviny. Kromě potravin se polyaminy tvoří přímo v lidském těle v důsledku dekarboxylázové aktivity střevní mikroflóry anebo intracelulární *de novo* syntézy. Na této syntéze se účastní několik enzymů, z nichž nejvýznamnější je enzym ornitindekarboxyláza (Gugliucci, 2004, s. 25; Pinto a Ferreira, 2015, s. 440; Plaza-Zamora et al., 2013, s. 524).

Polyaminy se nacházejí nejen v potravinách rostlinného původu: ovoce a zelenina, ale i živočišného původu: mléko, vejce, maso a ryby (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 92). Vyšší obsah spermidinu ve srovnání se sperminem je typický pro potraviny rostlinného původu. U potravin živočišného původu je tomu naopak (Dračková et al., 2009, s. 121).

Zatímco obsah putrescinu se zvyšuje činností mikroorganismů během nevhodného skladování a výroby potravin živočišného původu, polyamin spermidin a spermin pocházejí zejména ze vstupních surovin, jako jsou např. obiloviny, brambory, ovoce a zelenina, dále pak čerstvé maso (Dračková et al., 2009, s. 121; Krausová et al., 2008, s. 1008).

### 1.3.3 Fyziologické a toxikologické účinky polyaminů

Polyaminy hrají důležitou roli ve fyziologii savců, jako je buněčná proliferace a diferenciace (Özdestan a Üren, 2010, s. 101).

Fyziologická funkce souvisí se specifickou strukturou polyaminů, konkrétně na velikosti pozitivního elektrického náboje na primárních a sekundárních aminoskupinách molekuly. (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87; Linsalata a Ruso, 2008, s. 383). Náboj se tvoří protonizací aminoskupin molekul při fyziologickém pH (Kumar et al., 1997, s. 124; Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87). Díky tomu mohou polyaminy působit jako vícelaterální ligandy. Tato skutečnost umožňuje polyaminům interagovat s negativně nabitými složkami. Z toho vyplývá, že v regulaci různých biologických procesů se za nejvíce účinný polyamin jeví spermin a naopak nejméně putrescin (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87; Linsalata a Ruso, 2008, s. 383). Polyaminy slouží jako elektrostatické mosty např. mezi negativními fosfáty nukleových kyselin, a tím se tedy polyaminy podílí na jejich regulaci (Önal, 2007, s. 1476-1477; Shah a Swiatlo, 2008, s. 4).

Dále se polyaminy podílí na stabilizaci membrán a syntéze bílkovin, jelikož mohou být vázány na struktury membrán, jako jsou fosfolipidy zejména v erythrocytech (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87; Önal, 2007, s. 1476-1477).

Putrescin, spermidin a spermin inhibují oxidaci polyenových mastných kyselin a tento účinek koreluje s počtem aminoskupin. Kadaverin a putrescin stabilizují biologicky významné makromolekuly (nukleové kyseliny), subcelulární struktury (ribozomy) a dále stimuluji buněčné dělení (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 36-37). Spermidin a spermin mají také podíl na vývoji střevní tkáně (Silla-Santos, 1996, s. 222).

V rostlinách se putrescin, spermidin a spermin účastní na dělení buněk, kvetení, vývoji plodu, reakce na stres a stárnutí (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 418).

Kromě mnoha prospěšných účinků bylo prokázáno, že hladina polyaminů v buňkách je také spojována s nemocemi, jako je např. rakovina (Buyukuslu et al., 2014, s. 541). Detoxikačním mechanismem jsou polyaminy nejprve acetylovány a následně oxidovány DAO nebo polyaminoxidázy (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 72).

Kromě samotného působení nadbytku, mohou sekundární aminy, jako je putrescin a kadaverin reagovat s dusitanem za vzniku karcinogenních nitrosaminů (Spano et al., 2010, s. 96).

Putrescin a kadaverin může zvýšit negativní účinek jiných aminů a zesílit projevy intoxikace (Costantini et al., 2009, s. 10664; Tang et al., 2009, s. 507).

## 2 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY PŘÍTOMNÉ V PIVU

Přítomnost BA a polyaminů v alkoholických nápojích je důležitá z toxikologických důvodů. Vysoká množství těchto sloučenin (8-20 mg/l histaminu a 25-40 mg/l tyraminu) mohou vést ke zdravotním problémům. Jejich nadměrný příjem je obvykle způsoben velkou spotřebou piva během krátkého časového úseku (Kalač a Křížek, 2003, s. 123; Spano et al., 2010, s. 97). Roční statistická spotřeba piva přesahuje v několika zemích (Česká republika, Irsko, Rakousko, Německo, Belgie) 100 l na osobu (Colen a Swinnen, 2011, s. 7; Kalač a Křížek, 2003, s. 123).

U pacientů, kteří byli léčeni léky blokujícími MAO (užívané hlavně v psychiatrii) byla po konzumaci piva pozorována hypertenzní krize. Pro tyto pacienty je považován za nebezpečný příjem >6 mg tyraminu během 4 hodin nebo konzumace piva s obsahem tyraminu >10 mg/l. Alkohol a přítomnost dalších BA v pivu mohou umocňovat účinky tyraminu (Kalač a Křížek, 2003, s. 124). Nicméně u zdravých jedinců nepředstavuje riziko množství <10 mg/l. Konzumace piva s vyšším obsahem tyraminu může vyvolat bolesti hlavy u lidí náchylných k migrénám (Kalač a Křížek, 2003, s. 124).

Výskyt jednotlivých aminů v pivu je závislý na použitých surovinách, na způsobu vaření piva a jeho úpravách. K mikrobiální kontaminaci dekarboxyláza-pozitivní mikroflórou může dojít během procesu vaření nebo skladování. Polyaminy jsou v pivu považovány za přirozeně přítomné složky (Kalač a Křížek, 2003, s. 123-124).

Nejčastěji se v pivu vyskytuje histamin, fenyletylamin, tyramin a putrescin (Tang et al., 2009, s. 507). Tyramin je považován za nejhojněji zastoupený BA v pivu. Vyšší hladiny histaminu a tyraminu byly pozorovány u piv s vyšší kyselostí, která jsou vhodná pro činnost BMK. Nejvyšší úroveň histaminu, tryptaminu, fenyletylaminu a tyraminu byla zaznamenána u spontánně kvašených belgických a svrchně kvašených piv. Tyto druhy piva představují nejvyšší toxikologické riziko u pacientů léčených inhibitory MAO (Kalač a Křížek, 2003, s. 124-125).

Byl navržen bezpečnostní limit pro příjem BA pivem na 20 mg/l pro součet: histamin + fenyletylamin + tyramin + kadaverin (Kalač a Křížek, 2003, s. 124-125).

## 2.1 Výskyt biogenních aminů a polyaminů v surovinách pro výrobu piva

Mezi suroviny pro výrobu piva patří slad, chmel, voda a pivovarské kvasnice (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 169-170).

V ječmeni pro výrobu sladu byl detekován tyramin, putrescin, spermidin, spermin a agmatin (Gloria a Izquierdo-Pulido, 1999, s. 130; Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 401-402).

Ječný slad je hlavním zdrojem putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 402; Kalač a Křížek, 2003, s. 125). Na hladinu zmíněných aminů měla ve studii Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 423) významný vliv kvalita a odrůda sladu. Autoři Izquierdo-Pulido, Vidal-Carou a Marine-Font (1993, s. 1027-1032) uvádí obsah putrescinu v ječném sladu přibližně 40 mg/kg. Kalač, Hlavatá a Křížek (1997, s. 212) však detekovali vyšší obsah putrescinu v rozmezí 61-84 mg/kg. Tito autoři dále uvádí, že slad obsahoval poměrně vysoká množství histaminu 7-17 mg/kg a tyraminu 20-24 mg/kg (Kalač, Hlavatá a Křížka, 1997, s. 212).

Podle Kalače a Křížka (2003, s. 125) se v chmelu vyskytuje putrescin spermidin, spermin a agmatin v nižších koncentracích než ve sladu a kvasnicích. Nicméně Ercan, Bozkurt a Soysal (2013, s. 402) tvrdí, že chmel obsahoval relativně vysoké hladiny fenyletylaminu tyraminu, putrescinu, spermidin sperminu a agmatinu. Dle výsledků autorů Kalače, Hlavaté a Křížka (1997, s. 212) jsou vyšší koncentrace histaminu (53 mg/kg) a tyraminu (228 mg/kg) v extraktu chmelu než v sušeném chmelu a chmelových granulích. V sušeném chmelu byly detekovány hodnoty histaminu 5-7 mg/kg a tyraminu 12-16 mg/kg. V chmelových granulích byly obsahy histaminu (4-8 mg/kg) a tyraminu (10-13 mg/kg) obdobné. Cerutti et al. (1985, s. 296-299) však v extraktu chmelu přítomnost BA a polyaminů nedetekovali vůbec.

Za surovinu používanou při výrobě piva, která neobsahuje žádné aminy, je považována voda (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

## 2.2 Produkce biogenních aminů a polyaminů v rámci výrobního procesu sladu a piva

Výrobu piva lze rozdělit na čtyři etapy: sladování, rmutování, kvašení, dokvašení a konečné úpravy. Přičemž každá z etap nese určité riziko mikrobiální kontaminace (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 169-170).

### 2.2.1 Výroba sladu

Hlavní obilovina používaná při výrobě sladu je ječmen. Na povrchu zrna jsou slupky, které poskytují ochranu při skladování či přepravě a také působí jako pomůcka při filtraci během separace mladiny. Mezi další výhody ječmene patří nižší teplota mazovatění ječného škrobu vzhledem k ostatním obilovinám, čímž je zachována aktivita důležitých enzymů, které jsou využívány v procesu přípravy sladiny (Adams a Moss, 2008, s. 349).

Proces sladování zahrnuje tři kroky: máčení, klíčení a hvozďení. Primárním cílem je vyrobit enzymaticky aktivní slad. Z mikrobiologického hlediska je nejdůležitějším krokem máčení, které poskytuje ideální podmínky pro růst mikrobů (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170).

Máčení je řízený proces, jehož cílem je zvýšit obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna, odstranit splavky a lehké nečistoty, umýt zrna a ze zrna vylouhovat nežádoucí látky. Máčení je dnes považováno za nejdůležitější úsek výroby sladu, který rozhoduje o jeho budoucí kvalitě (Kosař a Procházka, 2003 s. 55). Při máčení se ječmen ponořuje do studené vody (10-20 °C po dobu 2-3 dnů), což vede k nárůstu vlhkosti na 45-50 % (w/w). Během doby máčení se mění mikroflóra. Aktivují se mikroorganismy, jejichž počet je téměř vždy vyšší v konečném sladu, než ve výchozím ječmeni (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170).

Cílem klíčení je aktivace a syntéza enzymů za účelem docílení požadovaného rozluštění (vnitřní přeměny) zrna. Činností enzymů ve vodném prostředí dojde k odbourání rezervních vysokomolekulárních látek na rozpustné nízkomolekulární, které jsou spotřebovány pro výživu zárodku a pro výstavbu nových buněk tzv. kořínek a klíčků (střelka). Mezi enzymy podílející se na klíčení patří především  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylázy, proteázy, hemicelulázy atd. Mezi základní parametry ovlivňující průběh klíčení zrna patří: vlastnosti zpracovávané suroviny, obsah vody v klíčících zrnech, obsah  $O_2$  a  $CO_2$  v hromadě, teplota a délka klíčení (Kosař a Procházka, 2003 s. 61-65).

Kalač a Křížek ve své studii uvádí, že při pětidenním klíčení se pomalu zvyšovala hladina histaminu, tryptaminu, fenyletylaminu a kadaverinu. Nicméně obsah putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu se navyšoval o 3-5,5 mg/kg za den. Nárůst tyraminu byl však nižší (Kalač a Křížek, 2003, s. 125). Někteří autoři uvádí hladinu histaminu ve sladu v rozmezí 1-2 mg/kg (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 423). Nicméně Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 423) tvrdí, že histamin ve sladu z ječmene nepochází, nýbrž je

výsledkem dekarboxylázové aktivity mikrobiální kontaminace. Obsah vody a přítomnost substrátů může být kromě rozluštění endospermu ječmene, také příčinou rozvoje mikroflóry.

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu. Zelený slad je na hvozdě nejprve předsušen při teplotách do 60 °C, následně pak vyhřát a dotažen při teplotách 80-105 °C. Cílem hvozdění je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu. Dále zastavit životní a luštící pochody v zrně, vytvořit aromatické a barevné látky. Z hlediska chemických a biochemických změn lze rozlišit tři fáze: růstová, enzymatická a chemická. Při hvozdění dochází k fyzikálním (snížení obsahu vody) a chemickým změnám (melanoidiny) zrna (Kosař a Procházka, 2003 s. 72-73).

Slad představuje z mikrobiálního hlediska největší hrozbu. Může být napaden různými druhy plísní, jako je např. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* a *Rhizopus*. Ty mohou způsobit produkci metabolitů vyvolávajících pachutě piva, případně produkcí mykotoxinů ohrozit jeho zdravotní bezpečnost (Briggs et al., 2004, s. 608). Mikrobiální populace sladu je odhadem 2000x větší než mikroflóra ječmene (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170-171). Autoři Jaykus, Wang a Schlesinger, (2009, s. 170-171) uvedli, že v jednom případě došlo ke zvýšení počtu BMK z 40 CFU/g sladu na více než 10<sup>8</sup> CFU/g.

Relativně nový nástroj pro potlačení mikroflóry při sladování je použití startovací kultury v průběhu máčení. Pro tento účel slouží řada mikroorganismů jako například *Geotrichum candidum*, *Pichia anomala*, *Lactobacillus plantarum* a *Pediococcus pentosaceus*. Přídavek *Lactobacillus plantarum* a *Pediococcus pentosacens* zlepšuje filtrovatelnost mladiny. Tato kultura inhibuje růst toxikogenní plísně *Fusarium*. Také se podílí na podpoře nárůstu kvasinek v průběhu sladování poklesem konkurenční mikroflóry (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170-171).

Jaykus, Wang a Schlesinger (2009, s. 170-171) dále uvádí, že nárůst kvasinek a BMK vede ke zvýšení produkce glukonázy a xylanázy, které se účastní hydrolýzy buněčných stěn sladu. Následkem toho má pak finální produkt lepší kvalitu (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170-171).

Vliv na kumulaci BA ve sladu tedy mají podmínky sladování, odrůda ječmene, intenzita jeho klíčení a teplota hvozdění (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).



### 2.2.2 Vystírání a rmutování

Cílem rmutování je převedení žádoucích složek extraktu surovin do roztoku. Menší část extraktu je přímo rozpustná a vylouhuje se do vody pouhým mícháním a zvýšením teploty. Zatímco větší část vysokomolekulárních látek endospermu je převedena do roztoku až po jejich rozštěpení působením sladových enzymů. Díky rmutování tak pokračují některé biochemické děje, které byly započaty při klíčení sladu. Základním požadavkem všech rmutovacích postupů je převedení veškerého škrobu i vhodného podílu bílkovin a dalších látek do roztoku. Naopak přítomnost jiných složek se snažíme omezit. Účinek hydrolyzujících enzymů je závislý především na teplotě, pH a době působení (Kosař a Procházka, 2003 s. 134). Optimální hodnota pH pro rmutování pohybuje mezi 5,2-5,4 (Adams a Moss, 2008, s. 76).

Postup přípravy vystírky je, že je rozšrotovaný sladový ječmen smíchán s vodou. Dále je vystírka rmutována infuzním či dekokčním způsobem (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170). Klasický dvourmutový postup je vhodný pro výrobu světlých piv plzeňského typu (Kosař a Procházka, 2003 s. 144). Pomalý ohřev umožňuje enzymům působit při jich optimální teplotě (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170).

Štěpení škrobu probíhá ve třech stupních: mazovatění, ztekucení a zcukření. Nejvíce maltózy vzniká při nižší cukrotvorné teplotě 62-64 °C, což je optimální teplota pro působení  $\beta$ -amylázy (Kosař a Procházka, 2003 s. 134-137). Termostabilnější je  $\alpha$ -amyláza, jejíž teplotní optimum je 72-75 °C (Adams a Moss, 2008, s. 54; Kosař a Procházka, 2003 s. 134-137). Teplota odrmutování (76-78 °C) se volí tak, aby zbytková aktivita  $\alpha$ -amylázy postačovala ke spolehlivému „docukření“ zbytků škrobu uvolněných při vyslazování mláta. Pro štěpení dusíkatých látek je významná teplota mezi 40-60 °C. Tvorba aminokyselin je podpořena při teplotách 45-50 °C. Vysokomolekulární dusíkaté látky zvyšují pěnovost, podporují plnost chuti, zlepšují vazbu CO<sub>2</sub>, nicméně zhoršují trvanlivost piva. Na druhé straně je dostatečné množství volného aminodusíku důležité pro výživu kvasnic a rychlý průběh kvašení. Štěpení podléhají i další látky: hemicelulózy, gumovité látky, lipidy a fosforečnany. Přirozenou kyselost vystírky a sladiny tvoří fosforečnany draselné a aminokyseliny pocházející ze sladu. Vystírka má hodnotu pH 5,7-5,8 (Kosař a Procházka, 2003 s. 134-137).

Dle výsledků autorů Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 423) byla hladina histaminu během rmutování snižována. Během rmutování se snížilo také množství putrescinu a agmatinu (Kalač a Křížek, 2003, s. 125). Roli zde mohla sehrát termolabilita těchto sloučenin.

Obecně lze sice konstatovat, že k nejvyššímu nárůstu obsahu BA dochází během sladování a menších změn v průběhu rmutování (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 423). Ale i tento proces je z hlediska budoucí kumulace BA velmi významný. V rámci rmutování se totiž do roztoku dostávají látky, které by mohly posloužit jako substráty nejen záměrně očkované mikroflóry (kvasinkám), ale také non-startérům a kontaminantům, které mohou být schopny produkce BA.

### 2.2.3 Příprava a vaření mladiny

Po procesu rmutování je získána hustá suspenze mláta ve vodném roztoku extraktivních látek, tj. ve sladině. Tyto složky je třeba při scezování co nejdokonaleji oddělit. V první fázi scezování se za využití filtrační vrstvy mláta oddělí hlavní podíl sladiny tzv. předek, ve druhé fázi se mláto promyje horkou vodou, čímž se získají výstřelky (Kosař a Procházka, 2003 s. 136).

Při teplotě 75 °C se sladina vaří s chmelem a vytváří se sterilní prostředí obsahující antimikrobiální chmelové kyseliny (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170). Během vaření se vysráží bílkoviny s polyfenoly (Adams a Moss, 2008, s. 63). Výsledným produktem chmelovaru je mladina. Při chmelovaru dochází k fyzikálně-chemickým změnám stabilizující koncentraci a složení mladiny. Hořké látky jsou účinnou složkou chmele. Jejich rozpouštění ve vroucí mladině je významně ovlivněno hodnotou pH (Kosař a Procházka, 2003 s. 161).

Přítomnost histaminu, tyraminu a kadaverinu obvykle poukazuje na činnost kontaminujících BMK i v průběhu vaření piva (Kalač a Křížek, 2003, s. 123-124). Významným ukazatelem mikrobiální kontaminace v tomto procesu je histamin (Jiuxiao et al., 2014, s. 9). Mikrobiální integrita procesu je závislá na dodržování správné hygienické praxe (Briggs et al., 2004, s. 607). Růst mikroflóry produkující BA významně ovlivňují hořké látky, které se stávají rozpustnými právě při procesu chmelení (Briggs et al., 2004, s. 623; Suzuki et al., 2006, s. 173-175).

#### 2.2.4 Kvašení a dokvašení piva

Cílem kvašení piva je řízená přeměna sacharidů na etanol a CO<sub>2</sub> za současného vytváření odpovídajících sensorických vlastností piva. Tvoří se chuťový charakter piva, který je ovlivněn nejen hlavními produkty kvašení, ale i vedlejšími, tj. obsah vyšších alkoholů, esterů, ketonů, aldehydů a sloučenin síry (Doyle a Buchanan, 2013, s. 906; Kosař a Procházka, 2003 s. 199).

Při výrobě svrchně kvašených piv je zákvasná teplota 15-18 °C (někdy i více), maximální teplota kvašení je 25-28 °C. Pro výrobu piva typů „ale“, „porter“, „stout“ a piva pšeničná (z pšeničného sladu) se uplatňují kmeny svrchních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Někdy se druhá část dokvašování uskutečňuje v lahvích (Kosař a Procházka, 2003 s. 191 a 213).

Při výrobě spodně kvašených piv se před kvašením horká mladina dochlazuje na zákvasnou teplotu 6-9 °C. Zchlazená mladina se provzdušňuje, čímž se podpoří rozmnožování kvasinek po zakvašení. Pro výrobu piva plzeňského typu se využívají kmeny spodních kvasinek *Saccharomyces pastorianus*. Tyto kvasinky na konci kvašení sedimentují na dno fermentační nádoby (Kosař a Procházka, 2003 s. 191, 199-200).

Kvašení piva při klasickém postupu výroby probíhá v tzv. spilkách. Místnost musí být větrána tak, aby se v ní nehromadil CO<sub>2</sub>. Celý prostor spilky se chladí. Celková doba hlavního kvašení je obvykle 6-10 dní a probíhá v několika stádiích za anaerobních podmínek. Při kvašení je snižována hodnota pH mladiny z 5,0-5,6 na 4,6-4,3 v důsledku změn v jejím složení. Změny složení mladiny jsou uskutečňovány přeměnou extraktu na etanol a CO<sub>2</sub>, dále tvorbou sensoricky aktivních látek, změnou oxidačně-redukčních vlastností atd. S posunem pH souvisí změny rozpustnosti některých složek extraktu mladiny, které se vylučují z roztoku. Jedná se zejména o tříslovino-bílkovinné komplexy a hořké látky. Tento pokles hraje významnou roli v mikrobiologické stabilitě piva, rychlosti zrání piva, chuťové a koloidní stabilitě (Kosař a Procházka, 2003 s. 191-210).

Výsledkem kvašení je tzv. zelené pivo obsahující nežádoucí vedlejší produkty (např. acetaldehyd a diacetyl) převážně vzniklé metabolickou aktivitou kvasinek. Tyto produkty mají značný vliv na aroma piva, a proto by měl být jejich obsah minimalizován (Doyle a Buchanan, 2013, s. 907). Vedlejší produkty (zejména diacetyl) se tvoří při pozdějším nebo opakovaném provzdušňováním, a tudíž nejsou takové operace z hlediska tvorby nežádoucích látek doporučovány. Aldehydy vznikají na začátku kvašení, později jsou však

odbourávány. V metabolismu kvasinek vzniká 2-acetolaktát, který je spontánní extracelulární dekarboxylací přeměňován na diacetyl. Později je enzymatickou cestou redukován na acetoin a 2,3-butandiol. Tvorbu 2-acetolaktátu omezí hodnota pH piva pod 4,6. Diacetyl je také produkován některými kmeny kontaminujících BMK. V případě kontaminace může tedy během dokvašení obsah diacetylu narůstat (Kosař a Procházka, 2003 s. 197-200). Rozvoj kontaminující mikroflóry však může být inhibován vzniklým etanolem (Briggs et al., 2004, s. 607).

Je doloženo, že během hlavního kvašení je produkován zvláště histamin, tyramin a kadaverin (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 402; Kalač a Křížek, 2003, s. 125). Ve studii Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 423) byl pozorován výrazný pokles putrescinu, agmatinu a mírný nárůst kadaverinu během fermentace, který mohl být způsoben autolýzou kvasinek. Důsledkem tohoto procesu je nárůst obsahu aminodusíku a pH (Kosař a Procházka, 2003 s. 191). O výskytu a pomnožování mikroorganismů v jednotlivých místech výroby rozhodují kultivační podmínky, neboť se postupně mění složení půdy činností kulturních kvasinek. Po kvašení klesá obsah O<sub>2</sub> a hodnota pH, což může podpořit mléčné bakterie, protože kvasinky vylučují do mladiny růstové faktory, zejména vitaminy, dusíkaté báze, aminokyseliny apod. I spektrum aminokyselin se mění, také podle jejich specifického využívání kvasinkami. Současně s poklesem O<sub>2</sub> se mění spektrum cizích kvasinek od aerobních k fakultativně anaerobním druhům. V podstatě stejný trend, který je možné pozorovat v rámci hlavního kvašení, se taktéž projevuje při dokvašování piva (Basařová et al., 2010, s. 329).

Mezi bakterie, které se mohou účastnit fermentace piva, patří zástupci rodu *Pediococcus* a *Lactobacillus*. Mezi aminogenní BMK podílející se na kažení piva náleží hlavně zástupci rodů *Lactobacillus frigidus*, *Lb. brevissimilis* a *Lb. brevis* (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

Cílem dokvašování piva je vytvoření optimálních organoleptických vlastností, nasycení CO<sub>2</sub> a vyčiření. Dokvašení probíhá v ležáckých sklepích při teplotě -2 až +3 °C. Jako ležácké nádoby se používají klasické dřevěné sudy a moderní ležácké tanky (Kosař a Procházka, 2003 s. 203).

V současnosti je nejpoužívanějším způsobem výroby piva v cylindrickónických tancích (CKT). Výhodou je jednoduchá automatizace kvasného procesu, možnost kvalitní sanitace výrobního zařízení atd. (Kosař a Procházka, 2003, s. 204). Nádoby jsou uzavřeny, čímž se sníží riziko kontaminace (Doyle a Buchanan, 2013, s. 906).

Kvasnice aglutinují a sedimentují na dně CKT. Pro další použití kvasnic tzv. nasazení je optimální okamžité zakvášení do další výrobní šarže. Opakované nasazování kvasnic sebraných z předchozí várky se označuje jako recyklace kvasinek. Kvasinky však mohou být recyklovány maximálně třikrát. Větší počet pak přináší riziko kontaminace, degenerace kvasinek a zhoršení fyziologického stavu, který může ovlivnit technologii a kvalitu produktu (Kosař a Procházka, 2003 s. 212-213).

Při zhoršeném mikrobiologickém stavu kvasnic se provádí kyselé praní za použití roztoků anorganických nebo organických kyselin (např. kyselina fosforečná a mléčná). Využívá se při něm vysoká odolnost kvasnic vůči nízkému pH (Kosař a Procházka, 2003 s. 212-213). Tento proces významně snižuje kontaminace, např. promývání kvasnic kyselinou fosforečnou snižuje počet pediokoků (Kalač a Křížek, 2003, s. 126; Kosař a Procházka, 2003 s. 212-213). Po kyselém praní se však zhoršuje fyziologický stav pivovarských kvasnic. (Kosař a Procházka, 2003 s. 212-213).

### 2.2.5 Konečné úpravy piva

Mezi konečné úpravy piva patří filtrace nebo pasterace (Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170). Filtrací se oddělují zákalotvorné částice, zbylé kvasničné buňky a snižuje se obsah bakterií (Kosař a Procházka, 2003 s. 221). Mikroorganismy, které se pomnožily již v rané fázi výroby piva, mohou tento proces negativně ovlivňovat. Po separaci kvasnic běžnou filtrací se v pivu mohou pomnožovat BMK (Basařová et al., 2010, s. 329).

Pasterace je tepelné ošetření piva za účelem zvýšení jeho trvanlivosti. Účinnost se vyjadřuje v pasteračních jednotkách PJ. Využívají se buď průtokové nebo tunelové pastéry (Adams a Moss, 2008, s. 75; Kosař a Procházka, 2003 s. 260-262). Při krátkodobém ohřevu stačí k inaktivaci škodlivých mikroorganismů již 10 PJ. Z důvodů jistoty a pro poněkud tepelně tolerantnější askospory divokých kvasinek i pro necitlivé opouzdřující druhy (např. *Lb. frigidus*) se obvykle používá 30 PJ (Kosař a Procházka, 2003, s. 219). Pasteraci mohou přežít vysoce tepelně odolné kmeny mléčných bakterií (Basařová et al., 2010, s. 329-330). Každý způsob tepelného ošetření zvyšuje riziko chuťových změn. Proto se upřednostňuje způsob konzervace za studena, tj. odstranění všech mikroorganismů bez změny teploty piva (speciální filtrační desky, membrány).

Při výrobě piva je nutné dbát na dodržování všech zásad hygieny a sanitace. Sanitace výrobních zařízení a prostor pomáhá snižovat obsah BA v pivu (Kalač a Křížek, 2003, s. 126; Kosař a Procházka, 2003 s. 238).

Nedostatečně vyčištěné technologické zařízení dává mikroorganismům možnost přežít, kdy zbytky nečistot je chrání před přímým kontaktem s dezinfekčním prostředkem. Účinnost prostředku může být snížena jeho reakcí s nečistotou a nedodržením optimálních podmínek, tj. koncentrace, teploty, doby působení a pH roztoku pro danou chemickou látku. K přežití mikroorganismů také dochází při nevyhřátí všech částí technologického zařízení během dezinfekce teplotou (Kosař a Procházka, 2003, s. 228).

### 2.3 Produkce biogenních aminů v průběhu skladování

Jak již bylo zmíněno, produkce BA mohou být schopny i BMK. Produkci BA těmito mikroorganismy lze sledovat během skladování piva v lahvích, plechovkách nebo sudech před spotřebou. Produkce tyraminu a v menší míře histaminu bakteriemi *Lactobacillus* spp. nebo *Pediococcus* spp. byla pozorována u pasterovaných piv, které byly skladovány při teplotě 28 °C do tvorby zákalu. Přičemž laktobacily vykazovaly efektivnější aminogenní aktivitu (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

Celková koncentrace BA lahvového piva může být, jak již naznačuje kapitola 3.2, ovlivněna pivovarskou technologií (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 423).

Optimální teplota skladování je zhruba 5-10 °C, u sudového piva lze tolerovat až 15 °C. Prostor pro skladování sudového piva by měl být chlazený, větratelný, suchý, bez plísní a všech zápachů (Kosař a Procházka, 2003, s. 304). Ačkoliv je optimální teplota růstu laktobacilů 20-30 °C, vyskytují se i psychofilní druhy (Basařová et al., 2010, s. 323).

### 2.4 Mikrobiální kontaminanty piva

Pivo je považováno za nápoj s vysokou mikrobiální stabilitou. Vytváří nevhodné prostředí pro růst většiny mikroorganismů (Suzuki et al., 2006, s. 173).

V nepřívětivém prostředí piva část mikroorganismů rychle odumírá a část přežívá po více či méně dlouhou dobu. V pivu se některé mikroorganismy vyskytují v latentní formě, aniž by ho jakýmkoliv způsobem ovlivňovaly. K těmto mikroorganismům náleží tepelně rezistentní bakterie vytvářející endospory (bacily a klostridia). Z toho důvodu může být pivo velmi šetrně ošetřeno krátkodobým záhřevem nebo pasterací v lahvích. Také patogenní mikroorganismy nemají v pivu žádnou možnost pomnožování a odumírají (Kosař a Procházka, 2003, s. 218). Navzdory tomu je mikrobiální kontaminace stále obávaným tématem (Suzuki et al., 2006, s. 173).

Mikroorganismy, jejichž přítomnost v pivu je nežádoucí lze rozdělit na (Kosař a Procházka, 2003 s. 218-219):

- **Latentní zárodky:** v pivu se vyskytují vzácně. Jedná se o bakterie rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, čeledi *Enterobacteriaceae* křísovité kvasinky atd. Některé produkty jejich metabolismu jsou toxické. Významné jsou mykotoxiny.
- **Indikátorové mikroorganismy:** nejsou škodlivé, pokud se nejedná o masivní kontaminaci. Patří mezi ně například bakterie rodu *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Debaryomyces* a *Saccharomyces*.
- **Pivu nepřímo škodící mikroflóra:** může škodit, ale v hotovém pivu se nepomnožuje. Jedná se o rod *Enterobacter*, *Obesumbacterium*, *Candida* a *Hansenula*.
- **Pivu potenciálně škodící mikroflóra:** k pomnožení v pivu dochází pouze za určitých podmínek. Jedná se o přítomnost O<sub>2</sub>, zvýšené pH piva (nad 4,7), nižší chmelení. Hlavními představiteli jsou *Lactobacillus plantarum*, *Lb. lactis*, *Micrococcus kristinae*, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* nebo *pastorianus*.
- **Pivu škodící mikroflóra:** pomnožuje se v pivu za vzniku sedliny a zákalu. Současně dochází ke změně chuťových vlastností piva, vznik zápachu, tvorba diacetylu atd. Do této skupiny náleží *Lb brevis*, *Lb. lindneri*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus cerevisiiphilus* a *Saccharomyces diastaticus*.

K primárním kontaminantům vyskytujícím se především v kvasnicích a nefiltrovaném úseku (kvasné a ležácké sklepy) patří především *Lb. lindneri*, *Lb. brevisimilis*, *Lb. frigidus* a *Pediococcus damnosus*. Jako sekundární kontaminanty vystupují většinou *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *Pediococcus inopinatus*, *Megasphaera* a *Pectinatus* (Kosař a Procházka, 2003, s. 218).

Za hlavní mikrobiální kontaminanty piva jsou považovány právě BMK. Přibližně 60-70 % mikrobiálních kontaminací je způsobeno touto skupinou mikroorganismů (Suzuki et al., 2006, s. 173-174).

Znehodnocení piva BMK typicky se projeví viditelným zákalem, kyselostí a pachutí (Suzuki et al., 2008, s. 1458).

Schopnost kontaminace je vlastnost, která závisí na relativní citlivosti jednotlivých kmenů laktobacilů vůči chmelovým pryskyřicím (Briggs et al., 2004, s. 623). Některé kmeny *Lb.*

*brevis* jsou schopné intenzivního růstu, zatímco jiné kmeny nevykazují žádnou aktivitu. Příležitostně se může objevit *Lb. paracollinoides*, jeho nežádoucí účinky jsou však srovnatelné s *Lb. brevis*, který je údajně považován za hlavní příčinu mikrobiálních kontaminací piva (Suzuki et al., 2006, s. 173-174). Nejčastěji byl z piva izolován: *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* a *Lb. delbrueckii* (Briggs et al., 2004, s. 623-624). Jako kontaminta byl izolován také *Lb. buchneri* (Sakamoto a Konings, 2003, s. 106-107). Nicméně v souvislosti s kažením piva není často zmiňován. Mnoho studií pojednávající o aminogenní aktivitě tohoto druhu není. Z toho důvodu byl v této práci věnován také prostor zabývající se touto problematikou.

## **2.5 Faktory ovlivňující růst a aminogenní aktivitu mikroorganismů v pivu**

Navzdory k tepelnému záhřevu při chmelovaru a tepelnému ošetření pasterací piva je růst mikroorganismů v pivu možný, avšak závisí na řadě dalších faktorů: pH prostředí, anaerobní podmínky, koncentrace etanolu, vlastnosti chmele, přítomnost etanolu, sacharidů a živin (Doyle a Buchanan, 2013, s. 909; Jaykus, Wang a Schlesinger, 2009, s. 170; Silla-Santos, 1996, s. 219).

Jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu v potravinách je přítomnost dostupných volných aminokyselin tzv. prekurzorů, které poskytují substrát pro růst mikroorganismů. Přítomnost proteolytických bakterií podporuje tvorbu aminů zvyšováním dostupnosti volných aminokyselin. Dekarboxylace aminokyselin je závislá také na množství vyprodukovaného aminu nebo na přítomnosti jiných BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 249-250).

### **2.5.1 Teplota prostředí**

Teplota má vliv na růst a enzymatickou aktivitu mikroorganismů (Suzzi a Gardini, 2003, s. 48). Optimální teplota růstu většiny dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů se pohybuje v rozmezí 20-37 °C (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Vyšší teploty mohou podporovat jak proteolýzu, tak dekarboxylaci, což má za následek zvýšení koncentrace aminů po skladování. Suzzi a Gardini (2003, s. 48-49) uvádí, že mikrobiální dekarboxylázy zůstávají aktivní při teplotě 15 °C, i když většina mikrobiální populace v průběhu skladování dosahuje stacionárního růstu nebo zaniká. Čím je teplota nižší, tím je dekarboxylázová aktivita méně stabilní. Skladování při velmi nízkých až mrazírenských



teplotách je tedy pro tvorbu BA nepříznivé (Suzzi a Gardini, 2003, s. 48-49). Naopak jiní autoři dospěli k závěru, že nízké teploty skladování nejsou dostatečné k potlačení produkce toxických aminů, jako je např. histamin. Některé kmeny bakterií mohou produkovat menší množství histaminu i při teplotách v rozmezí 0-10 °C (Juneja a Sofos, 2010, s. 252). Jak bylo již uvedeno výše, hlavní fermentace i zrání spodně kvašeného piva probíhá při nízkých teplotách. I přes tyto teploty však může dojít k rozvoji kontaminující mikroflóry, k případnému kažení a kumulaci BA.

### 2.5.2 pH prostředí

Relativně nízké pH 3,8-4,7 činí pivo mikrobiálně stabilní (Suzuki et al., 2006, s. 173; Suzuki et al., 2008, s. 1458).

Na hodnotě pH je závislá odolnost vůči chmelovým pryskyřicím. Inhibiční účinky chmelových hořkých látek na růst mikroorganismů jsou snižovány nárůstem pH. Nárůst pH o 0,2 jednotek by mohl snížit ochranný účinek chmelových pryskyřic až o polovinu (Briggs et al., 2004, s. 623). Jejich mikrobistatický účinek spočívá ve změnách propustnosti buněčných stěn bakterií, v úniku látek z cytoplazmy a způsobují následně inhibici respirace, syntézy proteinů, DNA a RNA (Behr a Vogel, 2010, s. 142). Pivo s hodnotou pH 4,0 bude tedy odolnější vůči infekcím než pivo s pH 4,5 (Adams a Moss, 2008, s. 86). Laktobacily však dokážou přežít nízké pH a jestliže se adaptují na chmelové látky, mohou v rámci obranného mechanismu proti překyselení produkovat BA.

Hodnota pH je klíčovým faktorem ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu a tvorbu BA v potravinách (Juneja a Sofos, 2010, s. 253). Enzymy dekarboxylázy jsou většinou neaktivní při neutrálním a alkalickém pH (Fernández et al., 2007, s. 1400). Optimální hodnota pH leží v kyselé oblasti. Z toho důvodu jsou fermentované výrobky vhodným prostředím pro tvorbu BA (Lorencová et al., 2012, s. 2086). Bylo zjištěno, že čím bylo pH prostředí nižší, tím větší množství tyraminu bylo produkováno (Fernández et al., 2007, s. 1403).

Činnost dekarboxyláz je nejvyšší při pH v rozmezí 4,0-5,5 (Gardini et al., 2001, s. 111). Na druhou stranu studie Gardini et al. (2001, s. 111) uvádí, že produkce aminů závisela spíše na růstové aktivitě bakterií než na samotných růstových podmínkách.

### 2.5.3 Anaerobní podmínky

Biosyntézu BA prokazatelně ovlivňuje také přítomnost O<sub>2</sub> (Adams a Nout, 2001, s. 121; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Jestli bude mít tento faktor pozitivní nebo negativní

dopad na produkci BA, závisí podstatně i na přítomném mikroorganismu. Například *Enterobacter cloacae* produkuje přibližně poloviční množství putrescinu v anaerobních podmínkách a *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje sice výrazně méně kadaverinu, ale je schopen produkovat větší množství putrescinu za anaerobních podmínek (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71).

Obecně lze říci, že množství vyprodukovaných BA fakultativně anaerobními mikroorganismy je v anaerobním prostředí menší, než v prostředí aerobním (Adams a Nout, 2001, s. 121). V souhrnné review však Silla-Santos (1996, s. 221) uvádí, že byl histamin v anaerobních podmínkách produkován fakultativně anaerobními bakteriemi více. Mírný nárůst produkce tyraminu v anaerobním prostředí byl pozorován u vybraných kmenů *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Buňková et al., 2012, s. 116 a 118).

Množství O<sub>2</sub> potřebné pro růst mnoha mikroorganismů je v pivu nedostačující (Suzuki et al., 2006, s. 173). I přes to existuje několik skupin mikroorganismů, které v pivu mohou růst a množit se. Nejvíce škodlivou skupinou jsou BMK, již zmíněné rody *Lactobacillus* a *Pediococcus* (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 336). Během zpracování ve varně hladina O<sub>2</sub> klesá, jelikož vliv oxidace během přípravy mladin se považuje za nepříznivý (Kosař a Procházka, 2003 s. 113).

Záporný logaritmus parciálního tlaku kyslíku a rovnováhu redukčních a oxidačních procesů piva vyjadřuje oxidačně-redukční potenciál (rH), který je dán přítomností reduktonů, melanoidinů, polyfenolů a hořkých látek. Hodnota rH má zásadní význam v procesu stárnutí piva. Během kvašení redukční potenciál stoupá (Kosař a Procházka, 2003 s. 210). Vysoký oxidačně-redukční potenciál příznivě ovlivňuje zejména přirozené antioxidanty: polyfenoly, melanoidiny a SO<sub>2</sub>. Stárnutím piva ve spotřebitelském obalu hodnota rH klesá (Kosař a Procházka, 2003 s. 298). V podmínkách sníženého oxidačně-redukčního potenciálu může být podporována produkce histaminu (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71).

#### 2.5.4 Koncentrace etanolu

Přítomnost etanolu 0,5-10 % (v/v) činí pivo mikrobiálně stabilní (Suzuki et al., 2008, s. 1458). Etanol je silný inhibitor růstu mikroorganismů. Nízkoalkoholická a nealkoholická piva jsou proto náchylnější k mikrobiální kontaminaci (Briggs et al., 2004, s. 607). Do jaké míry bude mít etanol inhibiční účinky, rozhodují i další faktory, jako je např. teplota a pH.

Mikroorganismy jsou citlivější na působení etanolu při nižším pH (Casadei et al., 2001, s. 126-133; Garcia-Alegría et al., 2004, s. 53). Dle výsledků Casadei et al. (2001, s. 126-133) byl prokázán inhibiční účinek etanolu u *Lb. delbrueckii* při nižších teplotách.

Produkce tyraminu kmeny *Lb. brevis* vyizolované z vína nebyla inhibována ani při 10 % (v/v) koncentraci etanolu (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 59). Mazzoli et al. (2009, s. 88) ve své studii uvádí, že produkce histaminu izoláty *Lb. hilgardii* nebyla potlačena v přítomnosti 9 % (v/v) etanolu, ale až při koncentraci etanolu, 13 % (v/v).

### 2.5.5 Hořké chmelové látky

K pivovarsky cenným složkám chmele patří pryskyřice, polyfenoly a silice. Nejdůležitější složkou chmele jsou pryskyřice, které jsou zdrojem hořké chuti piva. Pryskyřice jsou tvořeny řadou chemicky podobných látek, z nichž nejúčinnější je skupina  $\alpha$ -hořkých kyselin, skládající se převážně z humulonů, kohumulonů a adhumulonů. Méně účinné jsou ostatní složky pryskyřic, jako  $\beta$ -hořké kyseliny – lupulon, kolupulon, adlupulon. Zejména  $\alpha$ -hořké kyseliny snadno oxidují a mění se v nespecifické měkké až tvrdé pryskyřice, které mají podstatně nižší pivovarskou hodnotu. Proto se musí chmel skladovat v chladu a temnu za omezeného přístupu  $O_2$ . Chmelové  $\alpha$ -hořké kyseliny jsou nepatrně rozpustné ve vodě (Kosař a Procházka, 2003 s. 99-100). Za varu v slabě kyselém vodném prostředí, jak je tomu v mladině, izomerují za vzniku cis- a trans-izo- $\alpha$ -hořkých kyselin, které jsou již rozpustné a vykazují silnou hořkost. Mimo jiné jsou důležité pro vznik a stabilitu pивní pěny (Adams a Moss, 2008, s. 58; Kosař a Procházka, 2003 s. 99-100).

Chmelové hořké kyseliny mají prokazatelné antibakteriální účinky. Jejich obsah je přibližně 17-55 ppm. Tyto látky působí zejména na gramozitivní bakterie, včetně většiny kmenů BMK. Poskytují ochrannou vrstvu proti bakteriím, které mohou kontaminovat hotový produkt. Působí jako přirozeně se vyskytující konzervační látky. Přes antibakteriální účinky chmele jsou však některé kmeny BMK vůči chmelovým hořkým kyselinám rezistentní a způsobují kažení piva. Míra rezistence slouží jako indikátor výskytu jednotlivých pivních kontaminantů BMK. Dle koncentrace hořkých kyselin v médiu se rozlišují více či méně citlivé kmeny BMK (Sakamoto a Konings, 2003, s. 106; Suzuki et al., 2006, s. 173-175).

### 2.5.6 Přítomnost sacharidů

Zkvasitelné sacharidy jako D-glukóza zlepšuje růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Za optimální množství D-glukózy je považováno rozmezí 0,5-2,0 % (w/v), přičemž hladiny vyšší než 3 % (w/v) inhibují syntézu enzymů (Silla-Santos, 1996, s. 219).

Masson et al. (1997, s. 38-40) se zabývaly vlivy faktorů na produkci tyraminu izoláty *Carnobacterium divergens* z vepřového masa a zjistili, že přídavek glukózy v médiu snižoval pH, čímž vzrostlo množství tyraminu. Cukry jsou tedy prekurzory kyselých látek, díky kterým může pH poklesnout až na optimum dekarboxylázové aktivity či hodnotu, proti níž se buňka brání vůči překyselení produkcí BA. K takovému závěru dospěli ve své studii i Buňková a et al. (2011, s. 117-118) či Lorencová et al. (2014, s. 1304-1305).

Transport jednoduchých cukrů (glukózy, fruktózy, manózy, galaktózy) probíhá přes buněčnou stěnu difúzí. Kdyžto maltóza a maltotrióza je transportována aktivním transportem vyžadující energii. Enzymy, které zprostředkovávají štěpení a transport těchto cukrů, jsou buňkou syntetizovány teprve v případě potřeby. K tomuto účelu musí mít buňka vhodné suroviny (Kosař a Procházka, 2003 s. 193-194).

## 2.6 Metody stanovení biogenních aminů a polyaminů

Prvotní skríníng dekarboxylázové aktivity mikroorganismů (orientační stanovení) lze provést metodou kultivační. Skríníngové metody využívají média s přídavky aminokyselin a pH indikátoru. Pozitivní reakce je indikována specifickou změnou barvy média, při negativní reakci se barva média nemění. Výhodou těchto metod je nenáročná a rychlá provedení. Nevýhodou jsou však falešné pozitivní či negativní výsledky (Bover-Cid a Holzapfel, 1999, s. 35-37).

Molekulární metody, jako např. PCR poskytne informaci o tom, že má daný testovaný mikroorganismus genetickou predispozici tvořit určité dekarboxylační enzymy. Detekuje se tedy gen kódujícího příslušnou dekarboxylázu. Nicméně ještě neznamená, že daný mikroorganismus musí nutně tyto enzymy opravdu produkovat. Z toho vyplývá, že molekulárně genetické metody stanoví potenciál tvorby BA (Landete, 2007, s. 259-260).

Pro separaci a kvantifikaci BA a polyaminů lze využít řadu analytických separačních metod. Jedná se převážně o metody chromatografické (tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie, chromatografie iontových párů a vysokoúčinná kapalinová

chromatografie), dále techniky zahrnující kapilární elektroforézu (Karovičová, Kohajdová, 2005, s. 74; Křížek a Hlavatá, 1995, s. 266; Smělá et al., 2004, s. 432).

Typickými problémy při analýze jsou složité matrice vzorků, přítomnost potencionálně rušivých sloučenin a výskyt několika BA zároveň (Karovičová, Kohajdová, 2005, s. 74).

Ke stanovení aminů se v praxi nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (Křížek a Hlavatá, 1995, s. 266; Smělá et al., 2004, s. 432). K detekci se používají zejména detektory UV/VIS a fluorescenční (Křížek a Hlavatá, 1995, s. 266; Smělá et al., 2004, s. 432). Dále lze použít detektory elektrochemické nebo detekci pomocí hmotnostní spektrometrie (Smělá et al., 2004, s. 432).

BA ani polyaminy nelze přímo detekovat v UV/VIS oblasti ani fluorimetricky, a proto je nutné vzorky před detekcí derivatizovat (Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 3251-3252). Derivatizace se provádí buď před nástřikem na kolonu (např. předkolonová deprivatizace dansylchloridem nebo fluoresceinem) nebo až po výstupu z kolony (např. postkolonová deprivatizace ninhydrinem nebo o-ftalaldehydem). Nejběžnějším derivatizačním činidlem je však dansylchlorid. Nevýhodou jeho použití je, že poskytuje produkty s nízkou stabilitou a vysokou citlivostí na světlo (Karovičová, Kohajdová, 2005, s. 74; Křížek a Hlavatá, 1995, s. 266).

### 3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

BMK tvoří skupinu nepohyblivých nesporejících kataláza negativních mikroaerofilních až fakultativně anaerobních grampozitivních koků a tyčinek. Název skupiny je odvozen od schopnosti bakterií fermentovat sacharidy na převažující produkt kyselinu mléčnou (Černíková a Vaňatková, 2010, s. 80; Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 1). Metabolické dráhy BMK mohou za aerobních podmínek vést až k oxidační disimilaci sacharidů za vzniku CO<sub>2</sub> a kyseliny octové. Meziproduktem tohoto katabolického děje je mikrobicidní H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Görner a Valík, 2004, s. 157).

V potravinářské technologii jsou za hlavní představitele BMK považovány rody, jako např. *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 1).

Klasifikace BMK do různých rodů je založena na morfologii, způsobu zkvašování glukózy, optimální růstové teplotě, schopnosti růstu v prostředí s vysokou koncentrací NaCl a na základě tolerance vůči kyselému a zásaditému prostředí (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 1).

#### 3.1 Rod *Lactobacillus*

##### 3.1.1 Taxonomie

Taxonomické zařazení rodu *Lactobacillus* (Sedláček, 2007, s. 224):

doména *Bacteria*

kmen *Firmicutes*

třída *Bacilli*

řád *Lactobacillales*

čeleď *Lactobacillaceae*

rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je jedním z největších rodů řadících se mezi BMK (Reddy et al., 2008, s. 25). Jedná se o značně heterogenní rod zahrnující druhy s širokou škálou fenotypových, biochemických a fyziologických vlastností (Carr, Chill a Maida, 2002, s. 283; Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 12).

### 3.1.2 Morfologie a růstové podmínky

Buňky rodu *Lactobacillus* jsou tvaru pravidelných tyčinek, obvykle delší, občas také kokovitě uspořádané v palisádách nebo krátkých řetězcích (Sedláček, 2007, s. 244). Některé plynotvorné druhy vytváří směs dlouhých a krátkých buněk. Tendence tvorby řetězků není typická, závisí od růstové fáze, pH média a méně na druhu (Görner a Valík, 2004, s. 155). Patří mezi grampozitivní, nesporulující bakterie, zřídka mají peritrichální bičíky (Sedláček, 2007, s. 244). Kolonie laktobacilů na agarových médiích mívají průměr 2-5 mm s pravidelným okrajem, jsou vyduté, hladké, lesklé, neprůhledné a bezbarvé. Kmeny rodu *Lactobacillus* vykazují mírnou proteolytickou a slabou lipolytickou aktivitu (Görner a Valík, 2004, s. 156).

Laktobacily jsou fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní, tzn., že projevují také slabý růst na vzduchu, ale lepší růst při redukované koncentraci O<sub>2</sub>. Někteří zástupci vyžadují při izolaci dokonce anaerobní podmínky. Obecně platí, že přítomnost 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> podporuje růst laktobacilů. (Sedláček, 2007, s. 244)

Laktobacily jsou chemoorganotrofní a vyžadují bohatá komplexní média (Sedláček, 2007, s. 244). Vedle fermentovaných sacharidů jako zdroj uhlíku a energie, vyžadují i nukleotidy, aminokyseliny a vitaminy skupiny B. Požadavkům laktobacilů na komplexnost média běžně vyhovuje živná půda obsahující fermentovatelný sacharid, pepton, masový extrakt a kvasničný autolyzát (Görner a Valík, 2004, s. 156). Jejich metabolismus je fermentační, neredukují nitráty, nehydrolyzují želatinu a jsou kataláza negativní (Sedláček, 2007, s. 244).

Optimální růstová teplota se pro laktobacily pohybuje v rozsahu 30-40 °C a optimální pH obvykle v intervalu mezi 5,5-6,2 (Sedláček, 2007, s. 244). Většina druhů je inhibována vyššími hodnotami pH, které zasahují do alkalické oblasti (Wareing, Felicity a Rhea, 2010, s. 250).

Laktobacily patří mezi acidotolerantní až acidofilní bakterie (Görner a Valík, 2004, s. 150-151). Hodnota vodní aktivity ( $a_w$ ) je mezi 0,93-0,96 (Wareing, Felicity a Rhea, 2010, s. 251).

Laktobacily jsou široce rozšířené v prostředí. Vyskytují se v nejrůznějších potravinách živočišného nebo rostlinného původu, nápojích, čisté i znečištěné vodě, kysaném zelí a silážích (Sedláček, 2007, s. 244). V poživatinách přispívají k tvorbě jejich charakteristické chuti a vůně. Tvoří dominantní část mikroflóry trávicího a urogenitálního traktu člověka i

zvířat. Často jsou izolovány z rostlinných materiálů a nacházejí se ve fermentovaných nebo kazících se potravinách (Bernardeau et al., 2008, s. 278).

Jejich hlavním fyziologickým znakem je fermentace sacharidů na kyselinu mléčnou (Šilhánková, 1983, s. 235). Význam této kyseliny v mléčně kysaných výrobcích spočívá zejména v zakonzervování a zlepšení chuti (Reddy et al., 2008, s. 23). Kromě kyseliny mléčné mohou vznikat i další produkty, jako je např. etanol, acetát (ale také formiát) v závislosti na genetické schopnosti každého druhu (Pessione, Lamberti a Pessione, 2010, s. 1420). Například *Lb. buchneri* produkuje v siláži kyselinu mléčnou a octovou během mléčné fermentace (Combs a Hoffman, 2001, s. 1).

### 3.1.3 Metabolismus laktobacilů — proces mléčné fermentace

Podle konečných produktů fermentace sacharidů se laktobacily klasifikují do tří skupin na obligátně homofermentativní, fakultativně hererofermentativní a obligátně hererofermentativní (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 12).

#### Obligátně homofermentativní

Do této skupiny náleží laktobacily přeměňující hexózy na kyselinu mléčnou přes Embden-Meyerhofovu dráhu, ale nejsou schopny fermentovat pentózy nebo glukonát (Sedláček, 2007, s. 244). Kyselina je hlavním produktem této fermentace, jejíž produkce činí více než 85 % (Reddy et al., 2008, s. 25).

Skupina obligátně homofermentativních laktobacilů zahrnuje např. následující zástupce: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius* (Görner a Valík, 2004, s. 153; Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 12).

#### Fakultativně heterofermentativní

Fakultativně heterofermentativní laktobacily obvykle fermentují hexózy homofermentativní cestou, tedy přímo na převažující produkt kyselinu mléčnou. U některých kmenů lze však za určitých podmínek pozorovat heterofermentativní metabolismus, kdy přeměňují zkvasitelné cukry na kyselinu mléčnou, CO<sub>2</sub> a etanol (nebo kyselinu octovou). Kyselina octová je produkována tehdy, pokud NAD<sup>+</sup> může být regenerováno bez tvorby etanolu, např. při redukcii fruktózy nebo molekulárního O<sub>2</sub>. Pentózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou foskoketolázovou dráhou (Černíková a Vaňatková, 2010, s. 81; Felis a Dellaglio, 2007, s. 48).



Skupina fakultativně heterofermentativní reprezentuje např.: *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *ramnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* (Görner a Valík, 2004, s. 154; Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 12).

#### **Obligátně heterofermentativní**

Obligátně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, CO<sub>2</sub> a etanol (nebo kyselinu octovou). Pentózy jsou přeměňovány na kyselinu mléčnou a octovou (Sedláček, 2007, 245). Produkce kyseliny mléčné představuje zhruba 50 % (Reddy et al., 2008, s. 25). Tvorba plynu z glukózy je charakteristickým znakem těchto bakterií (Stiles a Holzappel, 1997 s. 15).

Skupina obligátně heterofermentativních laktobacilů zahrnuje např.: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* (Görner a Valík, 2004, s. 155; Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 12).

#### **3.1.4 Cílená aplikace kultur laktobacilů v potravinách**

Laktobacily hrají klíčovou roli při výrobě fermentovaných potravin. Z technologických důvodů se záměrně přidávají jako startéry (Bernardeau et al., 2008, s. 278-280).

Při výrobě sýrů plní laktobacily nejčastěji funkci primární kultury, jejíž význam spočívá v produkci kyseliny mléčné (Bernardeau et al., 2008, s. 280).

Kyselina mléčná snižuje v rámci fermentace laktózy pH prostředí až na hodnotu 4,0, čímž je inhibován růst většiny mikroorganismů, často i patogenních, a prodlouží se trvanlivost mléčně kysaných potravin (Reddy et al., 2008, s. 25).

Heterofermentativní laktobacily se v rámci výroby sýrů pak uplatňují jako sekundární kultury podílející se na zrání sýrů. Některé kmeny mohou disponovat dieteticko-léčebnými účinky na lidské zdraví (Bernardeau et al., 2008, s. 280). Probiotika mají pozitivní vliv při léčbě střevních zánětů, průjemových onemocnění, infekcí močových cest a v průběhu těhotenství. Jsou schopna zlepšit stav pacientů trpících alergiemi (Bernardeau et al., 2008, s. 280).

Při výrobě jogurtů nachází uplatnění mikrobiální kultura, jejíž součástí je *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Heterofermentativní *Lb. kefir* nachází uplatnění při výrobě kefiru (Görner a Valík, 2004, s. 151-152).

Mimo jiné jsou kultury laktobacilů také důležité při výrobě masných výrobků, výrobků rostlinného původu, vína, speciálních druhů piva atd. (Carr, Chill a Maida, 2002, st. 282; Giraffa, Chanishvili a Widyastuti, 2010, s. 481).

Laktobacily mají významnou úlohu při fermentaci tepelně neopracovaných masných výrobků obsahujících přidanou sacharózu nebo jiný zkvasitelný sacharid.

Laktobacily se rozmnožují i v masných výrobcích, které jsou skladovány při chladírenských teplotách. Díky tomu v nich laktobacily plní ochranou funkci před kažením proteolytickými bakteriemi svou metabolickou činností (Görner a Valík, 2004, s. 152).

Laktobacily se nacházejí v menším množství na povrchu neporušených rostlin a ve větším množství na rozkládajících se rostlinných materiálech, zejména na kazícím se ovoci. Mají tedy velký význam při výrobě mnohých rostlinných fermentovaných produktů (mléčně kvašených okurek, zelí, zeleninových směsí, vína, piva, ovocných šťáv a siláží), jako i při kažení těchto potravin a krmiv rostlinného původu (Görner a Valík, 2004, s. 151).

Laktobacily se využívají v rámci výroby speciálních druhů piv, jako jsou kyselá a spontánně kvašená piva (lambik) pocházející zejména z Belgie. Přítomnost laktobacilů se v tomto případě nebere jako negativní jev, ba naopak dodávají těmto pivům žádoucí kyselou chuť v důsledku tvorby kyseliny mléčné (Spitaels et al., 2014, s. e95384).

Mimo jiné jsou laktobacily schopné inhibovat patogenní mikroorganismy, např. některé druhy salmonel a stafylokoků. Patogeny jsou v tomto případě inhibovány nejen snížením pH pomocí vyprodukované kyseliny mléčné, ale také vylučováním bakteriocinů s antibiotickým účinkem. Uvedené inhibiční látky jsou účinné i proti dalším enteropatogenním bakteriím a sporotvorným mikroorganismům (Černíková a Vaňatková, 2010, s. 80). Při nízkém pH spolupůsobí specificky mikrobicidně i kyselina octová a  $H_2O_2$  (Görner a Valík, 2004, s. 157).

Mezi další příznivé účinky kultur laktobacilů patří zvýšení nutriční hodnoty potravin, zmírnění zažívacích problémů, stimulace imunitního systému a odolnost hostitele vůči patogenům a nádorovým aktivitám (Adams a Moss, 2008, s. 320-322).

### 3.1.5 Nepříznivé projevy laktobacilů

Heterofermentativní laktobacily se vyskytují jako nežádoucí kontaminace ve vinařství a pivovarnictví, kde způsobují chuťové vady výrobku (Wareing, Felicity a Rhea, 2010, s. 250). Jako původce kažení piva je nejčastěji považován *Lb. brevis*. U masných výrobků

mohou způsobit kyselou chuť, tvorbu plynu, slizu anebo zelenání (Görner a Valík, 2004, s. 152). Dále může vznikat máslová příchut' v důsledku tvorby diacetylu v džusech a pivu či zákal v alkoholických nápojích (Pejin et al., 2002, s. 46; Tolls et al., 1970, s. 649; Wareing, Felicity a Rhea, 2010, s. 250).

Homo- a heterofermentativní laktobacily mají významnou úlohu při kažení technologicky kyselých potravin. Kyselé prostředí je potřebné pro funkci proteáz. Uvolněné aminokyseliny pak slouží jako zdroj energie pro acidotolerantní kmeny. Dále jsou zmíněné laktobacily schopné dekarboxylace aminokyselin za vzniku BA. (Görner a Valík, 2004, s. 152)

Ojedinele jsou laktobacily původci infekcí. Tuto skutečnost lze sledovat zejména u pacientů s oslabenou imunitou (Bernardeau et al., 2008, s. 280-281). Obecně však lze o laktobacilech říct, že jsou to bakterie, které představují pro zdraví člověka minimální riziko (Wessels et al., 2004, s. 499).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo provést skríníng dekarboxylázové aktivity *in vitro* a ve sladidně u izolátů kmenů laktobacilů z procesu výroby piva. Dílčím cílem v rámci skríníngu bylo také zhodnotit význam testovaných faktorů na celkovou produkci biogenních aminů.

Doplňkovým, neméně významným, cílem bylo provést sledování kinetiky produkce biogenních aminů u vybraného kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9, která byla ovlivněna sledovanými faktory (teplota kultivace, přídavky etanolu a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin do kultivačního prostředí; samostatně a ve vzájemných kombinacích) za podmínek *in vitro*.

Naplňování cílů tedy probíhalo ve dvou hlavních experimentech (Experiment I a Experiment II). Experiment I představoval skríníng a Experiment II sledování kinetiky produkce biogenních aminů vybraným kmenem.

Ke splnění cílů Experimentu I a II této diplomové práce bylo nutné stanovit obsah biogenních aminů a polyaminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích s gradientovou elucí a UV detekcí.

V rámci Experimentu II bylo dále zapotřebí zjistit nárůst kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 k sestrojení růstových křivek a vývoj pH kultivačního prostředí, aby mohlo být zhodnoceno růstové chování zkoušeného kmene a případně odůvodněn vliv těchto parametrů na produkci biogenních aminů.

## 5 MATERIÁL

### 5.1 Použité mikroorganismy

Pro skríníng dekarboxylázové aktivity *in vitro* a ve sladíně bylo použito 36 kmenů laktobacilů izolovaných z procesu výroby piva. Jednalo se o zástupce: *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lb. brevis* a *Lb. buchneri*. Kmeny byly získány z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (Research Institute of Brewing and Malting; RIBM).

Vzhledem k nedostatku studií zabývajících se produkcí BA zástupci *Lb. buchneri*, zvláště pak produkcí tyraminu, bylo v rámci této diplomové práce realizováno sledování kinetiky produkce tyraminu (postupná tvorba tyraminu) ovlivněné vybranými faktory. Pro účely sledování kinetiky produkce BA souběžně s růstovým chováním *in vitro* byl vybrán kmen *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9. Kmen, který vykazoval nejvyšší produkci tyraminu ze všech testovaných kmenů. Jednalo se rovněž o izolát z procesu výroby piva, který je považován za bakteriální kontaminant.

### 5.2 Laboratorní média a sladina

Kmeny laktobacilů byly kultivovány v tekutých médiích MRS broth (MRS; HiMedia) a ve sladíně. Pro přípravu sladiny v laboratorních podmínkách byl použit sladový výtažek český světlý (euroB.A.CH).

V podmínkách *in vitro* byly jako prekurzory sledovaných BA a polyaminů použity aminokyseliny (AMK; Sigma-Aldrich): tyrozin, ornitin, arginin, lyzin, fenylalanin a histidin v koncentraci 0,3 % (w/v). V tom samém médiu bylo vyhodnoceno růstové chování vybraného kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9. Bujón MRS se používal také pro přípravu 24-hodinového inokulátu a pro uchovávání kmenů laktobacilů. Pro zjišťování nárůstu vybraného kmene bylo zapotřebí použít MRS agar (HiMedia).

#### MRS bujón

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| MRS               | 52,2 g    |
| deionizovaná voda | 1000,0 ml |
| pH                | 5,2±0,2   |

Sladina z extraktu sladu

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| sladový výtažek český světlý | 125,0 g   |
| deionizovaná voda            | 1000,0 ml |

MRS agar

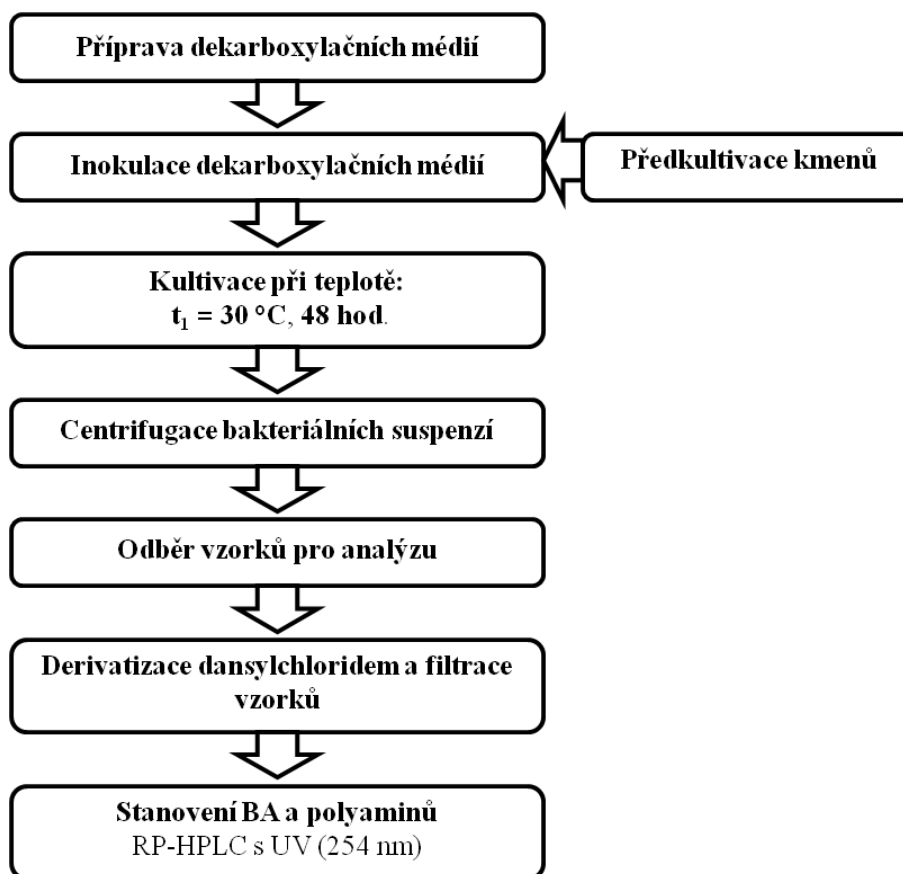
|                   |           |
|-------------------|-----------|
| MRS               | 52,2 g    |
| agar agar         | 15,0 g    |
| deionizovaná voda | 1000,0 ml |
| pH                | 4,8±0,2   |

## 6 METODIKA

### 6.1 Experiment I

V rámci Experimentu I byl proveden skrínig dekarboxylázové aktivity u vybraných kmenů laktobacilů.

Skrínig produkce BA a polyaminů byl zkoumán za podmínek *in vitro* (MRS broth) a ve sladině. Bylo vybráno 36 kmenů laktobacilů od zástupců rodu *Lactobacillus casei/paracasei* (30 kmenů), *Lb. brevis* (3 kmeny) a *Lb. buchneri* (3 kmeny). Po kultivaci uvedených bakterií byl získán supernatant, ve kterém byly BA a polyaminy stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích s UV detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Zjednodušené schéma průběhu Experimentu I je znázorněno na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma Experimentu I, skrínig dekarboxylázové aktivity *in vitro* a ve sladině.



### 6.1.1 Příprava dekarboxylačních médií v rámci Experimentu I

Dekarboxylázová aktivita byla zkoumána v supernatantech po kultivaci testovaných kmenů při teplotě 30 °C za podmínek *in vitro* a ve sladíně. Kmeny byly kultivovány ve třech variantách médií v pěti opakováních.

První variantou dekarboxylačního média byl bujón MRS s přidavkem aminokyselin (Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His) v koncentraci 0,3 % (w/v). Totožné médium, ale obohacené přidavky faktorů (etanolu (LachNer) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin (YC-Iso, Yakima Chief)) představovalo druhou variantu média. Poslední, třetí varianta bylo prostředí sladiny bez suplementace aminokyselinami.

Každé médium bylo připraveno navážením potřebného množství daných komponent (MRS, aminokyseliny, sušený extrakt světlého sladu). Poté byly tyto složky smíchány s požadovaným objemem vody. Sladina byla připravena dle návodu výrobce tak, aby extraktivně odpovídala 10 % pivu. Hustota byla měřena orientačně pomocí hustoměru. Kyselost živného média simulující svými parametry prostředí piva (pH, koncentrace a etanolu a hořkých látek) byla upravena na pH 4,8 okyselením HCl o koncentraci 6 mol/l. Média o objemu 7 ml byla sterilována v autoklávu (Systec 2540EL) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Před očkovaním byla obohacena druhá varianta média přidavky etanolu ve výši 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin v konečné koncentraci 20 mg/l.

K zaočkování dekarboxylačních médií byl použit 24-hodinový inokulát. Jeho příprava spočívala v pomnožení kmenů laktobacilů před vlastním experimentem v dekarboxylačním médiu, které představoval bujón MRS s přidavky aminokyselin. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin v termostatu (Memert).

Kontrola čistoty kmenů byla před samotným experimentem uskutečněna křížovým roztěrem, Gramovým barvením a mikroskopováním fixovaných preparátů testovaných kmenů.

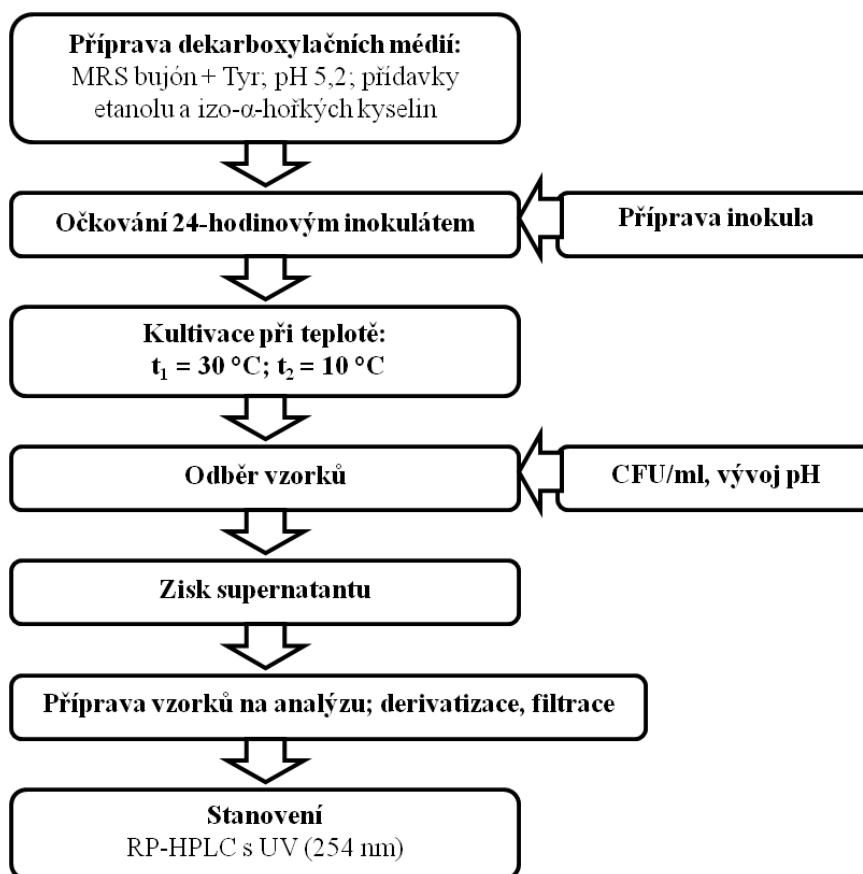
Varianty médií byly inokulovány 100  $\mu$ l pomnožené suspenze daných kmenů laktobacilů narostených přes noc. Inokulace probíhala v očkovacím boxu (Biohazard). Nezaočkováná média posloužila jako kontroly (od každé varianty média 5 kontrol). Hodnota BA a polyaminů detekovaných v nezaočkovaných médiích byla odečtena od hodnot stanovených v reálných vzorcích po kultivaci sledovaných kmenů.

### 6.1.2 Odběr vzorků pro analýzu

Po kultivaci byla živná média s vybranými kmeny laktobacilů centrifugována (3 421x g; 22±1 °C; 20 minut; odstředivka Hettich) a následně odebírána. Vždy bylo odebráno 750 µl média se suspenzí bakterií (supernatantu) a 750 µl kyseliny chloristé (Merck) o koncentraci 1,2 mol/l do ependorfkové mikroskopické kumavky. Tímto způsobem byly připraveny i kontroly.

## 6.2 Experiment II

V rámci Experimentu II byla sledována kinetika produkce BA *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9, která byla ovlivněna testovanými faktory. V čase odběru vzorků bylo, kromě analýzy obsahu BA, sledováno růstové chování. V čase odběru bylo měřeno pH a rozvoj testovaného kmene (CFU/ml). Stanovení BA probíhalo stejně jako v Experimentu I. Zjednodušené schéma postupu Experimentu II je uvedeno na Obr. 3.



Obr. 3: Schéma Experimentu II, kinetika produkce biogenních aminů vybraným kmenem *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9.

### 6.2.1 Příprava dekarboxylačních médií v rámci Experimentu II

Produkce BA vybraným kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9 byla ovlivněna přidavkem testovaných faktorů v různých koncentracích v příslušných odběrových časech při dané testované teplotě.

Byl zkoušen vliv teploty kultivace (30 °C, 10 °C), přidavku etanolu (0, 2, 3, 4 % (v/v)) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin (0, 5, 10, 20 mg/l).

Byly zvoleny takové hodnoty zkoušených faktorů, které souvisí s technologickou praxí výroby piva. Zkoušené kultivační teploty měly odpovídat teplotám, při nichž je pivo během výrobního procesu vystaveno (Basařová et al., 2010, s. 364-369). Navíc vyšší teplota (30 °C) je optimální pro kultivaci testovaného kmene. Získané výsledky při takto zvolených podmínkách se pak mohou aplikovat na technologii výroby piva.

Vybraný kmen byl kultivován v bujónu MRS s přidavky testovaných faktorů. Faktory byly přidávány ve vzájemných kombinacích. Celkem bylo vytvořeno 16 kombinací faktorů uvedené v Tab. 3.

Tab. 3: Dekarboxylační média s přidavky dané kombinace faktorů.

| médium                     | přidavky  |     |      |      |
|----------------------------|---|-----|------|------|
|                            | etanolu [%]/směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin [mg/l] |     |      |      |
| bujón MRS + Tyr,<br>pH 5,2 | 0/0   | 0/5 | 0/10 | 0/20 |
|                            | 2/0   | 2/5 | 2/10 | 2/20 |
|                            | 3/0   | 3/5 | 3/10 | 3/20 |
|                            | 4/0   | 4/5 | 4/10 | 4/20 |

kde Tyr...přídavek tyrozinu 0,3 % (w/v); příklad značení kombinací 0/5...0 % (v/v) etanolu, 5 mg/l směsi hořkých látek

Bujón MRS byl obohacen jen aminokyselinou tyrozinem v koncentraci 0,3 % (w/v). V rámci skríningu totiž kmen disponoval prokazatelně pouze tyrozindekarboxylázovou aktivitou. Iniciační hodnota pH živného média byla 5,2 $\pm$ 0,2. Živná média o jednotném objemu 7 ml byla sterilována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Po vysterilování a zchladnutí byla média modifikována přidavkem příslušného množství etanolu a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin pro danou kombinaci faktorů.

Poté bylo očkováno 100  $\mu$ l suspenze bakterií testovaného kmene narostených přes noc ve trojím opakování pro každý čas odběru. Pro každý odběrový čas byla ponechána jedna

kontrola (nezaočkované médium). Kultivace inokulovaných médií byla realizována při teplotě 30 °C a 10 °C.

### 6.2.2 Odběr vzorků pro analýzu

Ihned po inokulaci dekarboxylačních médií, bez následné kultivace, byly odebírány vzorky pro analýzu (v čase odběru 0 hodin). Důvodem bylo zjištění počátečního obsahu BA. Dále byl zjišťován počet kolonií tvořících jednotku v jednom ml čerstvě zaočkovaného média (CFU/ml). Kultivace inokulovaných médií testovaným kmenem byla ukončena v daných časech odběru.

Při teplotě 30 °C probíhaly odběry v čase 0, 2, 12, 24, 48, 72 a 96 hodin kultivace a při teplotě 10 °C po 0, 2, 7, 9, 12 a 15 dnech kultivace. Zvolená pravidelnost odběrových časů byla z důvodu monitorování kinetiky produkce BA v dekarboxylačních médiích s přidávkou testovaných faktorů.

Ve všech časech odběru (včetně počátečního) byl sledován nárůst kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 a změny pH kultivačního média (metody stanovení jsou popsány v kapitole 6.2.3).

Odběr vzorků probíhal stejně jako v Experimentu I.

### 6.2.3 Růstové chování kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9

V každém čase odběru byl zjišťován nárůst kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 (CFU/ml) a vývoj pH kultivačního média. Tyto parametry byly nezbytné k vyhodnocení růstového chování zkoušeného kmene.

Nárůst vybraného kmene byl zjišťován z vhodného ředění. Bylo očkováno 100 µl inokula na půdy MRS agar. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C 24 hodin. Z hodnot CFU/ml v daných časech odběru byly sestrojeny růstové křivky kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9.

Měření pH kultivačního média bylo provedeno při laboratorní teplotě za použití pH metru (Eutech, Instruments Junction). Měření probíhalo u všech vzorků v trojím opakování.

V důsledku metabolické aktivity kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 se měnilo pH kultivačního prostředí. Kyselost prostředí ovlivňuje růst mikroorganismů i dekarboxylázovou aktivitu, jak je uvedeno v kapitole 2.5.2 této diplomové práce.

### 6.3 Stanovení biogenních aminů a polyaminů v Experimentu I a II

Derivatizace vzorků dansylchloridem (Sigma-Aldrich) byla provedena podle Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 367).

Každý vzorek z ependorfkové mikrozkušavky byl pipetován po 1 ml do derivatizačních vialek. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l vnitřního standardu v koncentraci 5 g/l, 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1-11,2 (uhličitany sodné i draselné, Merck) a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma-Aldrich) v acetonu o koncentraci 5 g/l. Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich). Následovalo dvacetihodinové třepání v temnu. Reakce byla zakončena přidavkem 200  $\mu$ l prolinu (Merck) a proběhlo další hodinové třepání. Dansylderiváty byly extrahovány intenzivním vytřepáním do 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich). Jeden mililitr vrchní heptanové vrstvy (supernantu) byl pipetován do malé vialky a odpařen pod dusíkem při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (100 % koncentrovaný; Sigma-Aldrich). Derivatizované vzorky byly zfiltrány (0,22  $\mu$ m porozita filtru) a nanесeny na kolonu ve dvojitěm opakování.

Podmínky separace a detekce sledovaných BA byly uvedeny ve studii Smělé et al. (2004, s. 432-437). Separace byla provedena gradientovou elucí (eluční program pro mobilní fázi voda/ACN uveden v Tab. 4). UV detekce dansylderivátů byla provedena při vlnové délce 254 nm. Všechny separace probíhaly na koloně Agilent Zorbax Eclipse C18 s parametry 50 x 3,0 mm, 1,8  $\mu$ m (Agilent Technologies). Chromatografický systém byl dále tvořen binární pumpou, odplyňovačem, UV/VIS-DAD detektorem, termostatem kolon (vše Agilent Technologies) a autosamplerem LabAlliance SHLA84000.

Tab. 4: Eluční program.

| čas [min] | 10% ACN* [%] | 100% ACN* [%] |
|-----------|--------------|---------------|
| 0,0       | 39           | 61            |
| 0,1       | 39           | 61            |
| 1,4       | 30           | 70            |
| 3,5       | 17           | 83            |
| 4,0       | 0            | 100           |
| 9,5       | 0            | 100           |
| 11,5      | 39           | 61            |
| 15,5      | 39           | 61            |

\*ACN...acetonitril

## **6.4 Doplnkové stanovení obsahu aminokyselin v dekarboxylačních médiích**

Byla provedena doplňující analýza aminokyselinového složení média MRS a extraktu sladu (sladiny). Úprava a analýza vzorků média a sladiny proběhla dle Lazárkové et al. (2011, s. 1865).

Analýza obsahu aminokyselin byla realizována po kyselé a oxidativní hydrolyze, kdy bylo množství aminokyselin v médiích stanoveny za použití automatického aminokyselinového analyzátoru AAA 400 (Ingos). Separace probíhá na principu iontovýmenné chromatografie s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí ( $\lambda=540$  nm).

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Výsledky Experimentu I

Dekarboxylázová aktivita byla zjišťována u 36 kmenů laktobacilů druhu *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lb. brevis* a *Lb. buchneri* (Tab. 5, 6, Příloha P I).

Produkce sedmi BA (tyraminu, putrescinu, spermidinu, sperminu, kadaverinu, fenyletylaminu, histaminu) byla sledována při teplotě 30 °C po 48 hodinové kultivaci kmenů ve třech různých médiích: v MRS bujónu s aminokyselinami, ve faktory upraveném MRS bujónu (pH 4,8; 4 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) a ve sladíně.

Při teplotě 30 °C za podmínek *in vitro* a ve sladíně byl vybranými kmeny laktobacilů produkován především tyramin. Produkce ostatních BA a polyaminů (histaminu, putrescinu) nedosahovala množství 0,5 mg/l, nebo nebyla v daném prostředí vůbec detekována.

Produkce tyraminu se ve třech různých médiích značně lišila. Obecně lze konstatovat, že nejvyšší koncentrace tyraminu byly vyprodukovány testovanými kmeny v médiu MRS s aminokyselinami. Naopak nejnižší koncentrace vykazovalo prostředí sladiny (Obr. 4, 5 a Tab. 5, 6).

Médium s upraveným pH, které bylo dále obohaceno o etanol a hořké látky, vytvořilo pro produkci tyraminu a ostatních BA méně přívětivé prostředí. Etanol i hořké látky jsou považovány za substance inhibující růst mikroorganismů (Briggs et al., 2004, s. 607 a 623). Koncentrace a hodnoty testovaných faktorů byly voleny tak, aby se přibližovaly hodnotám méně hořkého, výčepního piva.

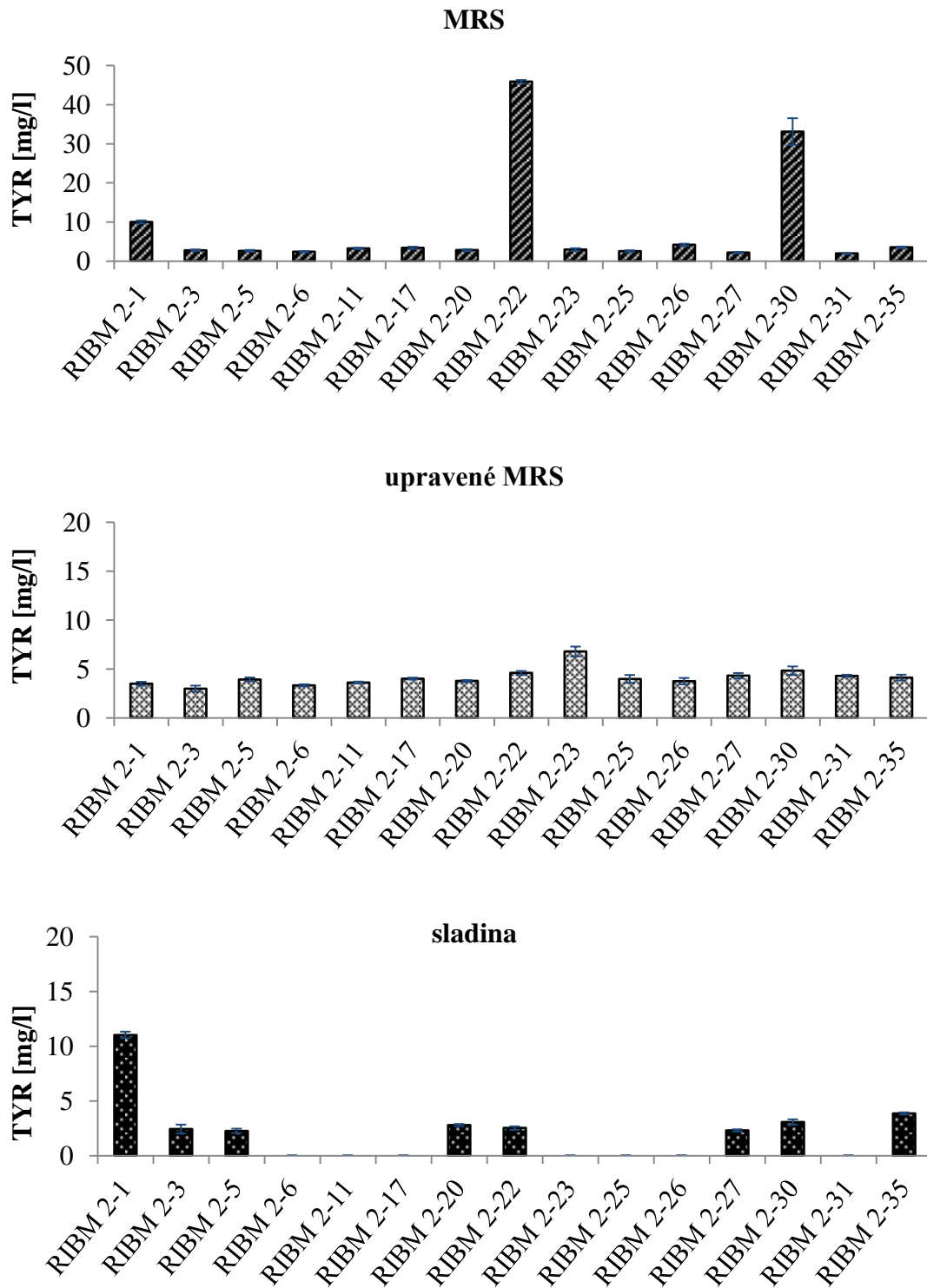
Zjevné rozdíly v produkci tyraminu byly ve všech zkoušených dekarboxylačních médiích nejenom mezi jednotlivými druhy laktobacilů, ale také mezi příslušnými kmeny daného druhu. Nejméně produkční kmeny byly zástupci *Lb. casei/paracasei*.

Na Obr. 4 a 5 je znázorněna produkce tyraminu 30 kmeny *Lb. casei/paracasei*. V médiu MRS s aminokyselinami byla vyprodukována nejvyšší koncentrace tyraminu kmenem *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-22 ( $45,9 \pm 0,4$  mg/l). Obdobné množství bylo zaznamenáno jen u 2 kmenů *Lb. casei/paracasei* (RIBM 2-30,  $33,1 \pm 3,4$  mg/l; RIBM 2-46,  $33,0 \pm 2,5$  mg/l). Ostatní zástupci *Lb. casei/paracasei* vykazovali v MRS bujónu produkci  $\leq 10$  mg/l.

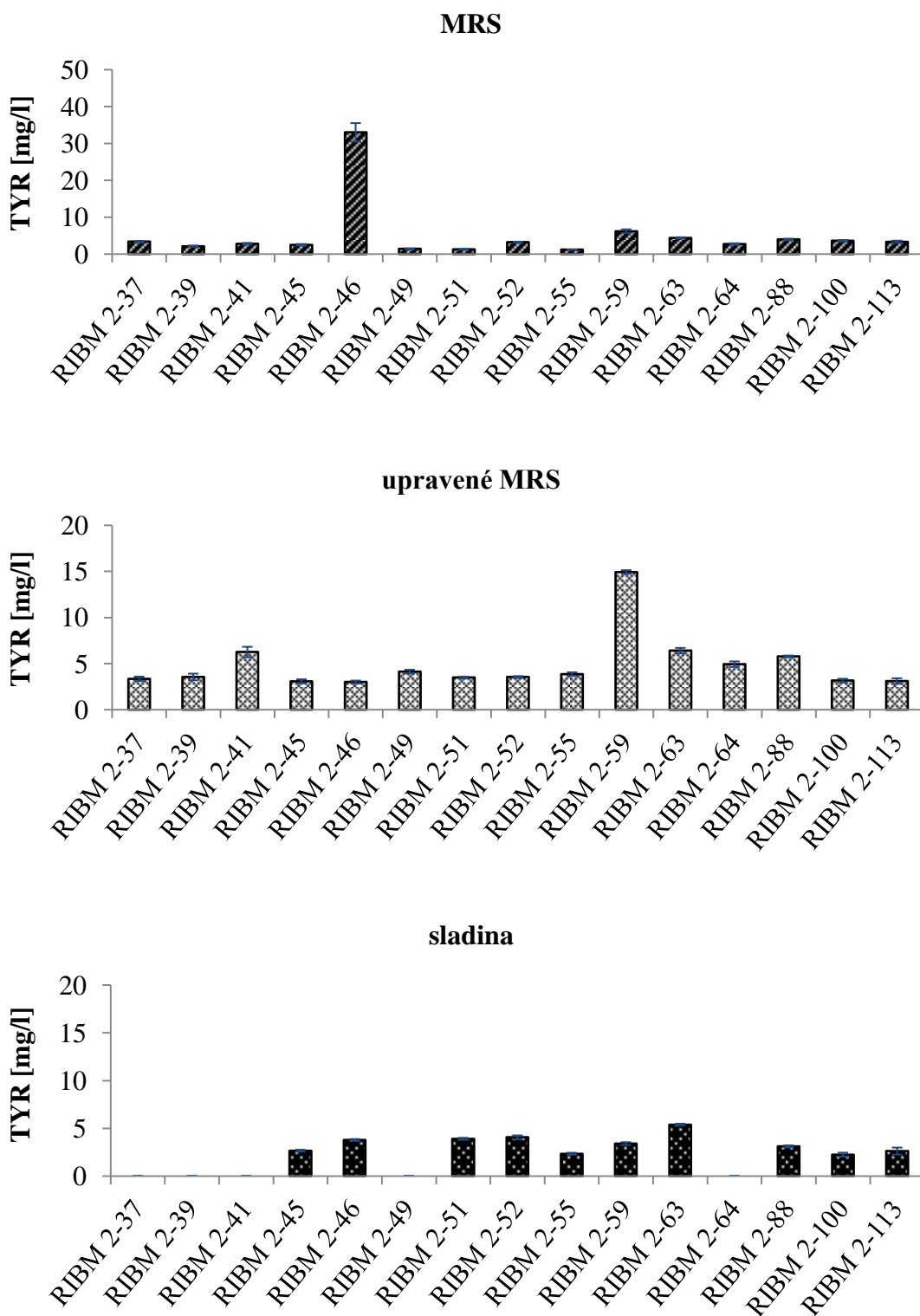
V upraveném médiu MRS s faktory, které měly simulovat prostředí výčepního piva, byla produkce kmeny *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-22, 2-30 a 2-46 zhruba desetkrát menší (Obr. 4 a 5). Mírněji byla produkce tyraminu v tomto médiu potlačována u kmenů *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-1, 2-26, 2-37, 2-100 a 2-113. Nicméně produkce 23 kmenů *Lb. casei/paracasei* dosahovala v upraveném médiu či sladině vyšších hodnot než v médiu MRS (Obr. 4 a 5). Podporu produkce tyraminu vykazovalo tedy v upraveném médiu 15 kmenů, ve sladině 1 kmen (RIBM 2-1) a v obou médiích zbylých 7 kmenů (RIBM 2-27, 2-35, 2-45, 2-51, 2-52, 2-55, 2-63). Přesto nejvyšší vyprodukované koncentrace tyraminu nepřesahovaly jak v upraveném médiu, tak ve sladině 15 mg/l. U některých kmenů dokonce nebyla tvorba tyraminu v prostředí sladiny detekována.

Produkce tyraminu kmeny *Lb. casei/paracasei* nedosahovala tak vysokých hodnot jako u kmenů *Lb. brevis* a *Lb. buchneri*. Kmeny *Lb. brevis* a *Lb. buchneri* byly schopné vyprodukovat takové koncentrace tyraminu, které byly, zvláště v případě média MRS s aminokyselinami, toxikologicky významné (Tab. 5 a 6). Silla-Santos (1996, s. 224) uvádí v potravinách maximální přípustnou úroveň tyraminu v rozmezí 100-800 mg/kg a histaminu 50-100 mg/kg. Obecně platí, že v alkoholických nápojích se za toxickou dávku považuje již množství 25-40 mg/l tyraminu a 8-20 mg/l histaminu (Spano et al., 2010, s. 97). Pokud by byla tato množství BA vyprodukována v pivu, díky interferenci s etanolem by mohla ohrozit zdraví spotřebitele (Loret, Deloyer a Dandrifosse, 2005, s. 519-520; Romero et al., 2003, s. 162).





Obr. 4: Produkce tyraminu (TYR) vybranými kmeny *Lactobacillus casei/paracasei* po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve třech různých médiích; MRS s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His), upravené MRS (pH 4,8; 4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) a ve sladíně.



Obr. 5: Produkce tyraminu (TYR) vybranými kmeny *Lactobacillus casei/paracasei* po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve třech různých médiích; MRS s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His), upravené MRS (pH 4,8; 4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) a ve sladini.

Produkce vybranými kmeny *Lb. brevis* (RIBM 2-69, 2-70 a 2-72) byla nejvyšší v médiu MRS (Tab. 5). Nejvyšší detekovaná hodnota tyraminu ( $283,7 \pm 22,1$  mg/l) byla stanovena v supernatantu po kultivaci kmene *Lb. brevis* RIBM 2-70.

V případě média MRS s přísadkami etanolu a hořkých látek byla produkce tyraminu kmene *Lb. brevis* výrazně snížena (v některých případech až o více než 90 %). V tomto modifikovaném prostředí MRS bujónu byly detekované hodnoty tyraminu (Tab. 5) v rozmezí 11,3-21,6 mg/l u kmenů *Lb. brevis* do jisté míry analogické s vyprodukovaným množstvím kmenem *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-59. Nejnižší produkce kmene *Lb. brevis* byly zaznamenány v prostředí sladiny. Výjimkou byl však kmen *Lb. brevis* RIBM 2-70, u kterého bylo zjištěno množství tyraminu srovnatelné s nejvyšší hodnotou detekovanou u kmene *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-22 v médiu MRS s aminokyselinami.

Tab. 5: Produkce tyraminu vybranými kmeny *Lactobacillus brevis* v médiu MRS s přísadkami aminokyselin, upraveném médiu MRS a ve sladince při 30 °C po 48 hodinách kultivace.

| kmeny <i>Lb. brevis</i> | MRS – TYR* | upravené MRS – TYR* | sladina – TYR* |
|-------------------------|------------|---------------------|----------------|
| RIBM 2-69               | 177,5±10,3 | 15,9±1,4            | 11,6±1,1       |
| RIBM 2-70               | 283,7±22,1 | 11,3±1,0            | 49,0±5,1       |
| RIBM 2-72               | 231,1±7,0  | 21,6±2,2            | 9,6±1,0        |

\* TYR...produkce tyraminu

Nejvyšší hodnota tyraminu  $332,8 \pm 23,4$  mg/l v rámci skrínungu dekarboxylázové aktivity 36 vybraných kmenů byla zaznamenána v supernatantu po kultivaci kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 v bujónu MRS (Tab. 6). U ostatních 2 kmenů *Lb. buchneri* byla produkce v daném médiu výrazně nižší. Dokonce kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-73 vyprodukoval množství <5,0 mg/l, tedy množství shodné s některými kmeny *Lb. casei/paracasei* (RIBM 2-26 a 2-88).

Stejně jako v bujónu MRS s aminokyselinami vynikal produkcí kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-9 v médiu s přísadkami faktorů imitace piva. Vyprodukované množství bylo srovnatelné s hodnotou u kmene *Lb. brevis* RIBM 2-72. Produkce ostatních 2 kmenů byla zanedbatelná.

Sladina se zdála být pro kmeny *Lb. buchneri* příhodnějším prostředím než médium simulující prostředí piva. Pouze kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-15 vyprodukoval množství tyraminu <5,0 mg/l. Kmen, který za podmínek *in vitro* (MRS s přísadkami aminokyselin) produkoval nejvyšší množství tyraminu – *Lb. buchneri* RIBM 2-9 – byl schopen ve sladince

vyprodukovat pouze 10 % původní hodnoty tyraminu, kterou byl schopen vytvořit v MRS bez faktorů. I tak by toto množství, v případě alkoholického nápoje, mohlo znamenat potenciální riziko ohrožení zdraví spotřebitele.

*Tab. 6: Produkce tyraminu vybranými kmeny *Lactobacillus buchneri* v médiu MRS s přísadkami aminokyselin, upraveném médiu MRS a ve sladidě při 30 °C po 48 hodinách kultivace.*

| <b>kmeny <i>Lb. buchneri</i></b> | <b>MRS – TYR*</b> | <b>upravené MRS – TYR*</b> | <b>sladina – TYR*</b> |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|
| RIBM 2-9                         | 332,8±23,4        | 21,7±2,2                   | 33,3±1,7              |
| RIBM 2-15                        | 92,3±9,5          | 3,2±0,3                    | 2,9±0,1               |
| RIBM 2-73                        | 4,8±0,4           | 3,4±0,4                    | 58,3±5,6              |

\* TYR...produkce tyraminu

## 7.2 Výsledky Experimentu II

Za účelem sledování kinetiky produkce BA byl vybrán kmen *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9. U kmene byl testován vliv faktorů etanolu (0, 2, 3, 4 % (v/v)), směsi hořkých látek (0, 5, 10, 20 mg/l) a teploty (30 °C, 10 °C) na dekarboxylázovou aktivitu a na růstové chování za podmínek *in vitro*. Kinetika produkce byla sledována u tyraminu, jako nejhojněji produkovaného BA.

### 7.2.1 Růstové chování kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9

Z průběhu růstových křivek bylo zřejmé, že kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-9 byl schopný růstu za všech testovaných podmínek. Růst vybraného kmene byl při desetistupňové teplotě pomalejší než při 30 °C.

Přídavek etanolu v rámci testovaných koncentrací 0-4 % (v/v) při 30 °C nezpůsobil inhibici růstu *Lb. buchneri* RIBM 2-9 (Příloha P II, Obr. 1). Testovaný kmen byl odolný i vůči nejvyšší, 4% (v/v), testované koncentraci etanolu. Schopnost adaptace na tuto nebo jinou inhibiční látku může být dána tím, že byly kmeny izolovány z procesu výroby piva. Při 10 °C byl již růst testovaného kmene v přítomnosti etanolu ovlivňován (Příloha P II, Obr. 2). Vyšší přídavky etanolu 3 a 4 % (v/v) viditelně potlačily množení *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Spolupůsobení kombinace faktorů tedy rozvoj kmene v dekarboxylačním médiu ovlivnila.

Přídavky hořkých látek způsobily inhibici růstu zkoušeného kmene při obou testovaných teplotách (Příloha P II, Obr. 3 a 4). Výraznější inhibici růstu bylo možné pozorovat při nejvyšší koncentraci hořkých látek 20 mg/l.

Kombinace etanolu a hořkých látek taktéž inhibovaly růst *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Tento trend bylo možné pozorovat při obou testovaných teplotách (Příloha P II, Obr. 5-10). Největší inhibiční účinek v rámci všech sledovaných faktorů byl prokázán v médiu s přídavky nejvyšší koncentrace etanolu 4 % (v/v) a hořkých látek 20 mg/l (Příloha P II, Obr. 9 a 10). Tyto podmínky byly pro růst vybraného kmene nejméně přívětivé. Je možné konstatovat, že s rostoucím přídavkem hořkých látek v kombinaci s etanolem docházelo k potlačení růstu testovaného kmene. Výjimkou však byla kombinace 3 % (v/v) etanolu s hořkými látkami, která při desetistupňové teplotě nevykazovala viditelnou inhibici růstu.

### 7.2.2 Vývoj pH kultivačního prostředí

Kromě růstu, byla také sledována změna pH růstového prostředí během kultivace *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Změna pH jednoznačně souvisí s růstovým chováním. Hodnoty pH se měnily v důsledku produkce metabolitů kyselé či alkalické povahy. Mezi kyselé produkty náleží organické kyseliny, zvláště kyselina mléčná a mezi alkalické látky, které pH ovlivní, můžeme zařadit právě BA.

Vlivem fermentační aktivity kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 se pH kultivačního média nejdříve snížilo. Produkci BA však docházelo k alkalizaci prostředí a tedy k mírnému nárůstu pH během kultivace. Nicméně u některých variant médií mohl být pozorován nárůst kyselosti i přes hojnou produkci BA (Příloha P III, Obr. 3, 5, 7, 9).

Iniciační hodnoty pH médií s přidavky etanolu 0-4 % (v/v) zaznamenaly během kultivace při 30 °C pokles (Příloha P III, Obr. 1). Tím, že nebyl rozvoj *Lb. buchneri* RIBM 2-9 v rámci testovaných hodnot přidavků etanolu omezen, došlo jeho rozsáhlou fermentační aktivitou k viditelnému poklesu pH. Největší pokles byl pozorován mezi druhou a 12 hodinou kultivace. Po dvanácté hodině kultivace došlo k mírnému zvýšení pH. V případě desetistupňové teploty byl zaznamenán na konci kultivace (po 15 dnech) mírnější pokles pH (Příloha P III, Obr. 2). Vývoj pH opět odpovídal nárůstu kmene, kdy kombinace nejvyššího přidavku etanolu 4 % (v/v) a nízké teploty měla na růst testovaného kmene inhibiční účinek. K výraznému poklesu pH tedy nedošlo.

Hodnoty pH médií s přidavky hořkých látek (směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) dosahovaly při obou kultivačních teplotách vyšších hodnot, jelikož přítomnost těchto látek působila na růst daného kmene inhibičně (Příloha P III, Obr. 3 a 4). Při 30 °C měl vývoj pH médií s koncentracemi hořkých látek 10 a 20 mg/l klesající charakter (Příloha P III, Obr. 3).

Při testování vzájemných kombinací faktorů bylo možné pozorovat závislost vývoje pH na růstu kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Médium s přidavky etanolu 4 % (v/v) a hořkých látek 20 mg/l, které potlačovalo růst vybraného kmene nejvíce, dosahovalo pH nejvyšších detekovaných hodnot. Při 30 °C byla na konci kultivace detekována hodnota pH  $4,5 \pm 0,1$  (Příloha P III, Obr. 9), naopak při 10 °C bylo pH  $5,2 \pm 0,1$  (Příloha P III, Obr. 10).

### 7.2.3 Kinetika produkce tyraminu kmenem *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9

Dle získaných výsledků byla kinetika produkce tyraminu při obou testovaných teplotách výrazně ovlivňována přidavky etanolu a hořkých látek. Vliv těchto faktorů byl hodnocen jak samostatně, tak ve vzájemných kombinacích. U kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 byly detekovány při 30 °C vyšší koncentrace tyraminu, než mohly být v médiích se stejnými kombinacemi faktorů pozorovány při nižší zkoušené teplotě 10 °C.

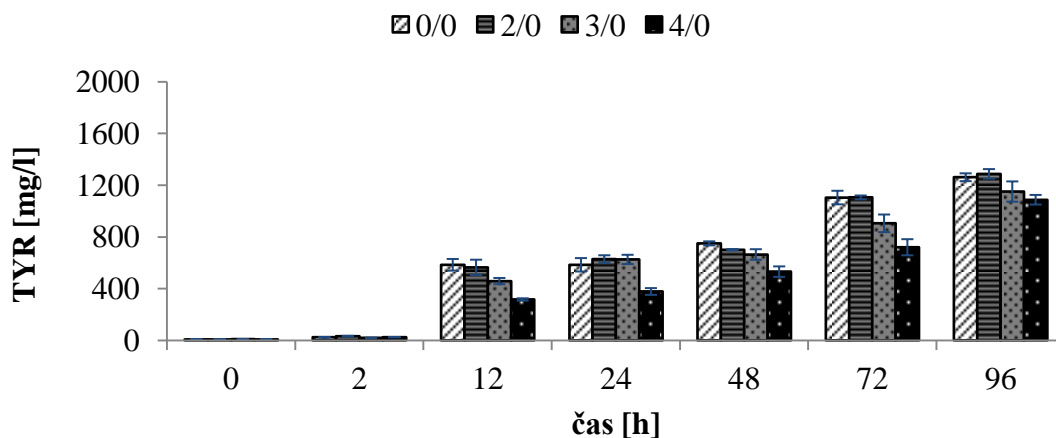
Produkce tyraminu dosahujících hodnot >200 mg/l byla při 30 °C zaznamenána po 12 hodinách kultivace a při 10 °C po 7 dnech. Je tedy jasné, že teplota měla na růst a produkci tyraminu významný vliv (Obr. 6-15).

Produkce tyraminu byla obecně sledována v exponencionální a stacionární fázi růstu testovaného kmene (Příloha P II, Obr. 1-10).

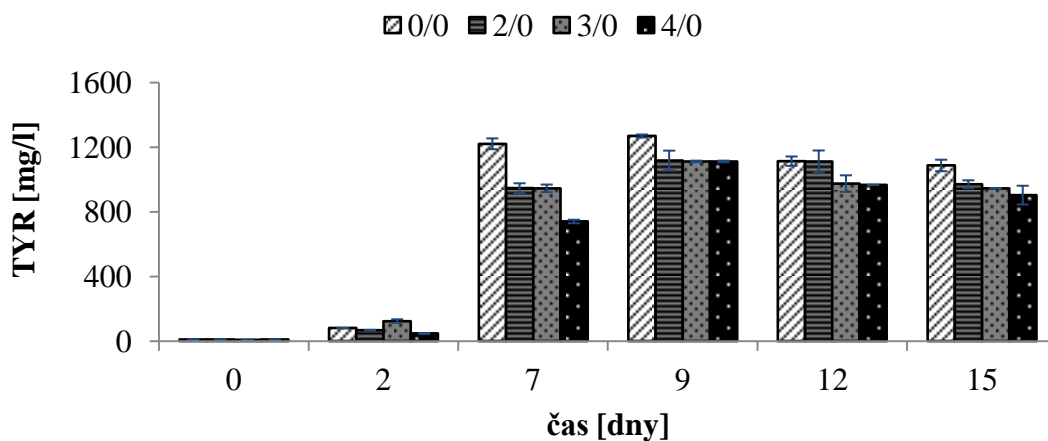
Při 30 °C byla maximální produkce tyraminu dosažena po 96 hodinách kultivace, kdy nejvyšší hodnota tyraminu 1640,3±65,8 mg/l byla detekována v médiu za přidavku 2 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek.

Při 10 °C byla maximální produkce zaznamenána po 7 dnech kultivace. Nejvyšší hodnota při této teplotě, 1268,2±9,5 mg/l tyraminu, byla detekována v médiu bez přidavku etanolu a hořkých látek. Po 15 dnech kultivace se však detekované množství tyraminu oproti maximálním hodnotám mírně snížilo. To mohlo být způsobeno využitím tyraminu jako zdroje energie v důsledku dlouhé kultivace (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 396; Spano et al., 2010, s. 95-96).

V rámci zkoušení etanolu lze konstatovat, že rostoucí přidavky etanolu potlačovaly produkci tyraminu kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9 (Obr. 6, 7). Nejvýrazněji byla tvorba tyraminu inhibována v médiu s 4 % (v/v) přidavkem etanolu. Tento jev mohl být pozorován i přesto, že růst vybraného kmene při 30 °C nebyl potlačen (Příloha P II, Obr. 1). Maximální detekované hodnoty tyraminu v médiu s 4 % (v/v) etanolu činily 1087,2±37,3 mg/l při teplotě 30 °C a 1111,1±4,9 mg/l při 10 °C. Samostatný přídavek etanolu v rozsahu testovaných hodnot tedy nezpůsobil významnou inhibici produkce. Nejnižší přídavek etanolu 2 % (v/v) však nepůsobil při třicetistupňové kultivační teplotě inhibičně. Detekovaná hodnota tyraminu (1287,4 ±36,6 mg/l) byla dokonce za zmíněných podmínek vyšší než v médiu bez přidavku etanolu.



Obr. 6: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 0, 2, 3, 4 % (v/v) a bez přidavku směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.

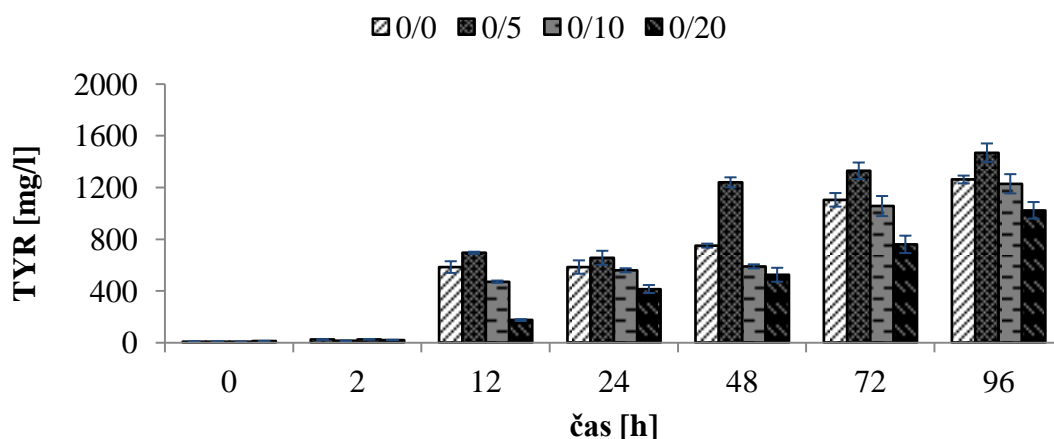


Obr. 7: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 0, 2, 3, 4 % (v/v) a bez přidavku směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.

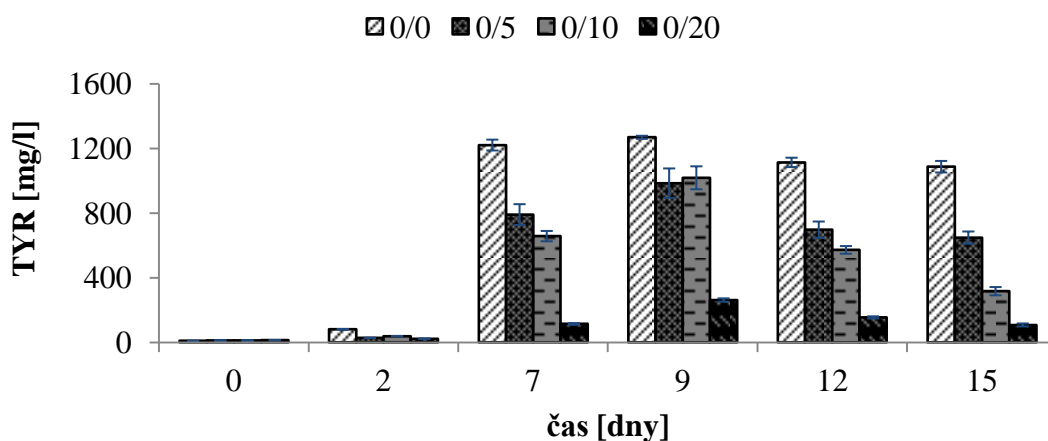
Mezi další faktory, které měly výrazný vliv na růst zkoušeného kmene a tím i na produkci tyraminu, se řadí přítomnost hořkých látek s prokazatelným antimikrobiálním účinkem. Nejnižší přidavek hořkých látek 5 mg/l při třicetistupňové teplotě podporoval tvorbu tyraminu dle Obr. 8. Detekovaná hodnota 1468,3 $\pm$ 71,6 mg/l tyraminu byla téměř o 15 % vyšší než v médiu bez přidavku hořkých látek (1261,2 $\pm$ 30,3 mg/l). Nejvýraznější inhibiční



účinek projevoval nejvyšší přídavek hořkých látek 20 mg/l. Při 30 °C bylo v těchto podmínkách detekováno maximální množství tyraminu  $1022,9 \pm 64,2$  mg/l, tedy množství srovnatelné v médiu s 4 % (v/v) etanolu. Při 10 °C bylo detekováno  $261,4 \pm 10,4$  mg/l tyraminu. Kombinace hořkých látek s nízkou teplotou tedy výrazně potlačila produkci tyraminu (Obr. 9).



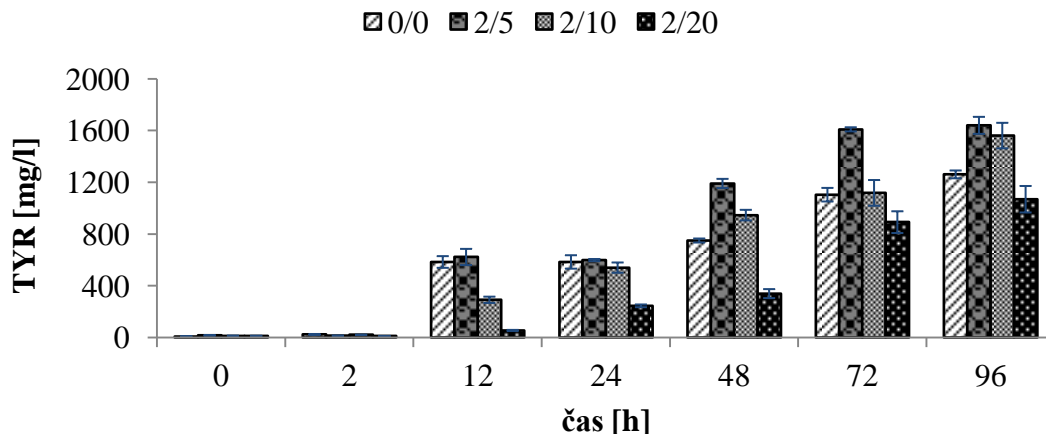
Obr. 8: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu bez přídavku etanolu a s přídavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



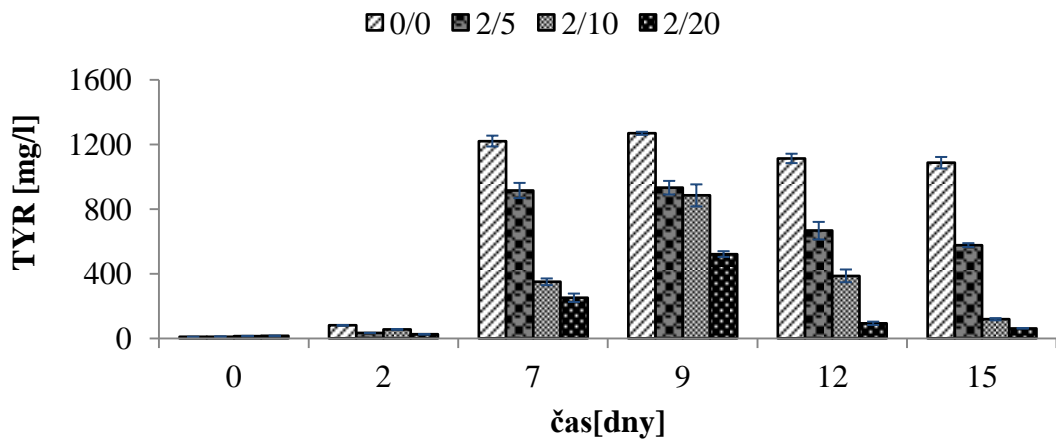
Obr. 9: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu bez přídavku etanolu a s přídavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

Je třeba podotknout, že nejen některé koncentrace faktorů (2 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek), ale také vzájemné kombinace faktorů nepůsobily inhibičně a produkci významně podpořily. Tato skutečnost se týkala přídavek etanolu, především v kombinaci s nejnižší koncentrací hořkých látek 5 mg/l, a to opět při třicetistupňové kultivační teplotě (Obr. 10, 12 a 14). Při 10 °C nebyla podpora tyraminu ve stejném médiu pozorována (Obr. 11, 13 a 15).

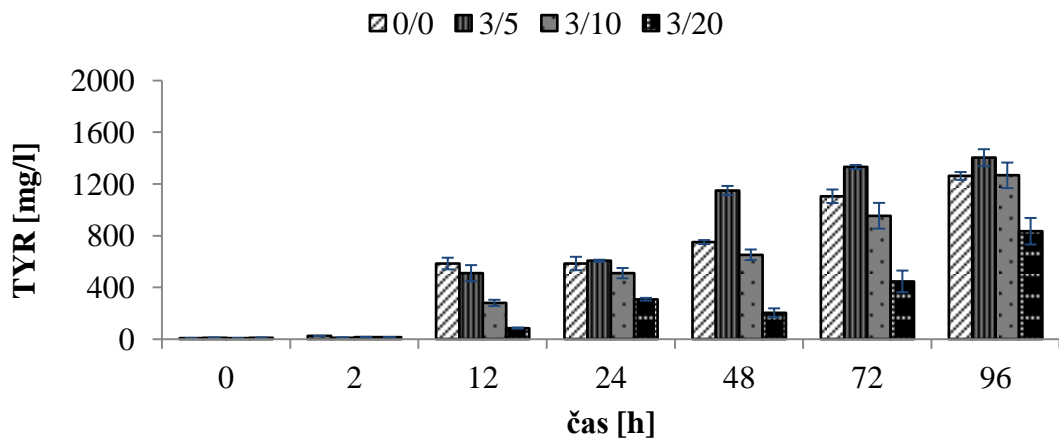
Při 30 °C byla tvorba tyraminu nejviditelněji podpořena v médiu s 2 % (v/v) etanolu v kombinaci s 5 mg/l hořkých látek. V těchto podmínkách byla detekována nejvyšší hodnota tyraminu  $1640,3 \pm 65,8$  mg/l v rámci kinetiky. Vzájemné kombinace s vyššími přídávky etanolu (3 a 4 % (v/v)) však podporovaly produkci méně, než samotné působení hořkých látek 5 mg/l. Inhibiční účinek nevykazoval také přídavek 2 % (v/v) etanolu s 10 mg/l hořkých látek (Obr. 10). Nicméně na růst vybraného kmene nepůsobila inhibičně pouze kombinace 3 % (v/v) etanolu s hořkými látkami při 10 °C. Produkce tedy nevykazuje s nárůstem daného kmene souhlasný trend.



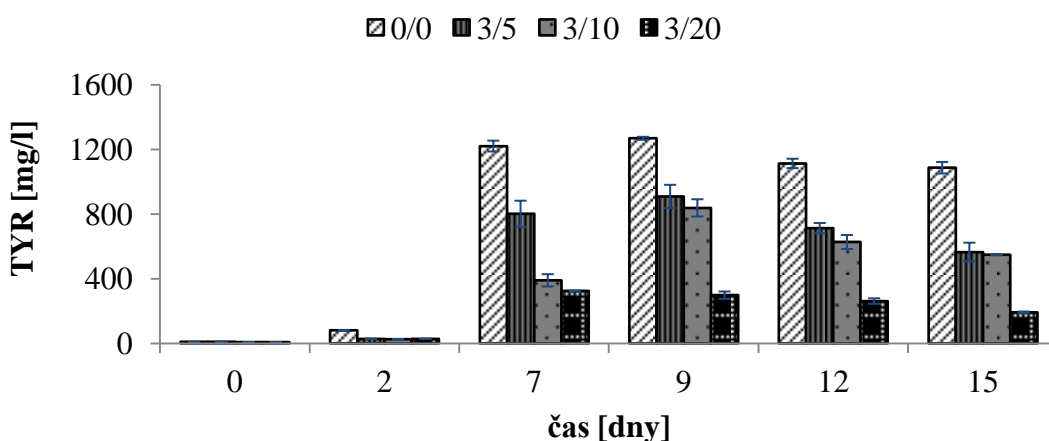
Obr. 10: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přídávky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



Obr. 11: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

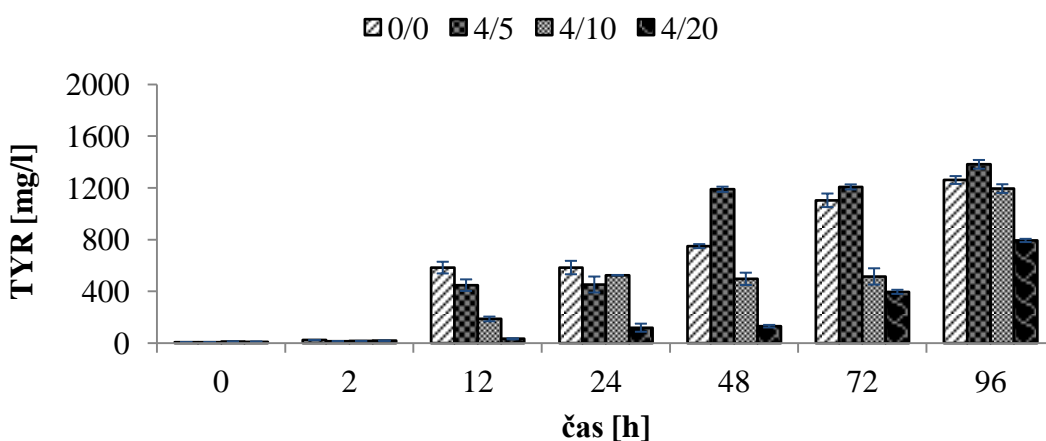


Obr. 12: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

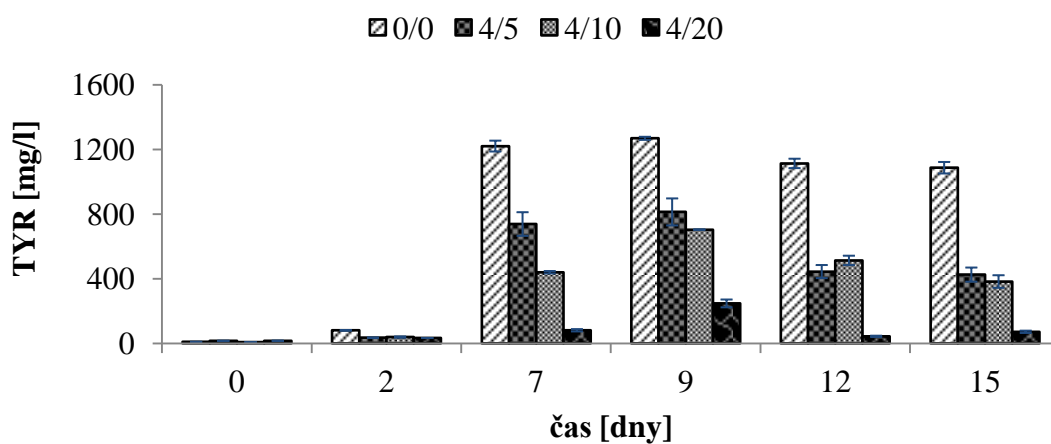


Obr. 13: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

Při nejvyšších testovaných koncentracích faktorů (etanol 4 % (v/v) a hořké látky 20 mg/l) byla prokázána jak nejnižší produkce tyraminu, tak nárůst daného kmene (Příloha P II, Obr. 9 a 10). V takovém médiu bylo vyprodukováno 793,7 $\pm$ 75,8 mg/l tyraminu při 30 °C (Obr. 14) a 246,99 $\pm$ 24,12 mg/l při 10 °C (Obr. 15).



Obr. 14: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



Obr. 15: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

## 8 DISKUZE

V rámci této diplomové práce byl uskutečněn skríníng dekarboxylázové aktivity u vybraných kmenů laktobacilů *in vitro* a ve sladině. Tyto kmeny byly izolovány z procesu výroby piva jako bakteriální kontaminanty a poskytnuty Výzkumným ústavem pivovarského a sladařského v Praze. Skríníng byl realizován ve třech variantách dekarboxylačních médií.

Z důvodu nedostatků odborné literatury pojednávající o produkci BA, především tyraminu, zástupci *Lactobacillus buchneri*, byla do práce zahrnuta i experimentální část, která se zabývala kinetikou produkce tyraminu a vlivem vybraných faktorů na průběh kumulace tyraminu za podmínek *in vitro*. Tato část diplomové práce může přispět k objasnění vlivu hořkých látek, etanolu a kultivační teploty na rozvoj a produkci tyraminu zástupci *Lb. buchneri*. Kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-9 byl za testovaných podmínek (rozsah faktorů) schopen produkce vysokých koncentrací tyraminu, které by mohly, v případě stejně rozsáhlé tyrozindekarboxylázové aktivity v pivu, ohrozit zdravotní stav konzumentů.

Obecně jsou zástupci rodu *Lactobacillus* nejobávanější kontaminací v pivovarském průmyslu, která zhoršuje mikrobiální kvalitu piva. Schopnost laktobacilů kazit pivo závisí na jeho složení, zejména na obsahu antibakteriálních hořkých látek (Basařová et al., 2010, s. 318-325). V souvislosti s tímto tvrzením lze uvést, že výsledky této práce ukazují inhibiční působení hořkých látek (směs izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) na růst a produkci tyraminu. Zvláště pak mohl být inhibiční účinek sledován v kombinaci s přísávkou etanolu.

Některé druhy laktobacilů jsou však rezistentní k hořkým látkám, a tím pádem mohou v prostředí piva, které vytváří nepříznivé podmínky, růst a množit se (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 336-337). Rezistenci nejčastěji vykazuje *Lb. brevis*, méně často pak *Lb. buchneri* (Basařová et al., 2010, s. 324). I námi vybraný kmen, zástupce druhu *Lb. buchneri*, byl schopen růst a navíc produkovat BA v prostředí s přísávkou těchto látek. Ve většině případů působila zkoušená směs hořkých látek v kombinaci s etanolem alespoň mírnou inhibicí (byla ovlivněna kumulace tyraminu i rozvoj kmene). Autoři Behr, Gänzle a Vogel (2006, s. 6483-6492) uvádí, že v souvislosti s přítomností hořkých látek byl snižován etanolový stres u vysoce rezistentního a adaptovaného kmene na hořké látky *Lb. brevis* TMW 1.465. Tento jev mohl sehrát roli právě v případě kombinace 2 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek, při které byla detekována nejvyšší produkce tyraminu kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9.

Konzumace piva může vést ke zdravotním problémům, především z důvodu přítomnosti BA a etanolu. Nebezpečí spočívá v interferenci etanolu s detoxikačním mechanismem a následným snížením jeho účinnosti (Loret, Deloyer a Dandrifosse, 2005, s. 519-520; Romero et al., 2003, s. 162). Navíc přítomný alkohol může umocňovat účinky tyraminu. U zdravých jedinců nepředstavuje riziko množství tyraminu <10 mg/l. Nicméně pro pacienty užívající léky blokující enzym MAO (např. psychofarmaka) je považován za nebezpečný příjem množství vyšší >6 mg/l tyraminu během 4 hodin či konzumace piva s obsahem tyraminu >10 mg/l. U takových spotřebitelů byla pozorována hypertenzní krize (Kalač a Křížek, 2003, s. 124).

Vyprodukovaná množství tyraminu testovaným kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9 za podmínek *in vitro* byla mnohonásobně vyšší, a to i za působení nízké teploty a nejvyšších testovaných koncentrací etanolu a směsi hořkých látek (10 °C, 4 % etanolu a 20 mg/l izo- $\alpha$ -hořkých látek). Reálný systém potravinové matrice, tedy piva, se však od laboratorního média liší svým chemickým složením, a tak lze očekávat, že by se díky tomu mohl rozsah produkce tyraminu výrazně vymykat hodnotám zjištěným za podmínek *in vitro*. Zvláště je nutné si uvědomit, že hlavní kulturou jsou kvasinky (Basařová et al., 2010, s. 310), které mohou s BMK soutěžit o substráty a tím také omezovat samotnou produkci BA.

Některé dostupné studie prokázaly, že produkce BA izoláty BMK z vína nebyla inhibována ani při takových koncentracích etanolu, které jsou pro víno charakteristické. Například produkce tyraminu izoláty *Lb. brevis* z vína nebyla inhibována při 10 % (v/v) etanolu (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 59). Mazzoli et al. (2009, s. 88) zjistili, že na produkci histaminu izoláty *Lb. hilgardii* nepůsobilo inhibičně 9 % (v/v) etanolu, zatímco koncentrace etanolu 13 % (v/v) již produkci potlačovala. Alkoholovitosti vína odpovídají převážně zahraniční piva např. piva speciální, svrchně kvašená (stout, porter) atd. (Basařová et al., 2010, s. 561-562).

Na produkci tyraminu kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9 měla vliv také teplota a délka kultivace. Marcobal et al. (2006, s. 423) zjistili, že doba kultivace je považována za nejdůležitější faktor ovlivňující růst *Lb. brevis*. Pleva et al. (2012, s. 47) uvádí, že ze všech studovaných faktorů (teplota, dostupnost O<sub>2</sub>, koncentrace NaCl), právě teplota byla schopna zpomalit buněčný růst, prodloužit generační dobu a úměrně tomu i tvorbu BA.

S produkcí tyraminu souviselo i pH, které vlivem obranného mechanismu proti překyselení buňky vzrostlo. Nárůst pH o 0,2 by pak mohl mít za následek snížení toxického účinku hořkých látek až o polovinu (Briggs et al., 2004, s. 623).

Podle autorů Bover-Cid a Holzapfel (1999, s. 35-40) a také Lorencové et al. (2012, s. 2090) laktobacily nejhojněji produkovaly tyramin, což odpovídá experimentu prvotního skrínungu. Rozdíly v produkci tohoto BA byly patrné nejenom v rámci odlišného složení dekarboxylačních médií, ale také mezi druhy a zejména příslušnými kmeny daného druhu. Tyto výsledky tedy poukazují na to, že schopnost produkovat BA je spíše kmenovou specifitou, což dokládají i studie např. Buňková et al. (2009, 2011).

Obecně je rozsah produkce BA ovlivňován množstvím aminokyselin dostupných v prostředí. Vyšší koncentrace prekurzorů znamená potenciál vyšší produkce (Juneja a Sofos, 2010, s. 249-250). Z Tab. 7 je zřejmé, že bujón MRS obsahoval více prekurzorů pro vznik BA, než bylo detekováno ve vzorku extraktu sladu. Obsah prekurzoru tyraminu, tyrozinu, byl v médiu MRS až třikrát vyšší. Hodnoty uvedené v Tab. 7 jsou pro MRS bujón bez suplementace 0,3 % (w/v) aminokyselin. Námí obohacené laboratorní médium tedy skýtalo pro produkci BA mnohem více prekurzorů.

Nejvíce produkovaným BA byl v rámci prvotního skrínungu tyramin (bez ohledu na přísady ostatních aminokyselin, Arg, Lys, Phe, His a Orn). Výrazně vyšší koncentrace tyraminu byly detekovány v médiu MRS než ve sladince. Výsledky skrínungu v souvislosti s analýzou médií tedy potvrzují, že rozsah produkce BA je přímo závislý na množství přítomných prekurzorů.

Tab. 7: Obsah vybraných aminokyselin v bujónu MRS a ve sladince (g/l).

| AMK* | MRS  | sladina |
|------|------|---------|
| Tyr  | 0,33 | 0,13    |
| Arg  | 0,52 | 0,23    |
| Lys  | 0,30 | 0,15    |
| Phe  | 0,97 | 0,16    |
| His  | 0,71 | 0,25    |
| Orn  | ND** | ND**    |

\*AMK...aminokyselina, \*\*ND...aminokyselina nebyla detekována; aminokyseliny v tabulce uváděny v g/l hydratovaného MRS bujónu či sladině



Námi zvolený extrakt sladu, v porovnání s médiem MRS, nebyl bohatý na obsah vybraných aminokyselin. Sladina je však obecně bohatý živný substrát, který disponuje pro rozvoj laktobacilů příznivým pH (5,0-5,5) (Basařová et al., 2010, s. 329).

V bujónu MRS vykazovaly nejnižší produkci tyraminu z 36 testovaných kmenů zástupci *Lb. casei/paracasei*. Přičemž maximální detekovaná hodnota ( $45,9 \pm 0,4$  mg/l) tyraminu byla vyprodukována kmenem *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-22. Nejvyšší produkci tyraminu ( $332,8 \pm 23,4$  mg/l) vykazoval *Lb. buchneri* RIBM 2-9 v rámci uskutečněného skríningu. Dále hojnou produkcí disponovaly i kmeny *Lb. brevis*. Schopnost hojné produkce tyraminu zástupci *Lb. brevis* uvádí i Lorencová et al. (2012, s. 2089). Bover-Cid a Holzapfel (1999, s. 40) taktéž považovali *Lb. brevis* a *Lb. buchneri* za hlavní producenty tyraminu. Tito autoři detekovali po čtyřdenní kultivaci při 37 °C obsah tyraminu 516-3589 mg/l u kmenů *Lb. brevis* a 7641 mg/l u jednoho z testovaných kmenů *Lb. buchneri* (Bover-Cid a Holzapfel, 1999, s. 40). Velké rozdíly v rozsahu produkce tyraminu zástupci *Lb. brevis* a *Lb. buchneri* ve zmíněné studii v porovnání s námi provedeným skríninkem byl zjevně způsoben odlišnými podmínkami kultivace.

Skrínink všech 36 kmenů byl proveden nejen v aminokyselinami suplementovaném MRS bujónu, ale také v MRS, které obsahovalo specifickou koncentraci etanolu a hořkých látek a s nastavenou hodnotou pH. Tyto podmínky měly médium přiblížit podmínkám, které by pro rozvoj kmene poskytovalo méně hořké, výčepní pivo. Takto upravené médium MRS představovalo oproti bujónu MRS méně přívětivé prostředí, zvláště pro kmeny *Lb. brevis* a *Lb. buchneri*. Vzhledem ke stejnému aminokyselinovému složení obou médií, lze nižší produkci přisoudit inhibičnímu působení přítomných faktorů. Je třeba podotknout, že produkce tyraminu jak v upraveném médiu, tak ve sladince nebyla zcela potlačena. Dokonce vyprodukováno množství ( $>20$  mg/l), zvláště kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9 by mohlo představovat v obou médiích potenciální riziko nejen pro citlivé osoby a pacienty léčené psychofarmaky ( $>6$  mg/l tyraminu), nýbrž i pro zdravé jedince, u kterých není považováno množství tyraminu  $<10$  mg/l za nebezpečné (Kalač a Křížek, 2003, s. 124).

Kalač, Hlavatá a Křížka, 1997, s. 212 detekovali poměrně vysoké množství 20-24 mg/kg tyraminu již ve sladu, čímž by se kumulace tyraminu mohla podpořit. Kmeny, které vykazují tyrozindekarboxylázovou aktivitu by mohly k danému množství tyraminu, které se již může ze suroviny dostat do sladiny, přispět a zvýšit tak riziko ohrožení zdraví spotřebitele.

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývala dekarboxylázovou aktivitou izolátů kmenů laktobacilů z procesu výroby piva za podmínek *in vitro* a ve sladině. U vysoce produkčního kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 bylo navíc realizováno sledování kinetiky produkce tyraminu ovlivněné vybranými faktory *in vitro*. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že:

- Studované kmeny laktobacilů v rámci skríningu nejhojněji produkovaly tyramin. Ostatní biogenní aminy nebo polyaminy byly detekovány v zanedbatelném množství.
- Nejvyšší koncentrace tyraminu byly detekovány zvláště v médiu MRS s přidavky aminokyselin. Rozdílná produkce byla dána množstvím prekurzorů, kdy nejmenší množství bylo obsaženo ve sladině.
- Produkce tyraminu se lišila v rámci kmenů stejného druhu. Produkci vynikaly kmeny *Lb. buchneri*, které byly schopné vyprodukovat ve všech testovaných médiích nejvyšší množství tyraminu (až  $332,8 \pm 23,4$  mg/l).
- Největším producentem tyraminu prvotního skríningu a zároveň zástupce málo prozkoumaného druhu v rámci tyrozindekarboxylázové aktivity byl kmen *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Tento kmen byl podroben dalšímu zkoumání, kdy byla sledována kinetika produkce tyraminu kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9. Byl testován vliv kultivační teploty, přidavku hořkých látek a etanolu.
- Teplota 10 °C potlačovala růst kmene *Lb. buchneri* RIBM 2-9 a produkci tyraminu.
- Hořké látky měly významný vliv jak na růst testovaného kmene, tak na produkci tyraminu. Koncentrace hořkých látek 20 mg/l, zejména v kombinaci s etanolem a nízkou teplotou, nejvýrazněji potlačovala produkci tyraminu.
- V médiu s přidavkem 2 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek při teplotě 30 °C byla detekována nejvyšší hodnota tyraminu  $1640 \pm 65,8$  mg/l. Tento fakt může poukazovat na minimalizaci etanolového stresu v přítomnosti hořkých látek.
- Vyprodukovaná množství tyraminu kmenem *Lb. buchneri* RIBM 2-9 by, v případě stejně rozsáhlé produkce v pivu, mohla ohrozit zdravotní nezávadnost výrobku a představovat riziko pro zdraví spotřebitele.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

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

ADAMS, Martin R. a Maurice O. MOSS. *Food Microbiology*. Vyd. 3. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2008, 477 s. ISBN: 978-0-85404-284-5

BERNARDEAU, M. et al. Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The *Lactobacillus* Genus. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, roč. 126, s. 278-285. ISSN: 0168-1605

BEHR, Jürgen a Rudi F. VOGEL. Mechanisms of Hop Inhibition Include the Transmembrane Redox Reaction. *Applied an Environmental Microbiology*. 2010, roč. 76, s. 142-149. ISSN: 1462-2920

BEHR, J., M. G. GÄNZLE a R. F. VOGEL. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, s. 6483-6492. ISSN: 1462-2920

BOVER-CID, S. et al. Contribution of Contaminant Enterobacteria and Lactic Acid Bacteria to Biogenic Amine Accumulation in Spontaneous Fermentation of Pork Sausages. *European Food Research and Technology*. 2003, roč. 216, s. 477-482. ISSN: 1438-2377

BOVER-CID, Sara a Wilhelm H. HOLZAPFEL. Improved Screening Procedure for Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 53, s. 33-41. ISSN: 0168-1605

BRIGGS, D. E. et al. *Brewing Science and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing. 2004, s. 607-610. 17.2 The Microbiological Threat to the Brewing Process. ISBN: 1-85573-906-2 (e-book)

BUIATTI, S. et al. Determination of Biogenic Amines in Alcoholic and Nonalcoholic Beers by HPLC. *Food Chemistry*. 1995, roč. 52, s. 199-202. ISSN: 0308-8146

BUŇKA, F. et al. Content of Biogenic Amines and Polyamines in Beers from the Czech Republic. *The Institute of Brewing and Distilling*. 2012, roč. 118, s. 213-216. ISSN: 0046-9750

BUŇKOVÁ, L. et al. Tyramine Production of Technological Important Strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, roč. 229, s. 533-538. ISSN: 1438-2377

BUŇKOVÁ, L. et al. Effect of Aero-/Anaerobiosis on Decarboxylase Activity of Selected Lactic Acid Bacteria. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, s. 5-7.

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

BUYUKUSLU, N. et al. A Cross-Sectional Study: Nutritional Polyamines in Frequently Consumed Foods of the Turkish Population. *Foods*. 2014, roč. 3, s. 541-557. ISSN: 2304-8158

CAI, J. et al. Detection of Histamine in Beer by Nano Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2014, roč. 49, s. 9-12. ISSN: 1076-5174

CARR, F. J., D. CHILL a N. MAIDA. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 2002, roč. 28, s. 281-370. ISSN: 1040-841X

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

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

COLEN, Liesbeth a Johan SWINNEN. Beer Drinking Nations: The Determinants of Global Beer Consumption. *American Association of Wine Economists*. 2011. Dostupné také z: [http://www.wine-economics.org/workingpapers/AAWE\\_WP79.pdf](http://www.wine-economics.org/workingpapers/AAWE_WP79.pdf)

COMBS, David K. a Patrick C. HOFFMAN. *Lactobacillus Buchneri* for Silage Aerobic Stability. *Focus on Forage*. 2001, roč. 3, s. 1-2.

COSTANTINI, A. et al. Biogenic Amine Production by Contaminating Bacteria Found in Starter Preparations Used in Winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, roč. 57, s. 10664-10669. ISSN: 0021-8561

ČERNÍKOVÁ, Michaela a Zuzana Vaňatková. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2010, 134 s. ISBN: 978-807318-749-1

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

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

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

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

EVROPSKÁ UNIE. Nařízení Komise č. 2073/2005 ze dne 15 listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny (Text s významem pro EHP). *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, svazek 48. ISSN: 1725-5074

FADDA, S., G. VIGNOLO a G. OLIVER. Tyramine Degradation and Tyramine/histamine Production by Lactic Acid Bacteria and *Kocuria* Strains. *Biotechnology Letters*. 2001, roč. 23, s. 2015-2019. ISSN: 0141-5492

FELIS, Giovanna E. a Franco DELLAGLIO. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2007, roč. 8, s. 44-61. ISSN: 1466-531X

FERNÁNDEZ, M. et al. Factors Affecting Tyramine Production in *Enterococcus Durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 73, s. 1400-1406. ISSN: 0175-7598

FERNÁNDEZ, M., D. M. LINARES a M. A. ALVAREZ. Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of *Lactococcus Lactis* IPLA 655 and the Development of a PCR Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*. 2004, roč. 67, s. 2521-2529. ISSN: 0362-028X

GARCIA-ALEGRÍA, E. et al. High Tolerance of Wild *Lactobacillus Plantarum* and *Oenococcus Oeni* Strains to Lyophilisation and Stress Environmental Conditions of Acid PH and Etanol. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 230, s. 53-61. ISSN: 1574-6968

GARDINI, F. et al. 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, roč. 64, s. 105-117. ISSN: 0168-1605

GIRAFFA, G., N. CHANISHVILI a Y. WIDYASTUTI. Importance of Lactobacilli in Food and Feed Biotechnology. *Research in Microbiology*. 2010, roč. 161, s. 480-487. ISSN: 0923-2508

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

GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Vyd. 1. Bratislava: Malé centrum. 2004, 528 s. ISBN: 809670-649-7

GUGLIUCCI, Alejandro. Polyamines as Clinical Laboratory Tools. *Clinica Chimica Acta*. 2004, roč. 344, s. 23-35. ISSN: 0009-8981

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

CHOI, S. et al. Physiochemical Properties and Determination of Biogenic Amines in Korean Microbrewery Beer Products. *Journal of Food Biochemistry*. 2012, roč. 36, s. 766-773. ISSN: 1745-4514

IZQUIERDO-PULIDO, M. L. et al. Biogenic Amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, roč. 44, s. 3159-3163. ISSN: 0021-8561

IZQUIERDO-PULIDO, M. L., M. C. VIDAL-CAROU a A. MARINE-FRONT. Determination of Biogenic Amines in Beers and Their Raw Materials by Ion-Pair Liquid Chromatography with Postcolumn Derivatization. *Journal of AOAC International*. 1993, roč. 76, s. 1027-1032. ISSN: 1060-3271

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

JUNEJA, Vijay K. a John N. SOFOS. *Pathogens and Toxic in Foods: Challenges and Intervention*. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2010, 512 s. ISBN: 978-1-55581-459-5

KALÁČ, P. et al. Biogenic Amine Formation in Bottled Beer. *Food Chemistry*. 2002, roč. 79, s. 431-434. ISSN: 0308-8146

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

KALÁČ, P., S. ŠVECOVÁ a T. PELIKÁNOVÁ. Levels of Biogenic Amines in Typical Vegetable Products. *Food Chemistry*. 2002, roč. 77, s. 349-351. ISSN: 0308-8146

KALÁČ, Pavel a Martin KRÍŽEK. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, roč. 109, s. 123-128. ISSN: 2050-0416. Dostupné také z:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.20500416.2003.tb00141.x/pdf>

KAROVÍČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, s. 70-79. ISSN: 0931-7597

KERRY, Joseph P. a John F. KERRY. *Processed Meats - Improving Safety, Nutrition and Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing. 2011, s. 478-507. 19. Heat and Processing Generated Contaminants in Processed Meats. ISBN: 978-0-85-709294-6 (e-book)

KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVÍČOVÁ a G. GREIF. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, s. 30-49. ISSN: 1337-0960. Dostupné také z: [http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo\\_no1\\_2008.pdf](http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf)

KOMPRDA, T. et al. Some Factors Influencing Biogenic Amines and Polyamines Content in Dutch-type Semi-hard Cheese. *European Food Research Technology*. 2008, roč. 227, s. 29-36. ISSN: 1438-2377

KOSAŘ, Karel a Stanislav PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Vyd. 2. (1. na CD). Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. 2003, 1 CD-ROM

KRAUSOVÁ, Petra. Changes in the Content of Biologically Active Polyamines During Pork Loin Storage and Culinary Treatments. *European Food Research and Technology*. 2008, roč. 226, s. 1007-1012. ISSN: 1438-2377

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

KUMAR, A. et al. Recent Advances in Polyamine Research. *Trends in Plant Sciences*. 1997, roč. 2, s. 124-130. ISSN: 1360-1385

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

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

LAZÁRKOVÁ, Z. et al. The Effect of Different Heat Sterilization Regimes on the Quality of Canned Processed Cheese. *Journal of Food Process Engineering*. 2011, roč. 34, s. 1860-1878. ISSN: 0145-8876

LINSALATA, Michele a Francesco RUSSO. Nutritional Factors and Polyamine Metabolism in Colorectal Cancer. *Nutrition*. 2008, roč. 24, s. 382-389. ISSN: 0899-9007

LONVAUD-FUNEL, Aline. Biogenic Amines in Wines: Role of Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, roč. 199, s. 9-13. ISSN: 0378-1097

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

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



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

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

MARCOBAL, Á. et al. A Multifactorial Design for Studying Factors Influencing Growth and Tyramine Production of the Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus Brevis* CECT 4669 and *Enterococcus Faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*. 2006, roč. 157, s. 417-424. ISSN: 0923-2508

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

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

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

MAYER, H. K., G. FIECHTER a E. FISCHER. A New Ultra-pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010, roč. 1217, s. 3251-3257. ISSN: 0021-9673

MAZZOLI, R. et al. Influence of Ethanol, Malate and Arginine on Histamine Production of *Lactobacillus Hilgardii* Isolated from an Italian Red Wine. *Amino Acids*. 2009, roč. 36, s. 81-89. ISSN: 0939-4451

MORENO-ARRIBAS, Mária V. a Aline LONVAUD-FUNEL. Tyrosine Decarboxylase Activity of *Lactobacillus Brevis* IOEB 9809 Isolated from Wine and *L. Brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, roč. 180, s. 55-60. ISSN: 0378-1097

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

ÖZDESTAN, Özgül a Ali ÜREN. Biogenic Amine Content of Kefir: A Fermented Dairy Product. *European Food Research and Technology*. 2010, roč. 231, s. 101-107. ISSN: 1438-2377

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

PEJIN, J. D. et al. Determination of Diacetyl and 2,3-pentanedione in Beer by Gc/ms Using Solid-Phase Extraction Columns. *Acta Periodica Technologica*. 2002, roč. 2002, s. 45-54. ISSN: 1450-7188

PESSIONE, A., C. LAMBERTI a E. PESSIONE. Proteomics as a Tool for Studying Energy Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Molecular BioSystems*. 2010, roč. 6, s. 1419-1430. ISSN: 1742-206X

PINTO, Edgar a Isabel M. P. L. V. O. FERREIRA. Changes in the Content of Free and Conjugated Polyamines during Lettuce (*Lactuca Sativa*) Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, roč. 63, s. 440-446. ISSN: 0021-8561

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

PLEVA, P. et al. Factors Affected Decarboxylation Activity of *Enterococcus faecium* Isolated From Rabbit. *Potravinarstvo*. 2012, roč. 6, s. 46-49.

REDDY, G. et al. Amyolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation – a Review. *Biotechnology Advances*. 2008, roč. 26, s. 22-34. ISSN: 0734-9750

ROMERO, R. et al. The Influence of the Brewing Process on the Formation of Biogenic Amines in Beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, roč. 376, s. 162-167. ISSN: 1618-2642

SAKAMOTO, Kanta a Wil N. KONINGS. Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 89, s. 105-124. ISSN: 0168-1605

SALMINEN, S., A. V. WRIGHT a A. OUWEHAND. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Vyd. 3. New York: Marcel Dekker. 2004, 633 s. ISBN: 0-8247-5332-1

SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita. 2007, 270 s. ISBN: 978-80-210-4207-0

SHAH, Pratik a Edwin SWIATLO. A Multifaceted Role for Polyamines in Bacterial Pathogens. *Molecular Microbiology*. 2008, roč. 68, s. 4-16. ISSN: 0950-382X

SHALABY, Ali R. Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, s. 675-690. ISSN: 0963-9969

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

SMĚLÁ, D. et al. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, s. 432-437. ISSN: 0009-2770.

SPANO, G. et al. Biogenic Amines in Fermented Foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, roč. 64, s. 95-100. ISSN: 0954-3007

SPITAEELS, F. et al. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *Plos One*. 2014, roč. 9, s. e95384-e95312. ISSN: 1932-6203

STANDAROVÁ, E. et al. Production of Tyramine and Histamine by Bacteria Isolated from Czech Blue-Veined Cheese Niva. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2009, roč. 48, s. 189-194. ISSN: 1336-8672

STILES, Michael E. a Wilhelm H. HOLZAPFEL. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, roč. 36, s. 1-29. ISSN: 0168-1605

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

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x/pdf>

SUZUKI, K. et al. Development of Detection Medium for Hard-to-culture Beer-spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, roč. 104, s. 1458-1470. ISSN: 1364-5072

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

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře*. Vyd. 1. Praha: SNTL. 1983, 298 s.

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

TOLLS, T. N. et al. Enzymatic Removal of Diacetyl from Beer. *Applied Microbiology*. 1970, roč. 19, s. 649-657. ISSN: 0003-6919

WAREING, P., S. FELICITY a F. RHEA. *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists*. Vyd. 7. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2010, s. 217-285. 5. Food-Spoilage Bacteria. ISBN: 978-1-905224-84-5 (e-book)

WESSELS, S. et al. The Lactic Acid Bacteria, the Food Chain, and Their Regulation. *Trends in Food Science and Technology*. 2004, roč. 15, s. 498-505. ISSN: 0924-2244

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|                  |  |
|------------------|--|
| AMK              | Aminokyseliny  |
| BA               | Biogenní aminy   |
| BMK              | Bakterie mléčného kvašení                                    |
| CIP              | Cleaning in place stanice                                    |
| CKT              | Cylindrokónické tanky  |
| DAD              | Detektor diodového pole                                      |
| DAO              | Diaminooxidázy   |
| ES               | Evropské společenství  |
| <i>Lb.</i>       | <i>Lactobacillus</i>   |
| MAO              | Monoaminooxidázy   |
| MRS              | MRS broth  |
| NAD <sup>+</sup> | Nikotinamidadeninukleotid v oxidované formě                  |
| PCR              | Polymerázová řetězová reakce                                 |
| rH               | oxidačně-redukční potenciál                                  |
| RIBM             | Research Institute of Brewing and Malting Culture Collection |
| RP-HPLC          | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích  |
| TYR              | Tyramin  |
| UV               | Ultrafialové záření  |
| VIS              | Viditelné záření   |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|  |    |
|--|----|
| Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin (upraveno dle Fadda, Vignolo a Oliver, 2001, s. 2015).  | 13 |
| Obr. 2: Schéma Experimentu I, skrining dekarboxylázové aktivity in vitro a ve sladině.   | 48 |
| Obr. 3: Schéma Experimentu II, kinetika produkce biogenních aminů vybraným kmenem <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9.  | 50 |
| Obr. 4: Produkce tyraminu (TYR) vybranými kmeny <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve třech různých médiích; MRS s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His), upravené MRS (pH 4,8; 4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) a ve sladině. | 57 |
| Obr. 5: Produkce tyraminu (TYR) vybranými kmeny <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> po 48 hodinách kultivace při 30 °C ve třech různých médiích; MRS s aminokyselinami (0,3 % (w/v) Tyr, Orn, Arg, Lys, Phe, His), upravené MRS (pH 4,8; 4,0 % (v/v) etanolu; 20 mg/l směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin) a ve sladině. | 58 |
| Obr. 6: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 0, 2, 3, 4 % (v/v) a bez přidavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.   | 64 |
| Obr. 7: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 0, 2, 3, 4 % (v/v) a bez přidavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.   | 64 |
| Obr. 8: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu bez přidavky etanolu a s přidavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.  | 65 |
| Obr. 9: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu bez přidavky etanolu a s přidavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.  | 65 |
| Obr. 10: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.  | 66 |
| Obr. 11: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene <i>Lactobacillus buchneri</i> RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.  | 67 |

- Obr. 12: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přísávkou etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l. .... 67
- Obr. 13: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přísávkou etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l. .... 68
- Obr. 14: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přísávkou etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l. .... 68
- Obr. 15: Produkce tyraminu (TYR) během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přísávkou etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l. .... 69

**SEZNAM TABULEK**

|   |    |
|---|----|
| <i>Tab. 1: Prekurzory, chemická struktura a klasifikace BA (upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).</i> .....   | 15 |
| <i>Tab. 2: Prekurzory, chemická struktura a klasifikace polyaminů (upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).</i> .....  | 19 |
| <i>Tab. 3: Dekarboxylační média s přísávkami dané kombinace faktorů.</i> .....  | 51 |
| <i>Tab. 4: Eluční program.</i> .....  | 53 |
| <i>Tab. 5: Produkce tyraminu vybranými kmeny Lactobacillus brevis v médiu MRS s přísávkami aminokyselin, upraveném médiu MRS a ve sladíně při 30 °C po 48 hodinách kultivace.</i> .....   | 59 |
| <i>Tab. 6: Produkce tyraminu vybranými kmeny Lactobacillus buchneri v médiu MRS s přísávkami aminokyselin, upraveném médiu MRS a ve sladíně při 30 °C po 48 hodinách kultivace.</i> ..... | 60 |
| <i>Tab. 7: Obsah vybraných aminokyselin v bujónu MRS a ve sladíně (g/l).</i> .....  | 72 |



## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Produkce tyraminu kmeny *Lactobacillus casei/paracasei* v dekarboxylačních médiích při 30 °C

Příloha P II: Růstové křivky *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 ve faktory modifikovaném MRS bujónu

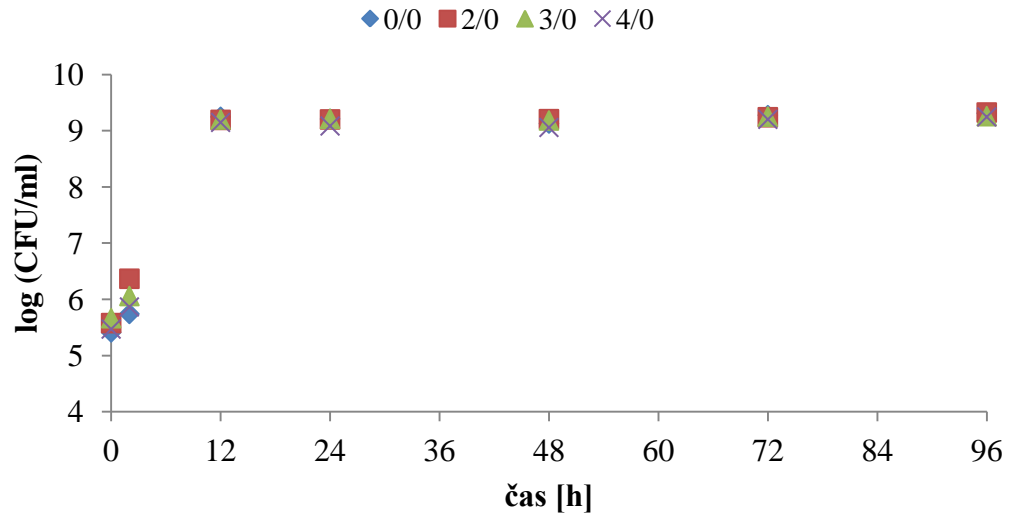
Příloha P III: Vývoj pH růstového prostředí během kultivace *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9

**PŘÍLOHA P I: PRODUKCE TYRAMINU KMENY *LACTOBACILLUS CASEI/PARACASEI* V DEKARBOXYLAČNÍCH MÉDIÍCH PŘI 30 °C**

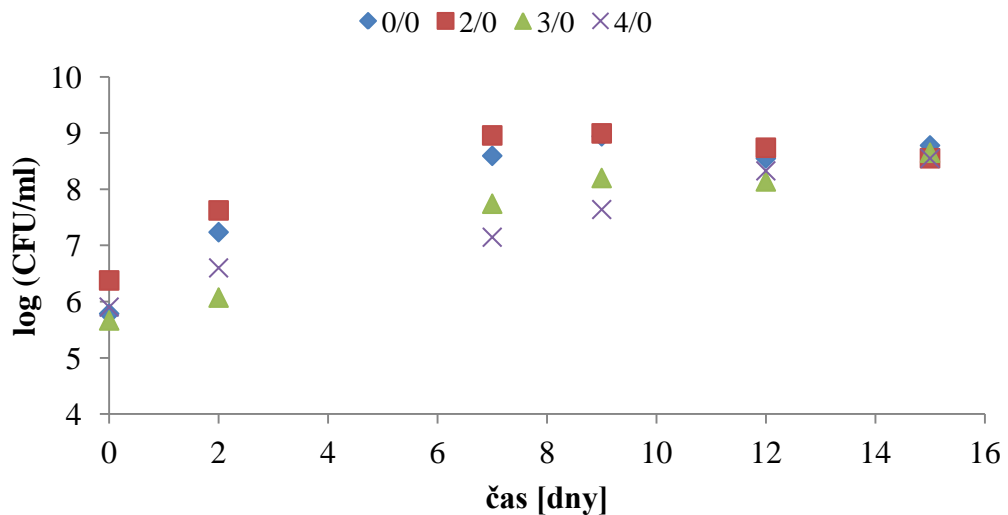
| <b>kmeny <i>Lb. casei/paracasei</i></b> | <b>MRS – TYR*</b> | <b>upravené MRS – TYR*</b> | <b>sladina – TYR*</b> |
|---|-------------------|----------------------------|-----------------------|
| RIBM 2-1                                | 10,0±0,4          | 3,5±0,2                    | 11,0±0,3              |
| RIBM 2-3                                | 2,7±0,2           | 3,0±0,3                    | 2,4±0,4               |
| RIBM 2-5                                | 2,6±0,2           | 3,9±0,2                    | 2,3±0,2               |
| RIBM 2-6                                | 2,4±0,2           | 3,3±0,1                    | ND**                  |
| RIBM 2-11                               | 3,2±0,2           | 3,6±0,1                    | ND**                  |
| RIBM 2-17                               | 3,4±0,3           | 4,0±0,1                    | ND**                  |
| RIBM 2-20                               | 2,8±0,3           | 3,8±0,1                    | 2,8±0,1               |
| RIBM 2-22                               | 45,9±0,4          | 4,6±0,2                    | 2,5±0,2               |
| RIBM 2-23                               | 2,9±0,3           | 6,8±0,5                    | ND**                  |
| RIBM 2-25                               | 2,5±0,3           | 4,0±0,4                    | ND**                  |
| RIBM 2-26                               | 4,1±0,3           | 3,7±0,3                    | ND**                  |
| RIBM 2-27                               | 2,2±0,2           | 4,3±0,3                    | 2,3±0,1               |
| RIBM 2-30                               | 33,1±3,4          | 4,8±0,4                    | 3,1±0,2               |
| RIBM 2-31                               | 2,0±0,1           | 4,3±0,1                    | ND**                  |
| RIBM 2-35                               | 3,5±0,2           | 4,1±0,3                    | 3,9±0,1               |
| RIBM 2-37                               | 3,4±0,2           | 3,3±0,2                    | ND**                  |
| RIBM 2-39                               | 2,2±0,2           | 3,5±0,4                    | ND**                  |
| RIBM 2-41                               | 2,8±0,2           | 6,3±0,6                    | ND**                  |
| RIBM 2-45                               | 2,5±0,2           | 3,1±0,2                    | 2,7±0,1               |
| RIBM 2-46                               | 33,0±2,5          | 3,0±0,2                    | 3,8±0,1               |
| RIBM 2-49                               | 1,4±0,1           | 4,1±0,2                    | ND**                  |
| RIBM 2-51                               | 1,3±0,1           | 3,5±0,1                    | 3,9±0,1               |
| RIBM 2-52                               | 3,3±0,1           | 3,5±0,1                    | 4,1±0,2               |
| RIBM 2-55                               | 1,2±0,1           | 3,9±0,2                    | 2,3±0,1               |
| RIBM 2-59                               | 6,2±0,5           | 14,9±0,2                   | 3,4±0,2               |
| RIBM 2-63                               | 4,4±0,2           | 6,4±0,3                    | 5,4±0,1               |
| RIBM 2-64                               | 2,7±0,2           | 4,9±0,3                    | ND**                  |
| RIBM 2-88                               | 4,0±0,2           | 5,8±0,1                    | 3,4±0,1               |
| RIBM 2-100                              | 3,6±0,2           | 3,2±0,2                    | 2,3±0,2               |
| RIBM 2-113                              | 3,4±0,3           | 3,1±0,3                    | 2,6±0,4               |

\* TYR...produkce tyraminu, \*\*ND...tyramin nebyl detekován

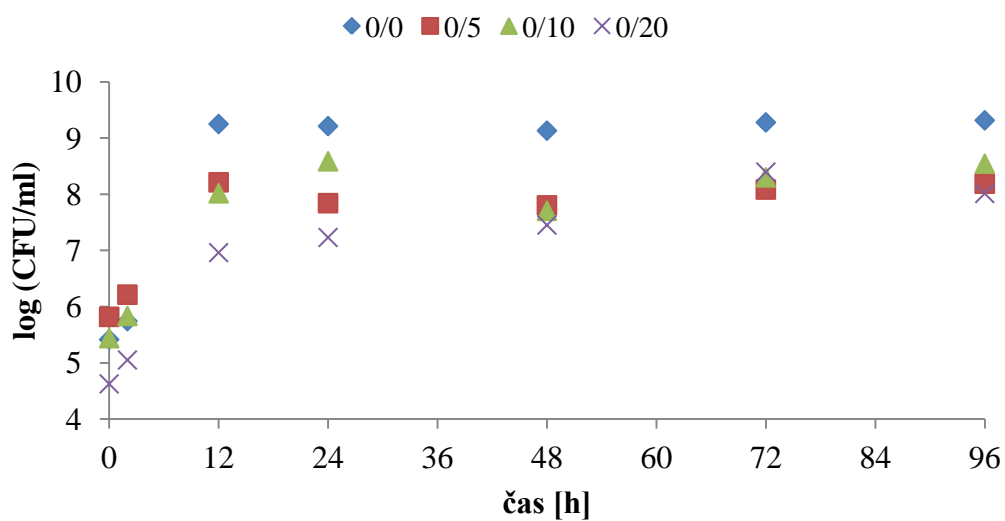
## PŘÍLOHA P II: RŮSTOVÉ KŘIVKY *LACTOBACILLUS BUCHNERI* RIBM 2-9 VE FAKTORY MODIFIKOVANÉM MRS BUJÓNU



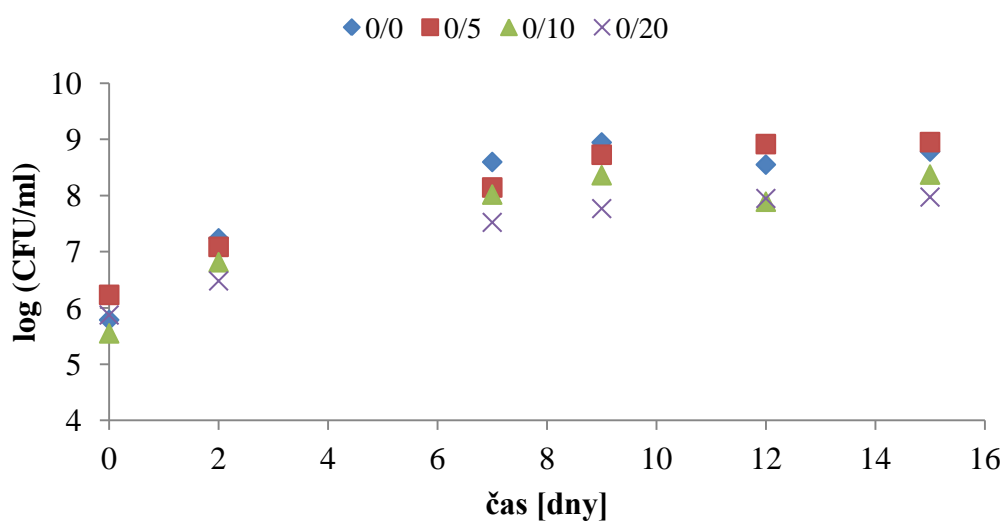
Obr. 1: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 0-4 % (v/v) a bez přidavku směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.



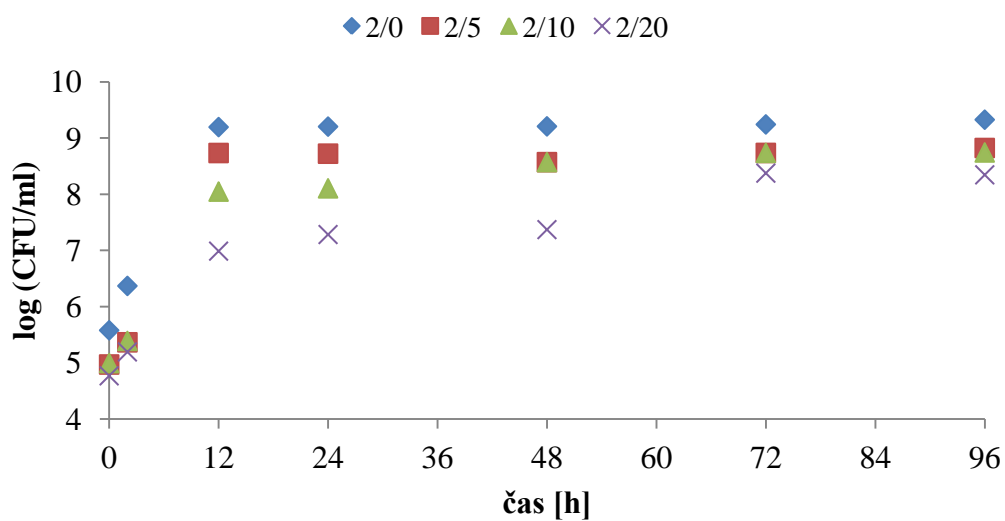
Obr. 2: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 0-4 % (v/v) a bez přidavku směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.



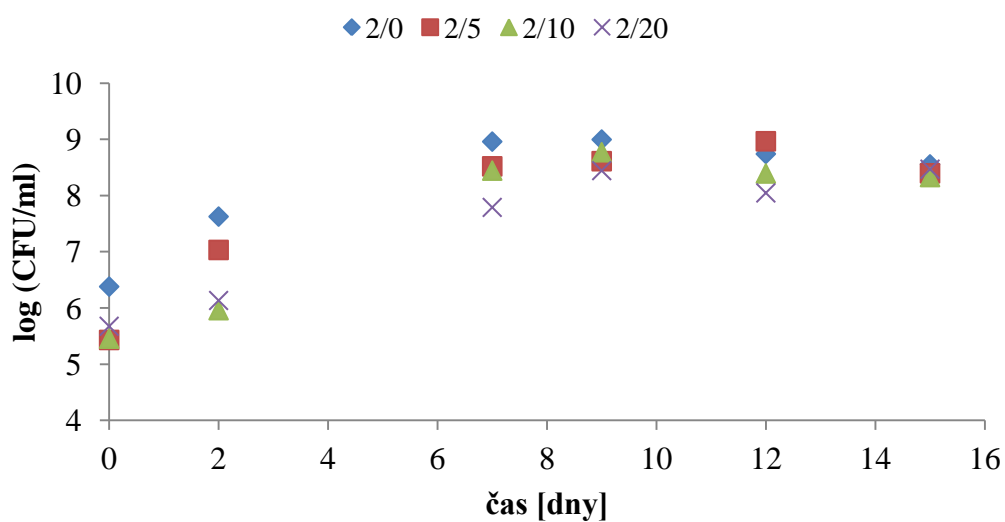
Obr. 3: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu bez přídavku etanolu a s přídavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



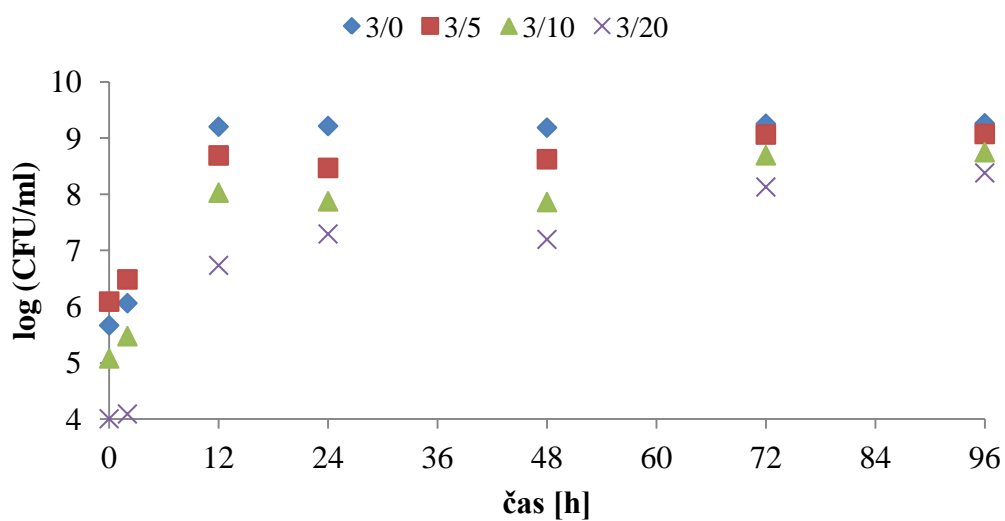
Obr. 4: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu bez přídavku etanolu a s přídavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



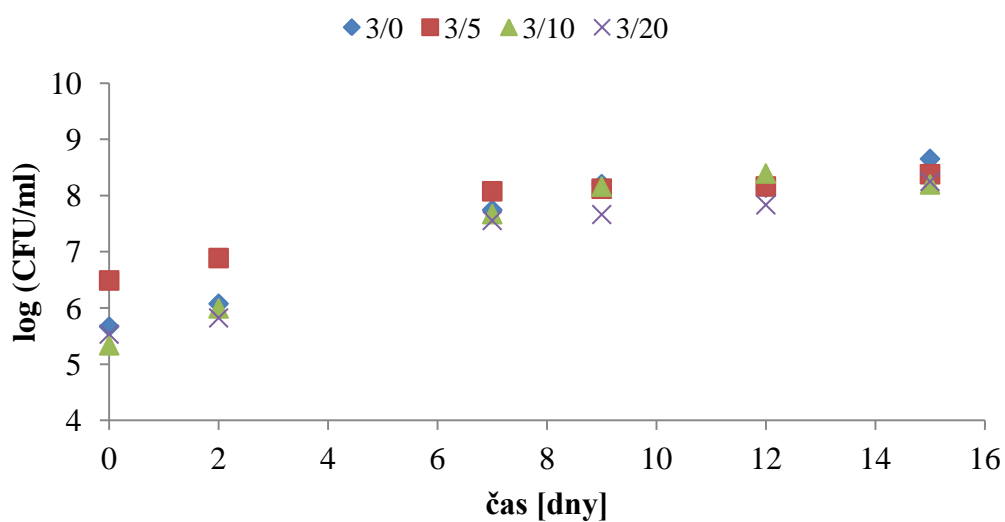
Obr. 5: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



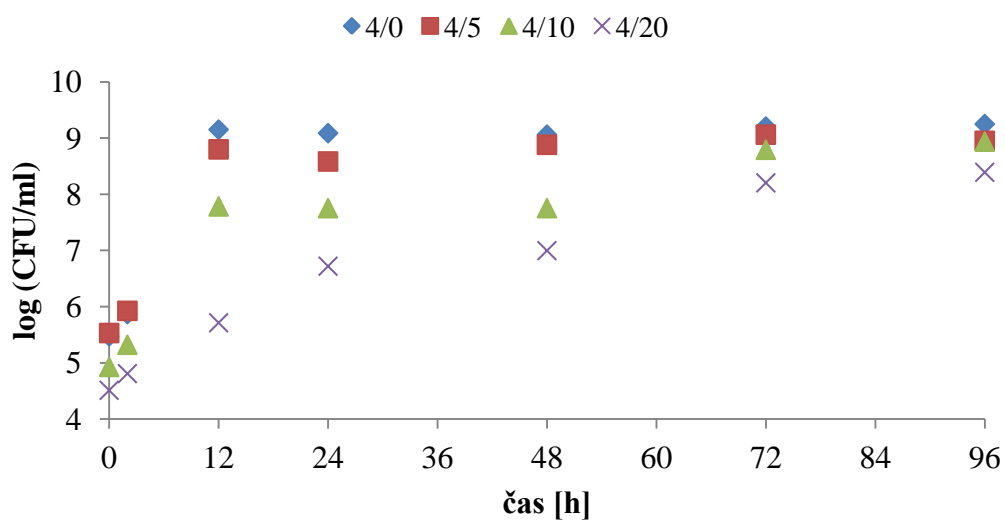
Obr. 6: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



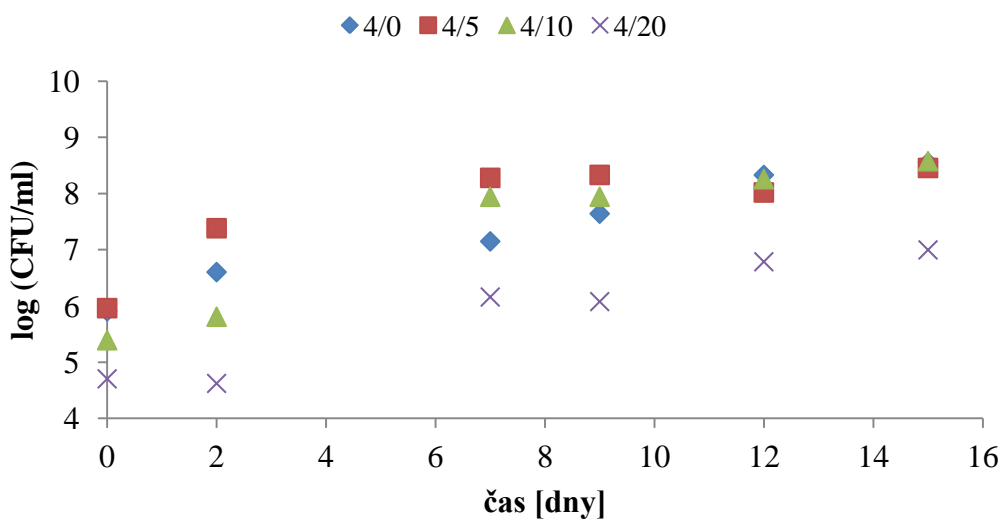
Obr. 7: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



Obr. 8: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

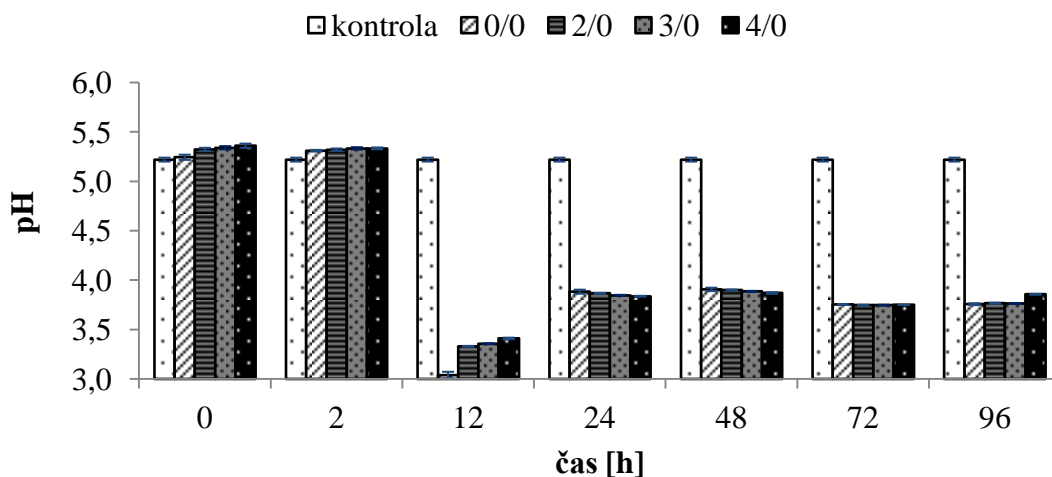


Obr. 9: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

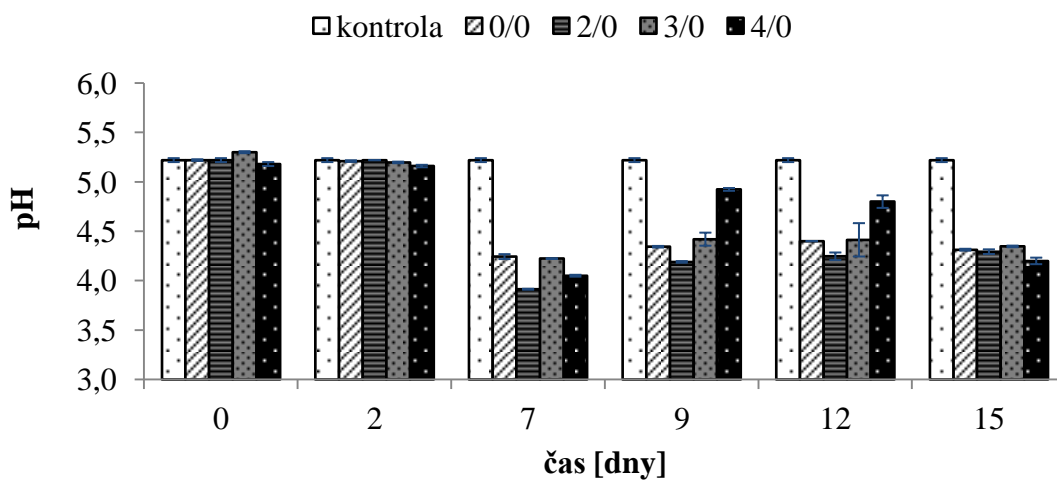


Obr. 10: Růstové křivky kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C v MRS bujónu s přidavky etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.

## PŘÍLOHA P III: VÝVOJ PH RŮSTOVÉHO PROSTŘEDÍ BĚHEM KULTIVACE *LACTOBACILLUS BUCHNERI* RIBM 2-9

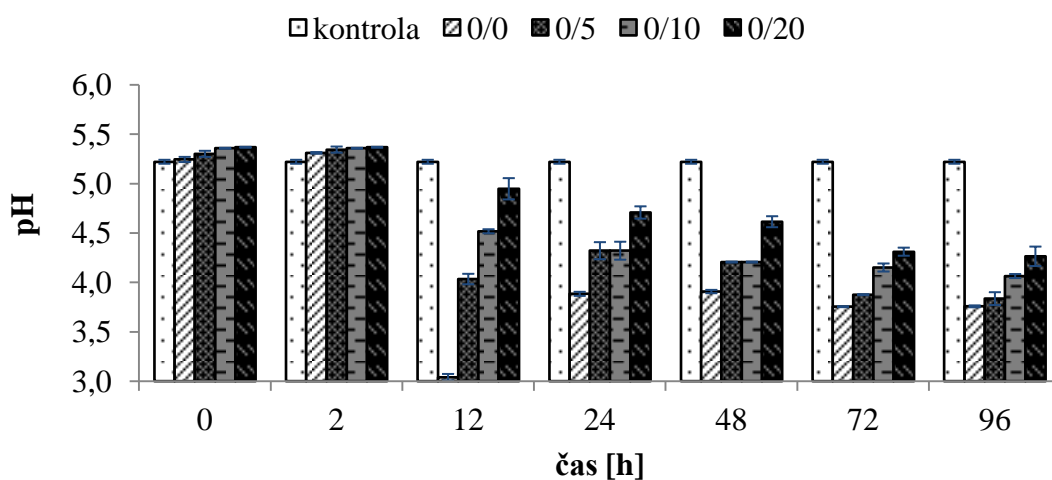


Obr. 1: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C s přidavky etanolu 0, 2, 3, 4 % (v/v) a bez přidavku směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.

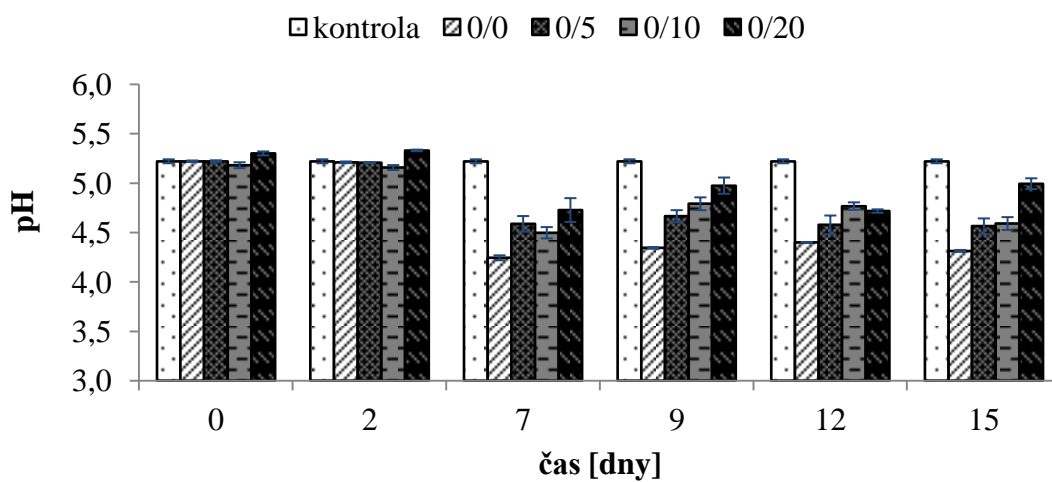


Obr. 2: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C s přidavky etanolu 0, 2, 3, 4 % (v/v) a bez přidavku směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin.

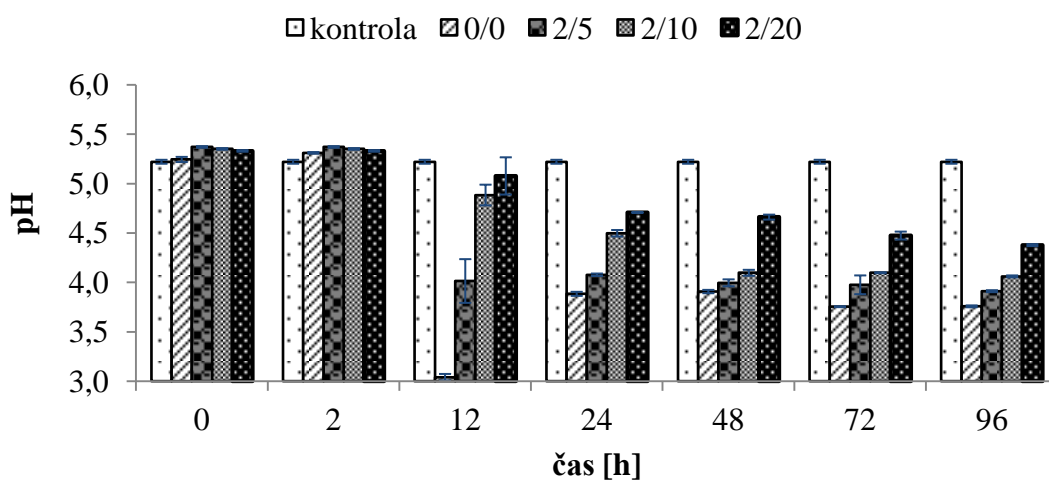




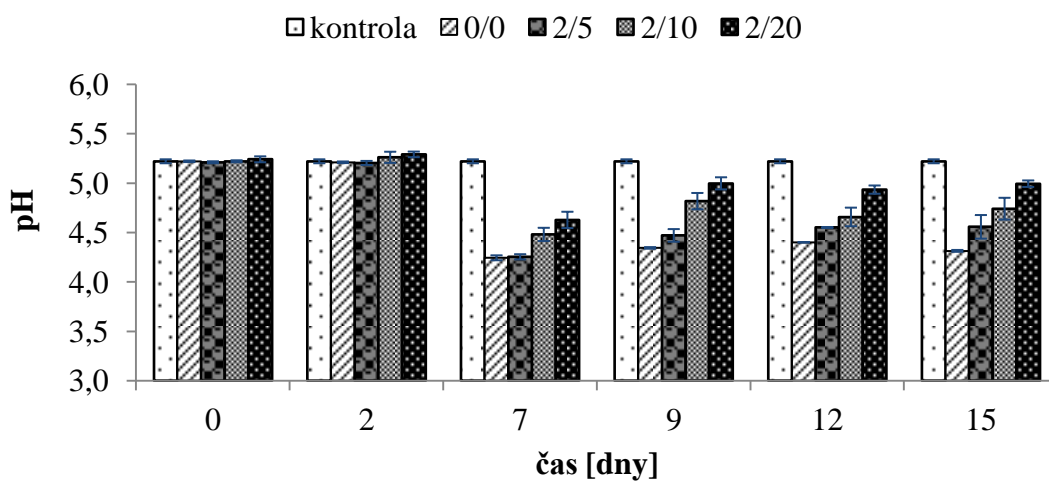
Obr. 3: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C bez přídavku etanolu a s přídavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



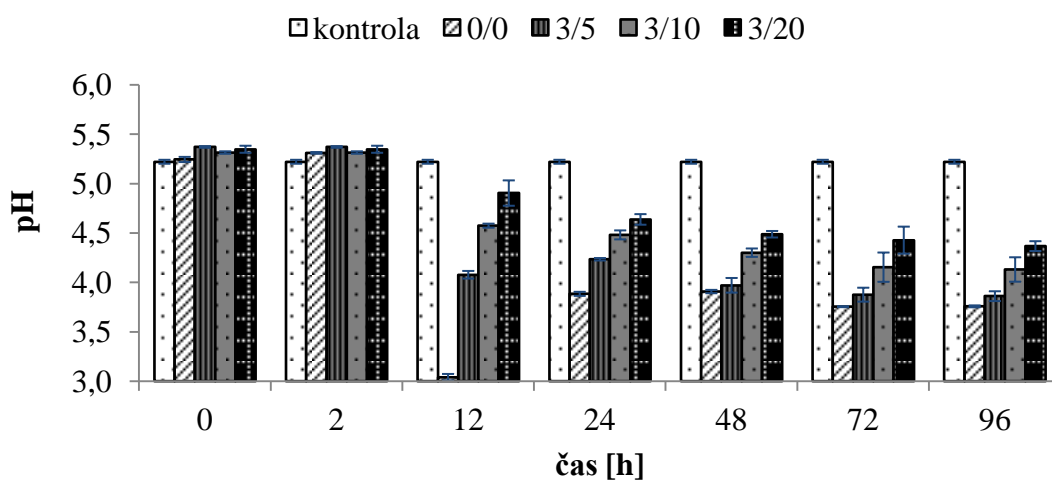
Obr. 4: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C bez přídavku etanolu a s přídavky směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



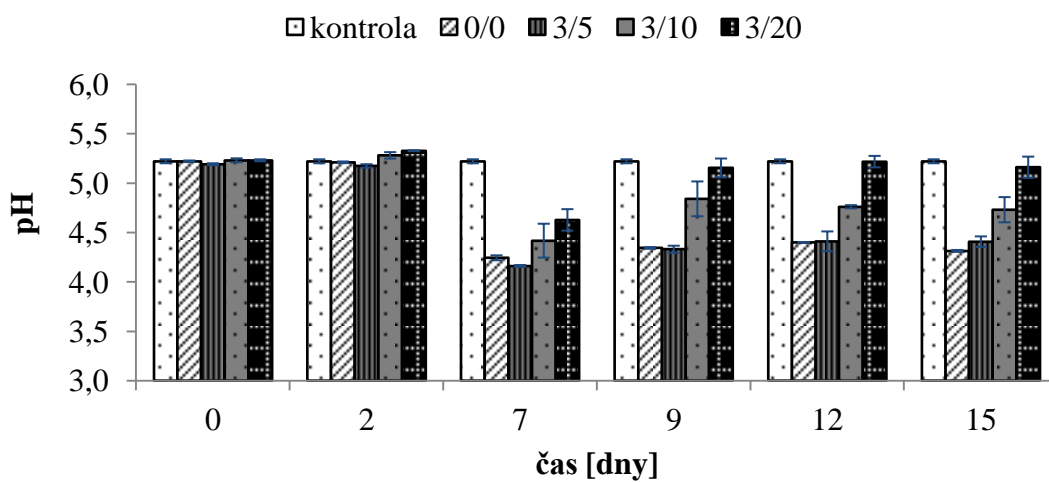
Obr. 5: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



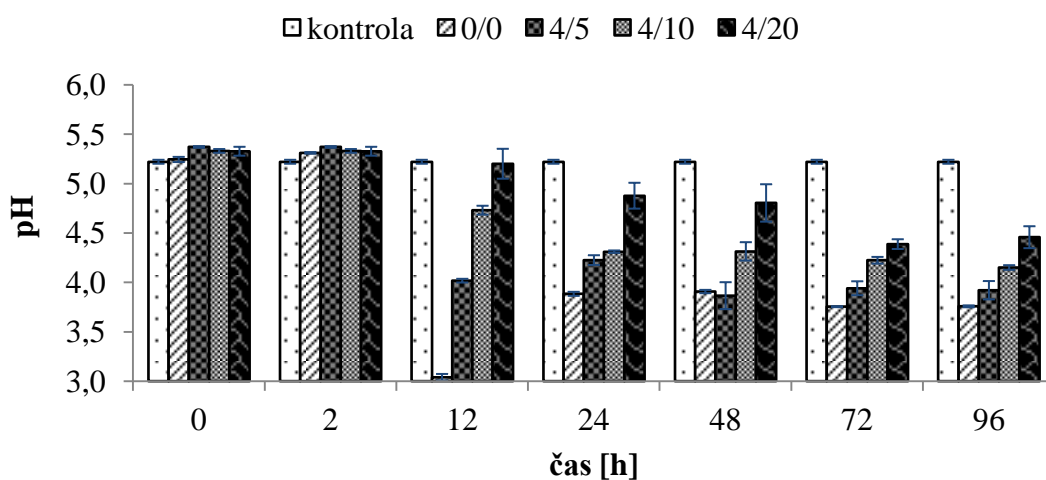
Obr. 6: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C s přidavky etanolu 2 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



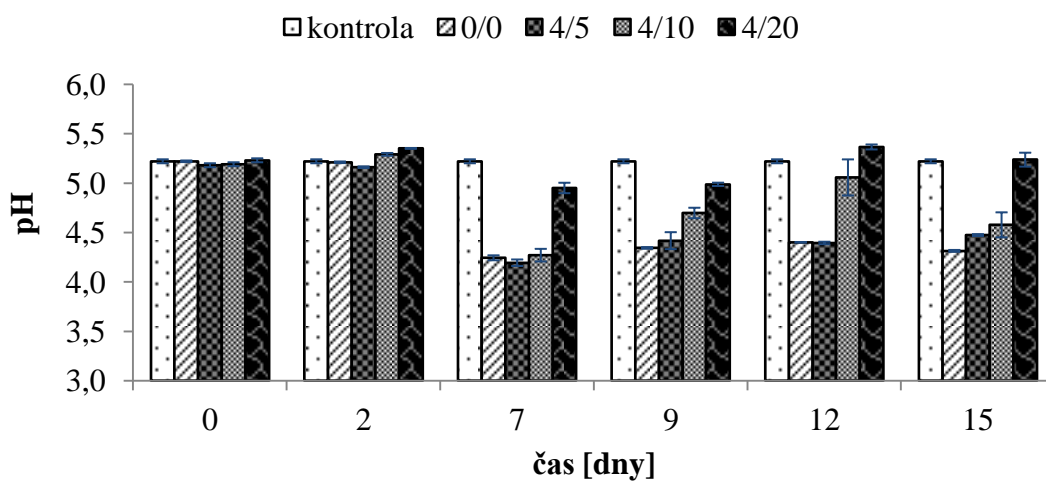
Obr. 7: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C s přidavky etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



Obr. 8: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C s přidavky etanolu 3 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



Obr. 9: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 30 °C s přidavky etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.



Obr. 10: Vývoj pH MRS bujónu během kultivace kmene *Lactobacillus buchneri* RIBM 2-9 při 10 °C s přidavky etanolu 4 % (v/v) a směsi izo- $\alpha$ -hořkých kyselin 0, 5, 10, 20 mg/l.