

Schopnost pivovarských kvasnic snižovat obsah biogenních aminů

Bc. Barbora Němcová

Diplomová práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Němcová**
Osobní číslo: **T15980**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Schopnost pivovarských kvasnic snižovat obsah biogenních aminů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Kvasinky v procesu výroby piva.
2. Podmínky pro růst pivovarských kvasnic a jejich metabolismus.
3. Schopnost kvasinek produkovat nebo degradovat biogenní aminy.
4. Biogenní aminy v alkoholických nápojích, jejich účinky na lidské zdraví.

II. Praktická část

1. Vliv vybraných faktorů na produkci/degradaci biogenních aminů za podmínek in vitro a v laboratorně vyrobené mladině.
2. Zpracování výsledků, statistické vyhodnocení a vyvození závěrů práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] **BASAŘOVÁ, G. et al. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010.**

[2] **PREEDY, Victor R. Beer in health and disease prevention. Burlington, MA: Academic, 2009.**

[3] **KALÁČ P., V. HLAVATÁ a M. KRÍŽEK. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. Food chemistry. 1997. s. 209–214.**

[4] **IZQUIERDO-PULIDO, M., J. FONT-FÁBREGAS a C. VIDAL-CAROU, Influence of Saccharomyces cerevisiae var. uvarum on histamine and tyramine formation during beer fermentation. Food chemistry. 1995. s. 51–54.**

[5] **BLANCO Carlos A. et al. Innovations in the brewing industry: light beer. International Journal of Food Science and Nutrition. 2014; 65(6): 655660.**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Eva Lorencová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

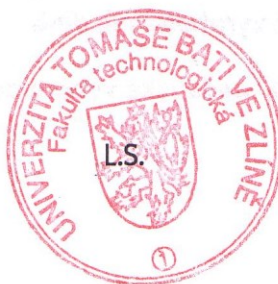
28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: NĚMCOVÁ BARBORA Obor: CHEMIE A TECHNOLOGIE POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou 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 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 práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové 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 26.4.2017

Němcová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá metabolismem pivovarských kmenů kvasinek, konkrétně jejich schopností degradovat nebo naopak produkovat biogenní aminy (BA). Zmíněné schopnosti byly sledovány za podmínek *in vitro* v různě suplementovaných médiích. Média Malt bujóny a minerální média byla v různých koncentracích obohacena o aminokyseliny 0,3 % (w/v) (arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin), BA 0,07 % (w/v) (tyramin, histamin a putrescin) nebo pouze samotný tyramin 0,07 % (w/v) anebo kvasničný extrakt 0,1 % (w/v). BA v supernatantech po kultivaci 25 kmenů kvasinek byly stanoveny po předkolonové derivatizaci dansylchloridem na HPLC s UV detekcí. Bylo zjištěno, že kvasinky v minerálním médiu degradují BA a polyaminy ve vyšší míře, než v Malt bujónu. Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, 9, 10, 11, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, 147, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7, *Kluyveromyces marxianus* RIBM km, *Pichia fermentans* RIBM KI ½, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T3, T4 degradovaly BA v řádech jednotek až desítek mg/l. Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T1, T2 produkovaly BA v míře, které by neohrozilo zdraví zdravého člověka a to v koncentracích do 10 mg/l u kulturních kmenů kvasinek a do 15 mg/l u divokých kmenů kvasinek. Pouze citlivých jedinců by mohlo množství detekovaného histaminu 15 mg/l v Malt bujónu s tyraminem způsobit zdravotní potíže.

Klíčová slova: kvasinky, biogenní aminy, pivo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, HPLC

ABSTRACT

This thesis deals with metabolism of brewer's yeast strains, more precisely with their abilities to degrade or produce biogenic amines (BA). The mentioned abilities were observed in vitro in different supplemented media. Media MALT Broth and mineral medium were enriched with different combinations of certain amino acids 0,3 % (w/v) arginine, histidine, tyrosine and phenylalanine, BA 0,07 % (w/v) (tyramine, histamine and putrescine) or tyramine itself 0,07 % (w/v), or yeast extract 0,1 % (w/v). BA were determined in supernatants after the cultivation of 25 strains of yeasts by the means of HPLC with UV detection after dansyl chloride derivatization. It was found that yeasts were able to degrade BA and polyamines in mineral medium a higher rate than in Malt broth. Strains *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, 9, 10, 11, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, 147, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7, *Kluyveromyces marxianus* RIBM km, *Pichia fermentans* RIBM KI ½, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T3, T4 degraded BA in rank of units to tens of mg/l. Strains *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T1, T2 produced BA at a level that would not endanger the health of a healthy human at concentrations up to 10 mg/l in cultured yeast strains and up to 15 mg/l in wild yeast strains. Only amount detected histamine 15 mg/l in Malt broth with tyramine could cause health problems by sensitive individuals.

Keywords: yeast, biogenic amines, beer, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, HPLC

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali při realizaci a psaní této diplomové práce. Největší poděkování patří Ing. Evě Lorencové, Ph.D., která mi věnovala nejenom svůj pracovní čas.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KVASINKY V PROCESU VÝROBY PIVA	13
1.1 SBÍRKA PIVOVARSKÝCH KVASINEK	13
1.2 DIVOKÉ KVASINKY	15
2 METABOLIZMUS PIVOVARSKÝCH KVASNIC	17
2.1 METABOLIZMUS SACHARIDŮ	17
2.2 METABOLIZMUS DUSÍKATÝCH LÁTEK	18
2.2.1 Přeměna aminokyselin	19
2.3 SYNTÉZA SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK.....	19
2.3.1 Etanol a vyšší alkoholy	20
2.3.2 Estery.....	21
2.3.3 Vicinální diketony	22
2.3.4 Organické kyseliny.....	23
2.3.5 Karbonylové sloučeniny.....	23
2.3.6 Další senzoričky aktivní látky	23
3 PROCES KVAŠENÍ PIVA	25
3.1 KINETIKA PROCESU KVAŠENÍ MLADINY.....	26
3.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRŮBĚH HLAVNÍHO KVAŠENÍ	27
3.2.1 Složení mladinového extraktu.....	28
3.2.2 Koncentrace kyslíku.....	28
3.2.3 Teplota kvašení	29
3.2.4 Osmotický stres	30
3.2.5 Etanolový stres	31
3.2.6 Tlakový stres a stres oxidem uhličitým.....	31
3.2.7 pH jako stresový faktor	31
3.2.8 Vitalita kvasničných buněk.....	32
4 BIOGENNÍ AMINY	33
4.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH.....	33
4.2 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	35
4.3 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY V POTRAVINÁCH A JEJICH ÚČINKY NA LIDSKÉ ZDRAVÍ.....	36
4.4 ZDROJE BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU	37
4.4.1 Použité suroviny jako zdroje biogenních aminů	38
4.4.2 Dekarboxylázová aktivita bakterií vyskytujících se v procesu výroby piva.....	38
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
5 CÍL PRÁCE	41
6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	42

6.1	ZAŘÍZENÍ.....	42
6.2	CHEMIKÁLIE A POMOCNÉ LÁTKY.....	42
6.3	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	43
6.4	PŘÍPRAVA INOKULA.....	43
6.5	SCREENING OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V SUPERNATANTECH PO KULTIVACI VYBRANÝCH KVASNIČNÝCH KMENŮ.....	45
7	VÝSLEDKY.....	47
7.1	MALT BUJÓN S AMINOKYSELINAMI	48
7.2	MINERÁLNÍ MÉDIUM S AMINOKYSELINAMI	51
7.3	MALT BUJÓN S TYRAMINEM	56
7.4	MINERÁLNÍ MÉDIUM S TYRAMINEM	60
7.5	MALT BUJÓN S BIOGENNÍMI AMINY	62
7.6	MINERÁLNÍ MÉDIUM S BIOGENNÍMI AMINY	66
7.7	MINERÁLNÍ MÉDIUM S TYRAMINEM A KVASNIČNÝM EXTRAKTEM	71
7.8	MINERÁLNÍ MÉDIUM S BIOGENNÍMI AMINY A KVASNIČNÝM EXTRAKTEM	75
8	DISKUZE	80
9	ZÁVĚR.....	85
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	93
	SEZNAM OBRÁZKŮ	94
	SEZNAM TABULEK.....	98

ÚVOD

Podle Českého statistického úřadu byla v roce 2016 spotřeba piva v České republice 143 litrů/obyvatele/rok [1]. Výroba a konzum piva patří k dlouholeté tradici a Češi jsou na to náležitě hrdí. Pití piva přináší bezpochyby řadu pozitiv, obsahuje látky s vysokou nutriční hodnotou díky vysokému obsahu aminokyselin, sacharidů, vitamínů a minerálů. Obsahuje hořké látky s uklidňujícím účinkem, stimuluje chuť, trávení a má diuretické účinky. Na druhou stranu je jeho nadměrná konzumace omezována kvůli obsahu alkoholu [2].

Často je zapomínán fakt, že pivo může být významným zdrojem biogenních aminů a polyaminů, které mohou u citlivých osob způsobit vážné, nejenom dietetické, potíže [3]. Monitoring obsahu biogenních aminů v pivu slouží nejenom ke sledování bezpečnosti a kvality, ale může zpětně poukazovat i na špatnou hygienu pivovarských provozů [4]. Monitoring má tedy svůj význam nejen toxikologický, ale i technologický.

Česká i evropská legislativa neukládá žádné limity pro obsah biogenních aminů v pivu, proto záleží na svědomitosti provozovatelů pivovarských podniků, jak pečlivě vybírají suroviny pro výrobu piva s ohledem na technologii a hygienu procesu výroby [3].

V současnosti je zájem vědecké společnosti směřován k hledání postupů, které by vedly ke snížení biogenních aminů a polyaminů v pivu. Pozornost je zejména věnována k hledání kmenů degradujících tyto látky. Mnoho vědeckých publikací se zabývalo dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů zejména u potravin jako víno, fermentované masné výrobky, sýry, kysané zelí a jiné fermentované potraviny, ale doposud nebyla podrobněji zkoumána schopnost pivovarských kmenů tyto látky degradovat [5].

Cílem této práce je sledovat deaminoxidázovou a dekarboxylázovou aktivitu vybraných pivovarských kmenů v různých nutričně chudých prostředích obohacených o různé suplementy. Výstupem by mohlo být nalezení kmene, jenž by s vysokou úspěšností degradoval biogenní aminy a polyaminy, což by mohlo mít velký význam v oblasti výroby piva.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KVASINKY V PROCESU VÝROBY PIVA

V minulosti bylo kvašení piva realizováno buď spontánním kvašením, nebo za pomoci kvasnic nedefinovaných kmenů. Teprve až koncem 19. století s objevem Luise Pasteura, který odhalil příčinu kvašení, a konstrukcí první propagační stanice, dochází k vydělování svrchních a spodních pivovarských kvasnic, které umožňuje výrobu piva za různých podmínek. V současnosti se používá výhradně čistých pivovarských kultur, které zaručují standardnější výrobu [6].

Pivovarské kvasinky představují dva typy produkčních kmenů náležejících k druhům: *Saccharomyces pastorianus* (zcela zkvašující rafinózu) a *Saccharomyces cerevisiae* (zkvašující rafinózu z jedné třetiny). Z technologického hlediska se oba druhy liší typem kvašení, nedochází k jejich rozdělení z pohledu taxonomického. Spodního kvašení je dosahováno u *Saccharomyces pastorianus* (dříve *Saccharomyces carlsbergensis*), které sedimentují na dně kvasné nádoby. *Saccharomyces cerevisiae* se naopak účastní svrchního kvašení, kdy většina kvasinek je vynášena k hladině mladiny kde tvoří hustou pěnu [7], [8], [2], [9]. Spodní pivovarské kvasinky se mimo jiné také liší od svrchních např. tím, že tvoří oxid siřičitý a jsou schopny růstu i při nižších teplotách [8].

Toto tradiční dělení pro výběr vhodných kvasinek pro danou výrobu určitého piva však nestačí. Požadavky na dobré kvasnice jsou mnohem diferencovanější. K výběru dochází na základě několika hledisek jako rychlosti množení a rozkvašování, míry zkvašování mladiny, podle využití živin mladiny, dle flokulace a čiření piva, tvorby aromatických látek a jiných metabolitů, konečného pH piva, vlivu na jeho chuť, aroma a pěnivost [7].

V pivovarství se často můžeme setkat s pojmem *Saccharomyces sensu stricto*. Jedná se o komplex kmenů kvasinek, který je používán ve fermentačním průmyslu, tedy nejenom při výrobě piva, ale například i vína, chleba aj. [10]. Tento komplex obsahuje 21 druhů kvasinek. V roce 1984 došlo k zařazení této skupiny pod jediný druh *Saccharomyces cerevisiae* [6].

1.1 Sběrka pivovarských kvasinek

V současné době nelze zaručit standardní výrobu kvalitního piva s ohledem na ekonomičnost produkce bez použití výhradně čistých kvasničných kultur [11]. Nejvýznamnějším zdrojem čistých produkčních kmenů je v České republice Sběrka pivovarských kvasinek Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze, která je

mezinárodně registrovaná s názvem RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) pod číslem 665. Konkrétně sbírka RIBM sestává ze dvou od sebe oddělených sbírek a to ze sbírky pivovarských kvasinek a sbírky bakterií, divokých a vinařských kvasinek. Tím, že je tato sbírka tak specificky zaměřena na pivovarský průmysl, ji činí v Evropě ojedinělou. Stala se součástí Národního programu ochrany genofondu mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu a jejich využití v referenční diagnostice [12] a taktéž je členem Federace Českých a Slovenských sbírek mikroorganismů (FCCM) [11]. Mezi další existující sbírky v České republice patří Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC), Sběrka průmyslově využitelných mikroorganismů (RIFIS) a další jiné sbírky se zaměřením na určitou vědeckou nebo průmyslovou oblast. Mezi české sbírky patří i sbírky univerzit a konkrétních ústavů a kateder [13].

České sbírky spolu se slovenskými, jako např. Zbierka kultúr kvasiniek (CCY), Zbierka kultúr patogenných kvasiniek (CCPY), Zbierka vinných kvasiniek (RIVE) a dalšími, obsahují více než 20 000 kmenů mikroorganismů [13].

Velkou nadnárodní organizací je nezisková Organizace evropských sbírek kultur (ECCO), která přijímá kultury od společností sdružených ve Federaci evropských mikrobiologických společností (FEMS). Kultury musí být členem sbírky a registrovány u Světové federace pro kulturu sbírek (WFCC) [14].

Mezi světové sbírky organismů patří American Type Culture Collection (ATCC), německá sbírka Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Japan Collection of Microorganisms (JCM), All-Russian Collection of Microorganisms (VKM) a mnohé další [13]. Národní sbírka kulturních kvasinek (NCYC) je britskou sbírkou kvasničných kultur, která obsahuje kmeny pivovarských kvasinek, geneticky definovaných kvasinek, kvasinek spojenými v souvislosti s kažením potravin a kvasinek s lékařským a průmyslovým významem [15].

Pro české výrobce piva je nejdůležitější právě Sběrka pivovarských kvasinek (RIBM), protože poskytuje dostatečné informace (o morfologických a biochemických vlastnostech) deponovaných kmenů. Pro pivovarský průmysl je pozornost věnována zejména vlastnostem sedimentace, kvasné schopnosti, tendenci kmenů k autolýze a citlivosti ke složení mladiny. Všechny kmeny jsou uchovávány pod vlastními katalogovými čísly a mezi nejhojněji využívanými kmeny v pivovarství patří kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, 7, 9, 12, 95, 96 [11].

1.2 Divoké kvasinky

Kromě kulturních pivovarských kvasnic se v procesu výroby piva mohou objevit i jiné tzv. „divoké“ nebo také „cizí“ kvasinky [2]. Tabulka 1 uvádí konkrétní druhy divokých kvasinek, které lze izolovat z piva.

Tabulka 1: Divoké kvasinky v pivovarnictví [19]

Rod	Druh
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae, bayanus, exiguus, rouxii, delbrueckii, uvarum, italicus, rosei, heterogenicus, inusitatus, microellipsoides, diasticus</i>
<i>Candida</i>	<i>krusei, intermedia, vini, valida, guilliermondii, silvae, lambica, ingens, utilis, sake, mesenterica, parapsilosis, humicola, melinii, catenulata, solani</i>
<i>Pichia</i>	<i>membranaefaciens, fermentans, farinosa</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>candida, norvegica, glabrata, dattila, pinus, versatilis, stellata, inconspicua, gropengiesseri, colliculosa, holmii</i>
<i>Hansenula</i>	<i>anomala, subpelliculosa, californica</i>
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>
<i>Dekkera</i>	<i>intermedia</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>
<i>Brettanomyces</i>	<i>anomalus, bruxellensis, claussenii</i>
<i>Vryptococcus</i>	<i>infirmitus, albidus var. diffluentis, laurentii</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>cutaneum, capitatum</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>rubra, minuta</i>
<i>Endomycopsis</i>	<i>burtonii</i>

Díky dnešním znalostem v oborech molekulární biologie a genového inženýrství, je současná taxonomie pivovarských kvasnic složitější a mnoho pivovarských praktiků se se současnou taxonomií neztotožňuje. Historicky se v Čechách za kulturní kvasinky považovaly výhradně kvasinky spodního kvašení a ostatní kmeny byly brány jako kontaminující. Například kvasinky *Saccharomyces logos*, *S. uvarum*, *S. pastorianus*, *S. byanus* byly původně pokládány za cizí a až nyní byly přiřazeny k druhu *S. cerevisiae* [16]. Rozdělení kvasinek podle typu kvašení je neustále doplňováno o další kmeny [6]. Například sbírka Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. v Praze, v současnosti zahrnuje 115 kmenů kvasinek svrchního kvašení. Jako divoké kvasinky 14 kmenů vinných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, 40 kmenů rodů *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* a rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* a *Saccharomyces* [17]. Možné rozdělení divokých kvasinek je do skupin non-*Saccharomyces* (*Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulasporea*, *Zyhosaccharomyces*) a *Saccharomyces* [2], [18].

Většina kontaminujících mikroorganismů má nepřímý účinek. To znamená, že využívají živiny, kyslík a jiné růstové faktory a mění tak kultivační prostředí. Tyto kvasinky bývají tedy většinou nežádoucí, a to kvůli schopnosti produkovat látky, které snižují organoleptické vlastnosti piva nebo v horším případě jsou schopny tvořit toxiny [6]. Tyto toxiny usmrcují senzitivní kmeny kvasinek, jimiž často bývají právě kulturní kvasinky [16].

Dále mohou zpomalovat nebo zastavit kvašení [6] nebo způsobit super-atenuaci, kdy výsledné pivo obsahuje vyšší koncentrace alkoholu na úkor zbytkového extraktu [20].

2 METABOLIZMUS PIVOVARSKÝCH KVASNIC

Alkoholové kvašení je označováno za fakultativně anaerobní proces. Pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* nedokáží žít ve striktně anaerobních podmínkách, protože právě kyslík je jeden z růstových faktorů pro membránové mastné kyseliny (např. kyselina olejová) a syntézu sterolu (např. ergosterol) [18].

Jednou ze základních podmínek pro růst pivovarských kvasnic je živinové složení mladiny, tzn. kvalita použitých surovin jako je voda, surogáty, slad a technologie rmutování. Nejpodstatnější je obsah sacharidů a asimilovatelných dusíkatých látek (dále N-látek) [2]. Metabolismus lipidů nemá v pivovarství význam, protože v mladině je obsaženo jen velmi malé množství lipidických složek. Jejich štěpení je velmi podobné jejich syntéze, liší se jen svým místem realizace v buňce (β -oxidace probíhá v mitochondriích, syntéza v cytoplazmě) [7].

V následujících kapitolách proto bude popsán metabolismus sacharidů a N-látek pivovarských kvasnic.

2.1 Metabolismus sacharidů

Nejdůležitější živinou pro růst a rozmnožování pivovarských kvasnic jsou cukry. Ty jsou v mladině zastoupeny v téměř z 90 %. Zhruba 75 % zkvasitelného extraktu připadá na maltózu a maltotriózu, méně pak na glukózu, fruktózu a sacharózu. Cukry jsou zkvašovány kvasinkami v tomto pořadí: monosacharidy, sacharóza, maltóza a maltotrióza. Většinou je nejdříve zkvašována glukóza, fruktóza a sacharóza (kvůli usnadněné difúzi) a až poté maltóza a maltotrióza (přes aktivní transportní systém) [7], [2], [5].

Poměr glukózy a maltózy a celkový obsah cukrů v mladině jsou důležitými faktory pro indukci permeáz maltózy a maltotriózy. To znamená, že změny v poměru glukózy a maltózy mohou vyvolat inhibici indukce těchto enzymů až do doby, kdy je ukončen růst kvasinek a kdy se N-látky stávají limitujícím faktorem pro růst kvasinek. To se stává v případech, kdy je ve velké míře nahrazován slad za sacharózu při výrobě mladiny [7].

Zkvašování maltózy probíhá podle Embdenova-Mayerhofova-Parnasova schématu za anaerobních podmínek za vzniku kyseliny pyrohroznové, která je spojovacím článkem mezi anaerobní glykolýzou a citátovým cyklem. Konečným produktem metabolismu cukrů jsou zejména etanol a oxid uhličitý. Zhruba 30 % cukrů je odbouráváno aerobně podle

Warburgova-Dickensova-Horeckerova schématu, který pak navazuje na pentózový cyklus (důležitý pro tvorbu koenzymu NADP v redukované formě a ribozafosfátů) [5], [21] [22].

Kvasinky si během kvašení vytvářejí glykogen a trehalózu (zásobní sacharidy). Glykogen slouží jako zdroj energie při případném hladovění, trehalóza je považována za antistresový faktor a její obsah spolu s glykogenem indikuje míru vitality kvasnic [16].

Glykolýzou buňky získávají dvě molekuly ATP. Tato energie je pak využita pro biosyntézu dalších látek. U kvasinek spodního i svrchního kvašení probíhá při kvašení glykogeneze, ale vzniklý glykogen je postupně odbouráván [7].

2.2 Metabolismus dusíkatých látek

Extrakt mladiny obsahuje asi 5 % N-látek – bílkoviny, aminy, peptidy, aminokyseliny (dále AMK), puriny a některé vitaminy [7]. Z toho mohou kvasinky využívat asi jen 30 %. Tato část je označována jako FAN (Free Amino Nitrogen, bezdusíkaté látky výtažkové) a tvoří ji volné AMK a nižší peptidy [16]. Rychlost absorpce AMK kvasinkami je přímo úměrná koncentraci AMK v substrátu. Mladina obsahuje hlavních 19 AMK, které jsou kvasinkami různou rychlostí vstřebávány a využívány (*Tabulka 2: Rozdělení AMK v mladině podle rychlosti asimilace kvasinkami*). Prolin, jakožto nejvíce zastoupená AMK v mladině, má nejnižší rychlost absorpce, popř. není využit vůbec [23]. V případě vysoké koncentrace AMK v mladině je potlačena syntéza z jiných zdrojů a AMK jsou rychle asimilovány. Aminokyseliny se nezapojují přímo do bílkovin při jejich syntéze, nejprve se účastní jiných metabolických reakcí [2]. Proteosyntézu si nemůžeme představit jako obrácený pochod proteolýzy, jelikož rovnováha štěpení je zcela na straně hydrolýzy. Pro syntézu proteinů je důležitý dostatek energie pro vznik peptidických vazeb, ale i genetická informace pro vznik primární struktury bílkovin [7].

Tabulka 2: Rozdělení AMK v mladině podle rychlosti asimilace kvasinkami [23]

Rychlá absorpce	Středně rychlá absorpce	Pomalá absorpce	Velmi malá/žádná absorpce
Kyselina glutamová	Valin	Glycin	Prolin
Kyselina asparagová	Methionin	Fenylalanin	
Asparagin	Leucin	Tyrosin	
Glutamin	Izoleucin	Tryptofan	
Serin	Histidin	Alanin	
Threonin		Amoniak	
Lysin			
Arginin			

Odbourávání AMK je realizováno v reakcích: transaminace, oxidační deaminace a dekarboxylace za účasti enzymů jako katalyzátorů. O využití AMK kvasinkami rozhodují zpravidla tyto faktory:

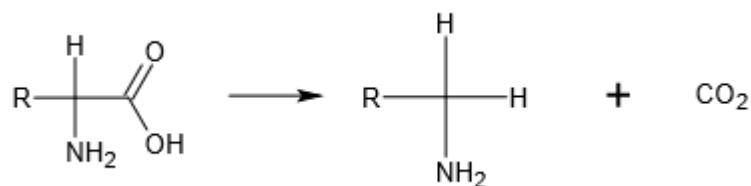
- koncentrace celkového asimilovaného dusíku v substrátu,
- koncentrace jednotlivých AMK v substrátu (spotřeba AMK je úměrná jejich koncentraci),
- transportní systémy pro přenos AMK do buňky [7].

2.2.1 Přeměna aminokyselin

Odbourávání AMK je uskutečňováno přeměnou postranního řetězce, dekarboxylací, transaminací na α -oxokyseliny anebo oxidační deaminací na α -oxokyseliny [24]. Téměř všechny AMK se mohou měnit transaminací (*Obrázek 1: Transaminace*). Ketokyseliny vznikají oxidační deaminací a dekarboxylací AMK se tvoří aminy a oxid uhličitý (*Obrázek 2: Dekarboxylace*) [7].



Obrázek 1: Transaminace [25]

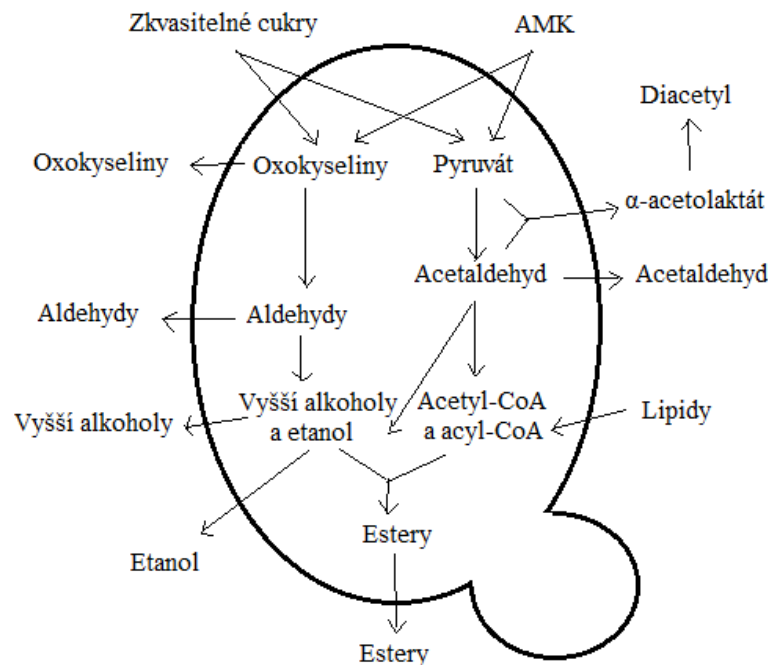


Obrázek 2: Dekarboxylace [25]

2.3 Syntéza sensoricky aktivních látek

Chuťový profil piva je jedním z nejdůležitějších znaků kvality. Vzájemný poměr jednotlivých složek ovlivňující organoleptické vlastnosti piva a jejich množství je typické pro daný druh. Chuť piva není pouze otázkou analytického stanovení jednotlivých sensoricky aktivních látek, to vysvětluje i fakt, že k obecnému profilu piva přispívají

i složky, jejichž koncentrace je pod prahem vyvolávající chuťový vjem [26]. Přehled důležitých skupin sensoricky aktivních látek je vidět na *Obrázku 3: Zjednodušené schéma vzniku většiny sensoricky aktivních složek během procesu fermentace.*

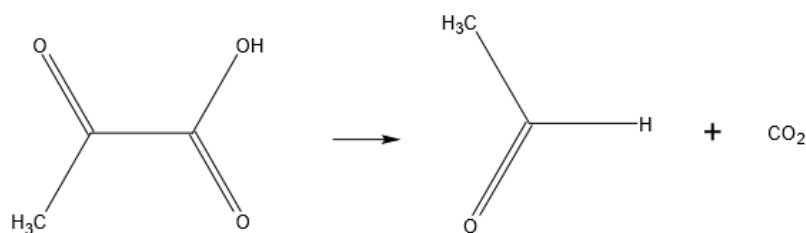


Obrázek 3: Zjednodušené schéma vzniku většiny sensoricky aktivních složek během procesu fermentace [26]

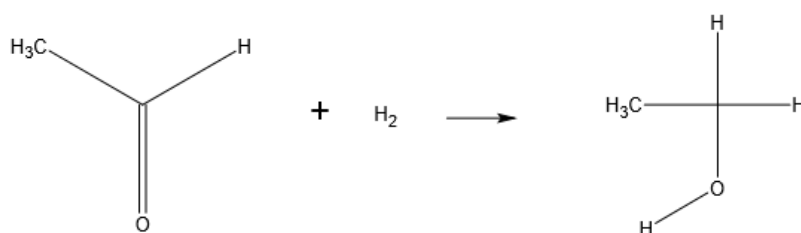
Pro praxi je velmi důležitá volba mezi kontinuální fermentací anebo tradiční vsádkovou. Z důvodu rozdílných podmínek prostředí je tvorba sensoricky aktivních látek kvasničnými kmeny rozdílná. Zejména výběr pivovarských kmenů zvláště vhodných pro kontinuální pivovarnictví byl podceňován a často jsou kmeny kvasinek s dobrým výkonem v tradičních vsádkových fermentorech automaticky aplikovány do kontinuálních reaktorů, bez ohledu na možný nesoulad mezi požadavky na kontinuální proces uspořádání, imobilizaci, stárnutí atd. [26].

2.3.1 Etanol a vyšší alkoholy

Syntéza etanolu (*Obrázek 5: Syntéza etanolu*) během kvašení piva pak probíhá jako adice atomů vodíku obsažených v molekule NAD^+ na acetaldehyd vzniklý dekarboxylací kyseliny pyrohroznové (*Obrázek 4: Dekarboxylace kyseliny pyrohroznové za vzniku acetaldehydu*). Vyšší alkoholy (přiboudliny) jsou tvořeny více než dvěma uhlíkatými atomy a jejich syntéza se zvyšuje s rostoucí teplotou během kvašení [21].



Obrázek 4: Dekarboxylace kyseliny pyrohroznové za vzniku acetaldehydu [21]



Obrázek 5: Syntéza etanolu [21]

Z vyšších alkoholů, přiboudlin, nebo jiných alkoholů než etanol, tvořených během fermentace jsou nejvýznamnější n-propanol, izobutanol a izoamylalkohol vyvolávající teplý pocit v ústech [26]. Jiné zdroje uvádí za nejčastější zástupce vyšších alkoholů 2-metylbutanol, 3-metylbutanol, metylpropanol a 2-fenyletanol [9], [27]. Jejich vznik probíhá po tzv. anabolické a katabolické cestě. V anabolické trase 2-oxokyseliny, vznikající během metabolismu cukrů, se dekarboxylují za vzniku aldehydů, které jsou pak redukovány na odpovídající alkoholy. Současně mohou 2-oxokyseliny pocházet z procesu utilizace AMK během katabolické tvorby vyšších alkoholů. Konečná koncentrace vyšších alkoholů je tedy podmíněna příjmem odpovídající aminokyseliny a mírou využití cukru [26]. Málokdy je koncentrace vyšších alkoholů v pivu natolik vysoká, aby zapříčinila závadu piva, ale ve vysokých koncentracích může negativně působit na chuť. Kondenzací alkoholů, včetně vyšších alkoholů, s karboxylovými kyselinami dávají vzniknout esterům, které přispívají vzniku ovocným příchutím. Například izoamylacetát vzniklý kondenzací izoamylalkoholu s kyselinou octovou dodá pivu banánovou příchutí patrnou při koncentraci 70 ppm/l [21].

2.3.2 Estery

Další velmi důležitou skupinou ovlivňující chuť piva jsou estery, jejichž obsah je důležitý zejména ve svrchně kvašených pivech typu Ale. Podle Brányika et al. (2008) mohou být

estery v pivu rozděleny na dvě hlavní skupiny. První skupina sestává z esterů kyseliny octové, jako jsou etylacetát (ovocná chuť), izoamylacetát (banánová chuť) a fenylacetát (chuť po růžích, medu a jablkách). Druhá skupina zahrnuje skupinu esterů tzv. etylesterovou nebo také estery se středně dlouhým řetězcem mastných kyselin. Do této skupiny patří např. etylhexanoát (etylkaproát) a oktanoát (etylkaprylát), oba estery propůjčují pivu jablečnou příchut' [26]. Syntéza esterů je spojena s koncentrací vyšších alkoholů, s výjimkou etylesteru kyseliny octové, který je spojen s etanolem. Acetátové estery jsou produktem kondenzačních reakcí mezi acetylkoenzym A a vyššími alkoholy. Tato reakce je katalyzována alkohol acetyltransferázou. Etylester kyseliny octové, izoamylacetát, izobutylacetát, fenyletylacetát a etylester mastné kyseliny s krátkým řetězcem etylhexanoát (C₆) a oktanoát (C₈) jsou zodpovědné za vysoce žádoucí ovocné vůně charakteristické pro daná piva [27]. I přestože je dobře známa a popsána syntéza esterů v buňkách kvasinek, fyziologická úloha těchto sloučenin je zatím neznámá. Existuje hypotéza, že syntéza esterů slouží k regeneraci volných koenzymů A nebo k detoxikaci od středně dlouhých mastných kyselin [28]. I přestože jsou estery přítomné pouze ve stopových množstvích, jsou velmi důležité pro chuťový profil piva [27].

2.3.3 Vicinální diketony

Diacetyl vzniká oxidační dekarboxylací z α -acetolaktátu unikajícího do extracelulárního prostředí při biosyntéze valinu. Acetylpropionyl vzniká podobným způsobem z α -acetohydroxybutyrátu. Je zřejmé, že úroveň enzymové aktivity kvasinek regulující syntézu valinu, má i nepřímý vliv na obsah diacetylu. Pokud je zvýšena koncentrace intracelulárního valinu, enzym (α -acetolaktát) odpovědný za jeho syntézu je inhibován a celková tvorba diacetylu je snížena. Je možné regulovat množství vicinálních diketonů a zamezit tak jejich nadměrné tvorbě [29]. Přídavkem bakteriální α -acetolaktát dekarboxylázy lze docílit konverzi α -acetolaktátu přímo na acetoin nebo použitím geneticky modifikovaných kmenů pivovarských kvasinek s vyšší tvorbou tohoto enzymu. Navíc se zdá, že různé enzymatické systémy pivovarských kvasinek se podílejí na snížení vicinálních diketonů. Ke konci hlavního kvašení a zrání je obsah diacetylu snížen, protože je kvasinkami rozkládán na acetoin a 2,3-butandiol, tedy sloučeniny s vysokým prahem chuti [26]. Snížení diacetylu v pivu je také podpořeno zpětnou reasimilací kvasinkami [30].

2.3.4 Organické kyseliny

V pivu se vyskytuje přibližně 200 organických kyselin o celkovém množství 50-250 mg/l [2]. Na rozdíl od esterů a alkoholů vysoký podíl (cca 50 %) organických kyselin (zejm. mastných kyselin) jsou původem z mladiny [28]. Zbylá část vzniká jako produkt metabolismu kvasnic. Vyskytují se zde kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem, které pochází jak z Krebsova cyklu během anaerobního růstu kvasnic, tak z katabolizmu AMK. Kyseliny jako pyruvát, acetát, laktát, citrát, sukcinát, malát a oxokyseliny přispívají ke snížení pH během fermentace a udělují pivu „kyselou“ chuť. Kyseliny se středně dlouhým uhlíkatým řetězcem ($C_6 - C_{12}$) jsou toxické pro kvasničné buňky. Vnikají z mastných kyselin s dlouhým řetězcem, nebo jsou uvolňovány do prostředí při buněčné autolýze. Kyseliny s dlouhým řetězcem mastných kyselin pocházejí zejména z mladiny a jejich výskyt v pivu je nežádoucí z důvodu negativního vlivu na chuť a stabilitu pěny piva [26].

2.3.5 Karbonylové sloučeniny

Aldehydy vznikají zejména při výrobě mladiny (během rmutování sladu a chmelovaru) a pak jsou částečně syntetizovány během kvašení z oxokyselin. Některé kmeny kvasinek jsou vybaveny enzymatickými systémy a mohou se tak podílet na transformaci aldehydu během kvašení. Mezi karbonylové sloučeniny, které jsou přítomny ve sladince a vysoce ovlivňují chuť, patří např. 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal, hexanal, heptanal [26]. Vzhledem k tomu, že je acetaldehyd většinou vytvořen v průběhu aktivní fáze růstu kvasinek, jeho obsah může být řízen vhodnou dávkou kyslíku. Ke zvýšení jeho obsahu také napomáhá kontaminace bakterií rodu *Zymomonas*, zvýšení tlaku ve fermentoru, snížená aktivita kvasinek, nebo jejich předčasná separace [31].

2.3.6 Další sensoricky aktivní látky

Na chuti piva se nepodílejí pouze látky vzniklé jako metabolity s procesu kvašení piva ale i látky získané extrakcí použitých surovin (chmel, slad). Např. u plzeňského piva je jeho hořká chuť dána vysokou koncentrací izohumulonů a humulenů extrahovaných z chmelu. Vysoký podíl furaneolu (extrahovaný ze sladu jako produkt Maillardovy reakce) je zodpovědný za karamelovou chuť tmavých piv [32]. Jedním z významných kritériem pro hodnocení sensorického profilu piva je také jeho pěna, a to především její objem (udáván obsahem CO_2), hustota a stabilita. Na stabilitu pěny má vliv obsah β -glukanů, které zároveň zvyšují její viskozitu, dále produkty degradace proteinů, hořké sloučeniny z chmele a pentózany. Za

destabilizátor pěny je považován lyzofosfatidyl cholin [9]. Doposud je stále nezodpovězenou otázkou, jestli biogenní aminy (BA) ovlivňují i sensorické kvality piva [3].

3 PROCES KVAŠENÍ PIVA

Fermentaci mladiny lze rozdělit na dvě fáze. Jednou z nich je hlavní kvašení, kdy se po ochlazení mladiny na zákvasnou teplotu přidají pivovarské kvasinky, které zkvasí podstatnou část mladiny za tvorby biomasy, etanolu, oxidu uhličitého a dalších metabolitů. Standardní doba hlavního kvašení je 6-10 dní, záleží na použité technologii a stupni prokvašení [2]. Druhou fází je dokvašování piva, které probíhá už za nižších teplot (okolo 0 °C) a mírného přetlaku. V tradičních výrobcích fáze dokvašování může trvat až tři měsíce. V dnešních moderních intenzifikovaných velkoobjemových výrobcích je doba dokvašování zkrácena až na jeden týden [18].

Podle použitých kvasnic rozeznáváme spodní kvašení, ke kterému dochází při teplotách 5 °C až 10 °C a ke konci procesu kvasinky sedimentují na dno kvasné nádoby a svrchní kvašení při 15 °C až 25 °C kde kvasinky jsou vynášeny tvořícím se CO₂ k hladině kde tvoří tzv. deku [2], [9].

Svrchně kvašená piva jsou nejčastěji produkována pivovary v Anglii a Belgii, známá jsou také německá piva „Kölsch“, „Altbier“, „Weiss“ [9]. Pro výrobu českých piv je typické spodní kvašení, k jehož přeměně ze svrchního došlo od konce 1. poloviny 19. století [33].

Typ piva je determinován použitou technologií a použitými surovinami, tyto faktory pak ovlivňují výslednou chuť a vůni piva (*Tabulka 3: Charakteristika vůně a chuti různých typů piva*).

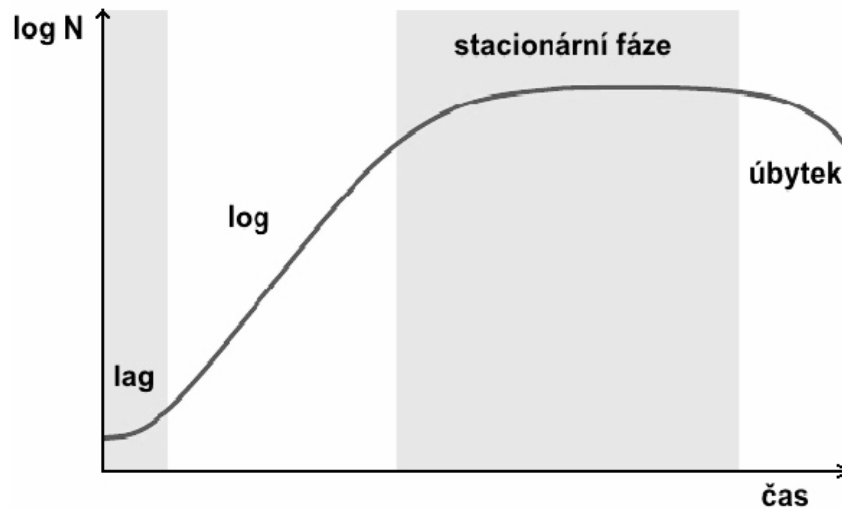
Tabulka 3: Charakteristika vůně a chuti různých typů piva [9]

Charakteristika/ intenzita*	Munich	Pilsner	Světlé pivo	Americký ležák	Stout	Lambic
Hořkost	3-6	6-10	5-8	2-4	6-10	3-6
Alkoholová příchut'	2-4	3-4	3-4	3-5	3-5	3-6
Prosycenost CO ₂	3-4	3-4	1-3	4	3-4	3-5
Chmelová chuť	2-6	6-10	5-8	0,5-4	6-10	3-6
Karamelová příchut'	4-8	0,5-2	3-5	0,5-1	6-100	1-3
Ovocná/esterová chuť	1-2	1-1,5	1-2	2-3	2-3	3-5
Sladká chuť	2-3	1-2	1-2	2-3	1-2	1-2
Kyselá chuť	1-2	1-2	1-2	1-2	2-3	3-20
Zelná příchut'	1-2	1-3	0,2-0,8	1-3	0,2-0,8	1-10

*semikvantitativní hodnota vypočtená na základě zjištěných aromatických hodnot

3.1 Kinetika procesu kvašení mladiny

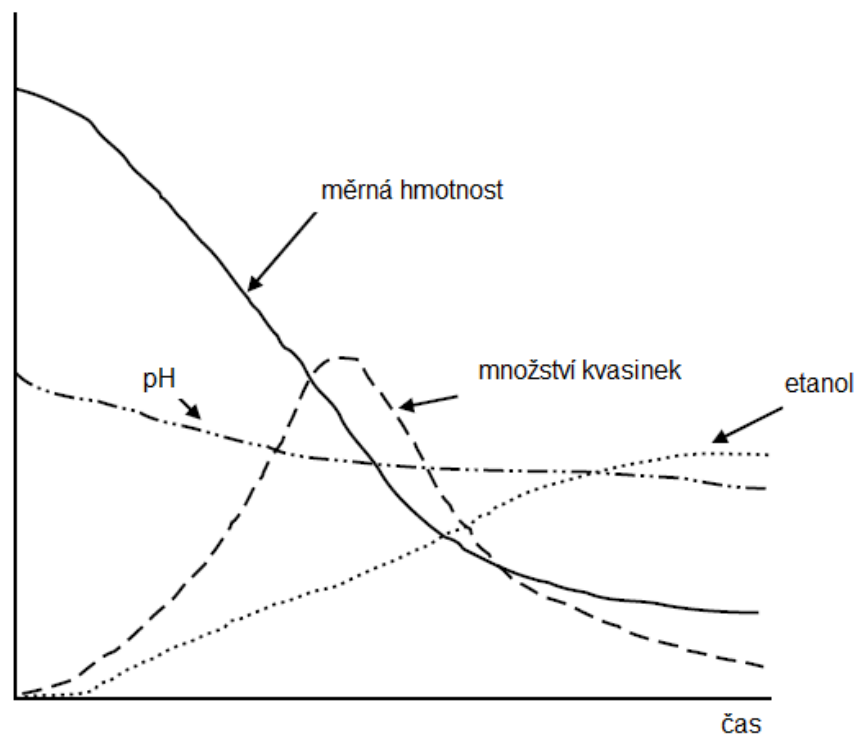
Přírůstek mikroorganismů v procesu kvašení je charakterizován růstovou křivkou (Obrázek 6: Schéma růstové křivky mikroorganismů) z toho je patrné, že v průběhu dochází k fyziologickým změnám rostoucích buněk [7].



Obrázek 6: Schéma růstové křivky mikroorganismů

Lag fáze definuje dobu (několik hodin) zdržení po zakvašení, během které se kvasinky přizpůsobují novému prostředí a připravují se na množení. Probíhá syntéza DNA a enzymů. [22]. Hlavním zdrojem energie pro kvasinky je maltóza. Kvasinky musí být z mladiny zásobeny AMK nutnými pro syntézu látek určených pro růst kvasničné buňky [7]. V další log fázi, nebo také v exponenciální fázi, dochází k množení buněk, vzniká CO_2 a růstová rychlost je nejvyšší [16]. V této fázi tzv. hlavního kvašení se kvasinky pomnoží na potřebnou koncentraci a zkvasí podstatnou část látek z mladiny. Hlavní kvašení trvá v průměru 7 až 10 dnů, záleží na teplotě (čas kvašení se zkracuje s rostoucí teplotou) [18]. Produkty kvašení jsou etanol, CO_2 , zmíněná biomasa a řada dalších látek významných pro buket piva (estery, alkoholy, mastné kyseliny, oxid siřičitý). Mezi látky negativně ovlivňující chuť piva patří metabolity kvašení na bázi sirných sloučenin, aldehydy a ve vyšším obsahu i diacetyl. Ukončení této fáze je v provozu charakterizováno počínající tvorbou bílých kroužků [22]. Růst je ukončen ve stacionární fázi, kdy je dosaženo vrcholu růstové křivky. V praxi během kvašení po exponenciální fázi následuje ještě fáze poklesu koncentrace buněk, pro kterou je charakteristická flokulace kvasničných buněk. Vzniklý CO_2 je nestačí vynášet a promíchávat a dochází tak k sedimentaci buněk na dno kvasné nádoby [2]. Je nutno dodat, že v praxi je měřena koncentrace buněk v mladině, ve které ale buňky sedimentují. Z toho důvodu růstová křivka vykazuje znatelný pokles v posledních fázích kvašení. Celkem se

počet buněk znásobí dvakrát až čtyřikrát [16]. U provozního kvašení je konec stacionární fáze vyznačován stadiem bílých kroužků [22].



Obrázek 7: Probíhající změny během pivovarského kvašení [5]

Během kvašení klesá hodnota pH z důvodu tvorby kyselin a protonů (Obrázek 7: Probíhající změny během pivovarského kvašení). Množství alkoholu se zvyšuje, měrná hmotnost extraktu se snižuje z důvodu nižší hustoty alkoholu oproti cukru. Na konci procesu jsou kvasničné buňky šetrně odstraněny, aby nedošlo k jejich autolýze a nebyla ovlivněna chuť piva a kvalita pěny. Zůstane zde ale dostatečné množství kvasinek pro sekundární kvašení [5]. Dokvašování a ležení piva probíhá za mírného tlaku, zbylý extrakt je dokvašován a následuje číření a sycení CO_2 [16].

3.2 Faktory ovlivňující průběh hlavního kvašení

I přestože se výrobci snaží o zajištění co nejstandardnějších podmínek při výrobě, stává se, že jsou kmeny kvasinek nuceny reagovat na např. výkyvy koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH, osmolarity, koncentrace etanolu, změny v obsahu živin, teplotní změny, hydrodynamický (při odstředování kvasnic), na chemický stres a jiné [34]. Schopnost kvasinek efektivně reagovat na změnu podmínek je nezbytné nejen pro výrobu piva, ale také

pro udržení vitality kvasinek pro následnou opakovanou inokulaci do mladiny [35]. V následujících kapitolách budou popsány vybraní činitelé mající vliv na průběh kvašení.

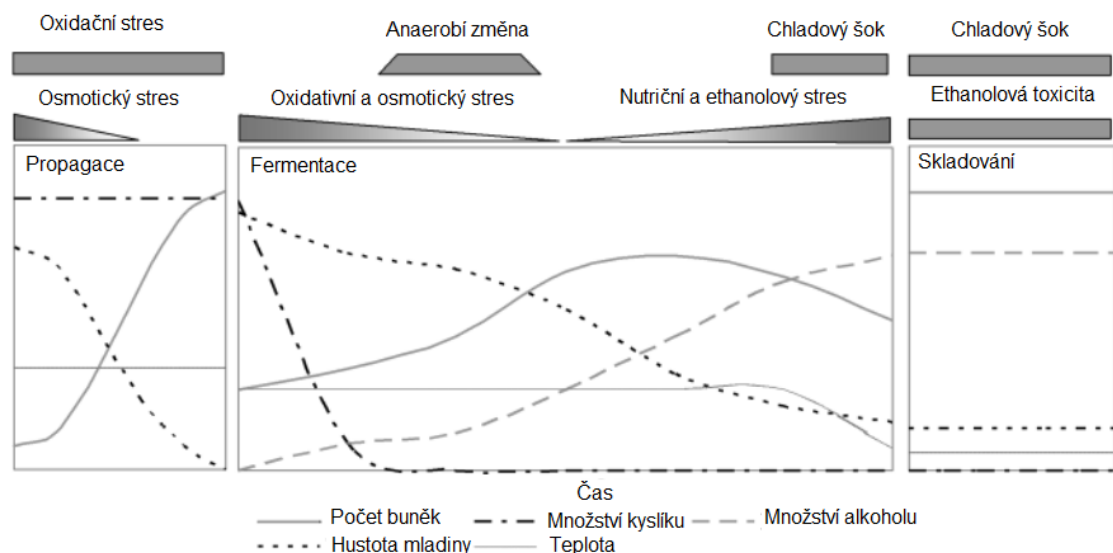
3.2.1 Složení mladinového extraktu

Příjem živin kvasničnými buňkami je uskutečňován celým jejich povrchem skrz cytoplazmatickou membránu. Buněčná stěna kvasinek je velmi pevná a zajišťuje kvasinkám rigiditu. Hlavní mechanismy řídicí přenos živin do buňky je aktivní (přenos sacharidů, AMK) a pasivní transport (usnadněná difúze). Kromě zdrojů uhlíku a dusíku jsou pro růst kvasnic zásadní i anorganické soli, vitaminy a enzymy [7] [2]. Pro správnou činnost enzymů je nutné potřebné množství kovů v mladině. Klíčovým objevem se stalo objevení vlivu zinku na průběh hlavního kvašení. Jeho nedostatečné množství (pod 0,2 mg/l) výrazně zpomaluje kvašení. Pokud je vyžadován jeho přídavek do sladiny před chmelovarem, musí být bráno v úvahu jeho pravděpodobné vysrážení a adsorpce na mladinové kaly, a to až ze 40 % jeho celkového množství [16]. Obdobné je to i s jinými solemi kovů. Hořčnaté ionty musí několikanásobně převládat nad vápenatými. Zmíněné ionty hořčíku a vápníku zvyšují toleranci kvasinek vůči etanolu, u zinku byl navíc prokázán i protektivní účinek proti teplotnímu stresu [36]. Sírany jsou důležitým zdrojem pro syntézu glutathionu, methioninu a cysteinu. Metabolizmem sirných sloučenin pak vznikají metabolity důležité pro sensorické vlastnosti piva a jeho stabilitu. Fosfor je začleňován do struktur nukleových kyselin, fosfomannanů a fosfolipidů. Z vitaminů a enzymů je důležitý obsah biotinu a kyseliny pantotenové, jejichž nedostatek je projevem zvýšené tvorby sulfanu a poruchy metabolismu sirných sloučenin. Růst kvasinek je také podporován myoinositolem, nikotinovou kyselinou, thiaminem a pyridoxinem [16].

3.2.2 Koncentrace kyslíku

Přestože kvašení mladiny je anaerobní proces, jistá koncentrace kyslíku rozpuštěného v mladině být musí. Růst kvasinek totiž závisí i na obsahu ergosterolu v buňkách a ten se při striktně anaerobním prostředí netvoří. Částečného provzdušnění je dosahováno při zakvašování a při plnění do cylindrokónických tanků (CKT), případně při umělém větrání studené mladiny. K provětrávání studené mladiny by mělo docházet z toho důvodu, že se stoupající teplotou klesá stupeň nasycení [7]. Existují kvasinky označované jako respiračně deficientní-mutanti, které jsou přítomny v populaci pivovarských kvasinek asi v 1 % [16]. Ty mohou vznikat z důvodů změn, ztráty nebo delece mitochondriální DNA a to buď spontánně, při opakovaném nasazování kvasinek nebo působením různých činidel jako např.

ethidium bromidu. Přítomnost těchto mutantů se může projevit například nedostatečným prokvašením mladiny nebo zvýšenou produkcí etanolu. Tzv. „kyslíkový paradox“ zdůrazňuje nezbytnost kyslíku pro aerobní dýchání a metabolismus, ale zároveň poukazuje na negativní (jedovaté) působení kyslíku z důvodu tvorby reaktivních forem kyslíku (dále ROS): superoxidového radikálu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu. To může vést k poškození buněk, oxidačnímu stresu, stárnutí buněk, popř. až k apoptóze [35], [37]. Proti oxidačnímu stresu se organizmy brání tvorbou enzymů CuZn-superoxiddismutázy, Mn-superoxiddismutázy a katalyzátory, které jsou označovány jako indikátory oxidačního stresu [16]. Tak vysokému oxidačnímu stresu jsou pivovarské kvasinky málokdy vystaveny, nicméně přexponování kyslíku ve fermentační nádobě může mít za následek nadměrný růst kvasinek na úkor produkce etanolu [35].



Obrázek 8: Možný stres v průběhu propagace v pivovaru, kvašení a skladování [35]

Jak je možné vidět na Obrázku 8: Možný stres v průběhu propagace v pivovaru, kvašení a skladování, přechod z aerobní fáze růstu (propagace) do anaerobní (fermentace) se projevuje výraznými změnami v růstové rychlosti nebo rychlosti produkce etanolu [35]. Při změně růstu anaerobního růstu v aerobní se rychle zvyšuje specifická aktivita CuZn-superoxiddismutázy, citrát syntázy a Mn-superoxiddismutázy, ale aktivita katalázy není ovlivněna [34].

3.2.3 Teplota kvašení

Teplotnímu stresu vystavíme kvasinky, pokud na ně budeme působit výrazně vyšší nebo nižší teplotou, než je jejich teplotní optimum, přičemž důležitým faktorem je rychlost

teplotní změny [16]. Na zvýšení teploty reagují kvasinky syntézou tzv. HSPs (heat-shock proteins, proteiny teplotního šoku), které zvyšují tepelnou odolnost kvasnic. Bylo zjištěno, že apoptóza kvasničných kultur byla indikována teplotním šokem, kdy dochází k tvorbě ROS. Přídavek cykloheximidu může zabránit programované smrti, ale na tvorbu ROS, nemá podstatný vliv [37]. Častěji se ale v pivovarství můžeme setkat s chladovým šokem, který se negativně projeví na buněčných membránách, které mohou začít působením chladu gelovatět [34]. Jak ukazuje *Tabulka 4: Zvýšená tolerance ke stresovým podmínkám po předchozím teplotním stresu*, pokud jsou kvasnice vystaveny vyšší teplotě a přežijí, jejich odolnost vůči vyšším teplotám nebo vysokému obsahu etanolu roste [16].

Tabulka 4: Zvýšená tolerance ke stresovým podmínkám po předchozím teplotním stresu

Typ kvasnic	Teplotní stres před inkubací [°C]	Buňky přežívající při 45 °C [%]	Buňky přežívající v 20% etanolu [%]
ležácké	21	6,4	52,4
ležácké	37	85,5	98,5
Ale	21	14,7	49,2
Ale	37	89,4	78,5

K teplotnímu stresu dochází nejčastěji při nesprávném režimu chlazení kvasnic v CKT, kde může docházet ke špatné propagaci chladu přes vrstvu kvasnic. To je příčinou nenávratného poškození buněčných struktur vlivem rozdílu teplot uvnitř buňky (vysoké teploty) a vnější stěny buněk, která je vystavena chladovému šoku. K tomuto jevu dochází zejména u kvasnic při výrobě piva typu Ale, které jsou přiváděny ze skladovacích van s teplotou 4 °C do mladiny o teplotě 24 °C) [16].

3.2.4 Osmotický stres

Vyšší rozdíl osmotických koncentrací uvnitř a vně buňky (při kvašení mladiny s vysokou koncentrací extraktu) může podmiňovat plazmolýzu [16], která snižuje životaschopnost kvasinek a začíná při zvýšení osmolarity na ~ 1200 mOsm/l [34]. Vnitrobuněčná osmolarita kvasinek odpovídá 540-570 mOsm/l, na rozdíl od 12% mladiny, která má přibližně 800 mOsm/l [38]. Použitím technologie HGB (High Gravity Brewing), nebo VHGB (Very High Gravity) jsou kvasinky vystaveny tlaku 1500-1800 mOsm/l, který je schopen indukovat hyperosmotický stres. Tím je pak ovlivněna nejen rigidita kvasničných buněk, ale také se prodlužuje doba potřebná na fermentaci o 15-90 % a zpožďuje se i sedimentace kvasinek [34]. Účinnou zábranou proti osmotickému stresu je přítomnost trehalózy uvnitř

buňky a glycerolu a AMK vně buňky. Proti těmto negativním vlivům se doporučuje zvýšit obsah kovů v zakvašované mladině a obohacení o růstové faktory [16].

3.2.5 Etanolový stres

Inhibice růstu a redukce velikosti kvasinek je zaznamenána už u obsahu 10 % (v/v) etanolu. V množství 20 % (v/v) etanolu v růstovém prostředí je pak zcela inhibována jejich fermentační schopnost [16]. Za vhodných nutričních podmínek (dostatečný zdroj dusíku, sterolu, nenasycených mastných kyselin) kvasinky tolerují takto vysokou koncentraci a produkce etanolu jsou schopny až do 16 % (v/v). Etanol má vliv na propustnost hydrofilní vrstvy cytoplazmatické membrány, která se zvyšuje, což způsobí pokles vnitrobuněčného pH, ztrátu protonmotorické síly na membráně. Sniží se rychlost respirace a příjem glukózy, což má za následek snížení fermentace. Etanol také indukuje vznik mutací mtDNA [34]. Odolnost vůči etanolu je dána zejména geneticky, dále pak množstvím živin v mladině, i na koncentraci iontů Mg^{2+} , které etanolovému stresu zabraňují.

3.2.6 Tlakový stres a stres oxidem uhličitým

Hydrostatický stres je obvykle zmiňován v souvislosti s kvašením piva v CKT. Desetimetrový sloupec kapaliny zvyšuje hydrostatický tlak o 100 kPa. Výška CKT může dosahovat až 40 m [39]. Krom hydrostatického tlaku se uplatňuje ještě tlak rozpuštěného CO_2 , jehož rozpustnost v pivu je závislá na teplotě a tlaku. Na druhou stranu je přítomnost CO_2 velmi žádaná z důvodu nižší tvorby nežádoucích těkavých látek [16].

3.2.7 pH jako stresový faktor

Pokles pH mladiny z původních 5,5 až k pH 4,3 hotového piva je dán tvorbou CO_2 a organických kyselin během kvašení. Kvasinky si po celou dobu zachovávají nitrobuněčné pH okolo 5,9-6,4. Více než prostředí mladiny, které kvasinky zkvašují, je mnohem více stresující prostředí při procesu praní kvasnic kde pH klesá na hodnoty 2,5. K praní se používají minerální kyseliny sírová a fosforečná, popř. s přidavkem peroxidisíranu amonného, které ovlivňují proteiny plazmatické membrány [16] [34]. Obecně platí, že opakovaným zakvašováním dochází ke snižování viability kvasinek, postupně se mění jejich fyziologie a dochází ke změnám flokulace a povrchového náboje kvasinek [34].

3.2.8 Vitalita kvasničných buněk

Kvasinky obecně mají omezenou životnost. Jejich replikační schopnost je určena geny a podmínkami prostředí. Pivovarské kmeny jsou schopné tvořit 10-30 generací, poté přecházejí do non-replikačního stavu nazývaného stárnutí [26]. Tzv. Hayflickův limit označuje počet dělení, kterých je kvasničná schopna [16]. Kromě snížení viability dojde také k projevu celé řady změn, jako je např. zvýšení velikosti kvasničné buňky, zvrásnění jejich povrchu, zvýšení generační doby, snížení metabolické aktivity a zvýšení počtu jizev po nově vzniklých dceřiných buňkách [16], [26]. O věku pivovarských kvasnic vypovídá projev flokulace. Nejprve se na dně kvasné nádoby usazují velké staré buňky s nízkou fermentační aktivitou a až později buňky mladší [40].

4 BIOGENNÍ AMINY

BA jsou organické dusíkaté nízkomolekulární sloučeniny bazické povahy s vysokou biologickou aktivitou, které vznikají dekarboxylací aminokyselin. Tento proces může být katalyzován prostřednictvím dvou biologických cest. Buď dochází k dekarboxylaci, která je katalyzována přirozeně se vyskytujícími endogenními dekarboxylázami přítomnými v živočišných nebo rostlinných buňkách, anebo exogenními enzymy, které jsou produkovány mikroorganismy za příznivých podmínek [41]. Pro živé organismy jsou BA zdrojem dusíku pro stavbu nukleových kyselin, proteinů nebo hormonů jako např. adrenalin a noradrenalin. Vyšší koncentrace BA v nefermentovaných potravinách slouží jako indikátor kažení [42]. Celkové množství BA závisí zejména na povaze potravin a přítomnosti mikroorganismů [43]. Zvláštní skupinu tvoří polyaminy, které se dříve řadily mezi BA. V současnosti tvoří samostatnou skupinu kvůli rozdílné syntéze a biologickým účinkům. Polyaminy jako spermin (SPM) a spermidin (SPD) vznikají biologickou syntézou na rozdíl od BA, které vznikají jednoduchou dekarboxylací [44], [45]. Hrají důležitou roli ve všech živých buňkách, neboť se podílejí na syntéze bílkovin a nukleových kyselin. Na druhou stranu polyaminy vykazují imunosupresivní účinky a pozornost je jim v současnosti věnována ve spojitosti s vyšší koncentrací ve většině nádorových tkáních [46].

Rozdělení BA a polyaminů je možné z několika hledisek, nejčastěji se ale setkáváme s rozdělením podle chemické struktury a to na:

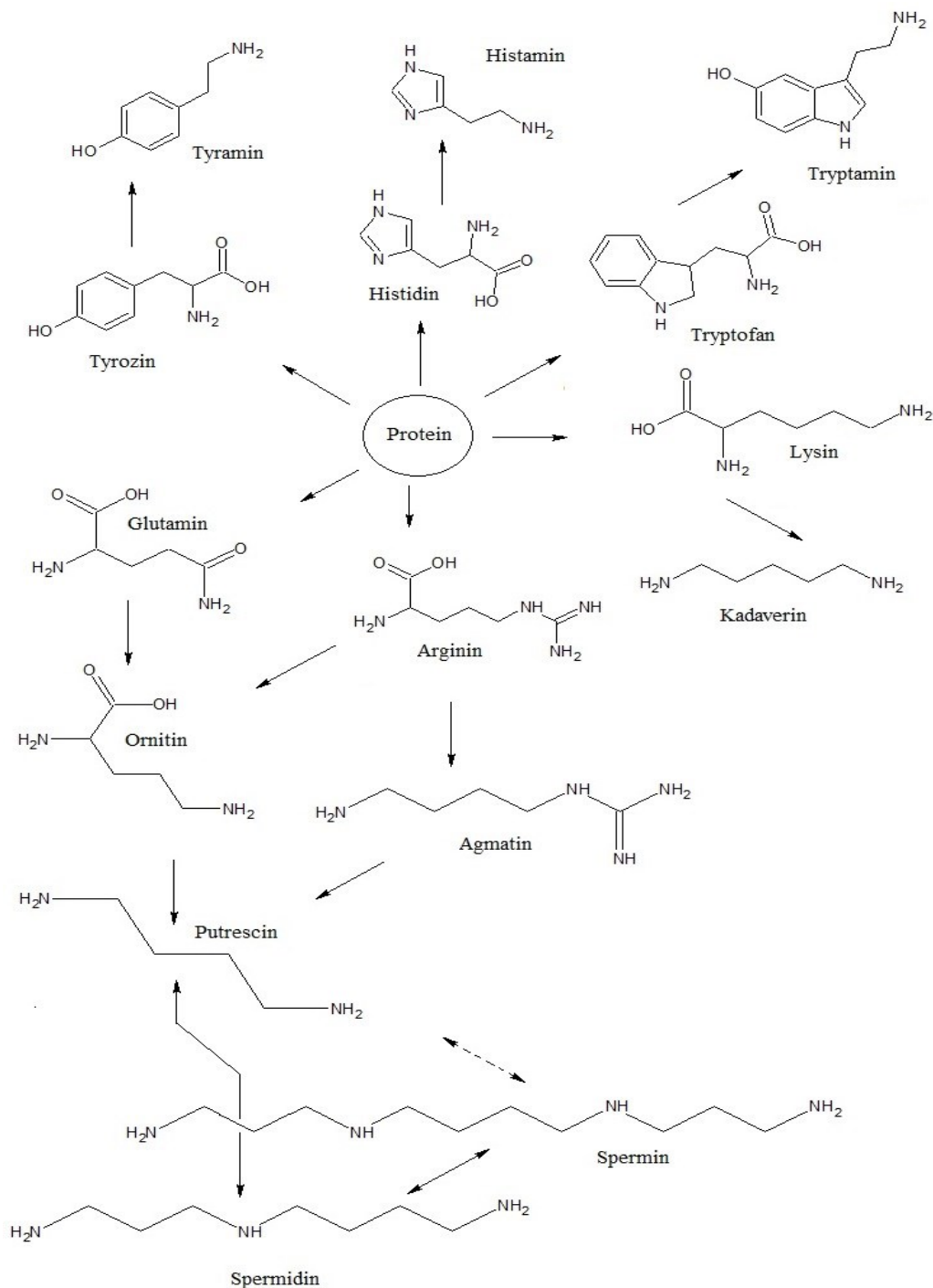
1. alifatické [kadaverin (CAD)]
2. aromatické [tyramin (TYR), 2-fenyletylamin (PEA)]
3. heterocyklické [histamin (HI) a tryptamin (TR)]
4. polyaminy [SPD, SPM, putrescin (PUT), agmatin (AGM)]

Stejně jako jsou diaminy (CAD a PUT) řazeny mezi polyaminy, podobně jsou heterocyklické aminy řazeny do skupiny aromatických aminů [47].

4.1 Vznik biogenních aminů a polyaminů v potravinách

BA vznikají v potravinách procesem mikrobiální dekarboxylace aminokyselin. Prostou dekarboxylací vznikají pouze primární BA, jako jsou např. HI, TYR, CAD a PUT [48]. Přirozené polyaminy (SPD, SPM a související struktury) jsou syntetizovány z putrescinu za katalýzy spermidinsyntázy a sperminsyntázy [46]. Tvorba BA (*Obrázek 9: Metabolické*

cesty tvorby BA) je ovlivněna mnohými faktory, jako je např. dostupnost substrátu, teplota a pH, přítomnost kyslíku a dalších látek, které ovlivňují rozvoj mikrobiálních producentů [41]. V biosyntéze všech těchto aminů je klíčový enzym s dekarboxylázovou aktivitou. Jsou to dekarboxylázy aromatických aminokyselin pro serotonin, TR a dopamin, histidin-dekarboxylázy pro histamin, arginin-dekarboxylázy pro AGM a ornitin-dekarboxylázy pro PUT [49].



Obrázek 9: Metabolické cesty tvorby BA [50]

4.2 Toxicita biogenních aminů a polyaminů

BA jsou pro člověka nepostradatelné, ale zároveň ve vysokých koncentracích nebezpečné (*Tabulka 5: Přehled toxických účinků BA*) [25]. Detoxikační systém ve střevní stěně savců je schopen detoxikovat organismus od normálního denního příjmu BA, a to za pomoci aminooxidáz nebo konjugací. Důležitou roli zde tedy hrají monoaminoxidázy (MAO) a diaminoxidázy (DAO), které se vyskytují ve střevním epitelu [41]. Polyaminy jsou v první řadě acetylovány a poté oxidovány DAO nebo polyaminoxidázami. U lidí trpících gastrointestinálními problémy (např. gastritidou, syndromem dráždivého tračníku, Crohnovou chorobou, vředy) je snižená detoxikační funkce pomocí MAO a DAO, a proto jsou náchylnější k intoxikaci BA. Stejnému riziku jsou vystaveni i pacienti požívající léky s inhibičními účinky na MAO a DAO (antihistaminika, antimalarika, antidepresiva) [51]. Proto s vyšším příjmem BA a polyaminů, nebo u senzibilních jedinců, alergiků, roste riziko vzniku otravy BA a polyaminy [52].

Tabulka 5: Přehled toxických účinků BA [25], [51]

Biogenní amin	Původní AMK	Další prekurzory AMK a transformace aminu	Biologický význam, farmakologický efekt
histamin	histidin		lokální tkáňový hormon, uvolňuje adrenalin a noradrenalin, ovlivňuje krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy, excitace hladké svaloviny uteru, střev a dýchacích cest, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
kadaverin a putrescin	lysin a ornitin	N-metylputrescin, spermidin, spermin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciace buněk, způsobuje: hypotenzi, bradykardii, křeč žvýkačického svalu, parézu končetin, potencuje toxicitu ostatních aminů
agmatin	arginin	putrescin, N-metylputrescin, spermidin, spermin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciace buněk, rostlinný hormon
fenyletylamin	fenylalanin	tyramin, dopamin, adrenalin, noradrenalin	prekurzor tyraminu, zvyšuje krevní tlak, uvolňuje noradrenalin ze sympatického nervového systému, způsobuje migrénu

tyramin	tyrosin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, synefrin, hordenin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
dopamin	3,4dihydroxyfenylalanin (DOPA)	noradrenalin, adrenalin	mediátory sympatických nervů
tryptamin	tryptofan	serotonin, melatonin	lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev a na psychické funkce, zvyšuje krevní tlak

4.3 Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich účinky na lidské zdraví

BA a polyaminy lze chápat jako přírodní antinutriční látky, které jsou významné i z hygienického hlediska. HI, PUT, CAD, TYR, TR, PEA, SPM, SPD a jsou považovány za nejdůležitější BA, které se vyskytují v potravinách. Nejčastější a z hlediska dopadu na lidské zdraví nejvýznamnější jsou otravy jídlem obsahující zejména HI [51]. Otravy HI jsou často pozorovány po požití konzervovaných ryb s vysokým obsahem HI, jako jsou ryby čeledi *Engraulidae*, *Scombridae*, *Clupeidae*, *Coryfenidae*, *Pomatoidea*, *Scombrosidae* (tuňák, makrela, sardinky aj.) [50] [53]. HI může také vyvolat reakci alergického typu vyznačující se potížemi s dýcháním, svěděním, vyrážkou, zvracením, horečkou a hypertenzí. Tyto příznaky mohou být pozorovány u lidí s nedostatečně funkčním detoxikačním mechanismem v důsledku genetické vady nebo v důsledku příjmu antidepresiva jako inhibitory MOA [53]. I přestože pivo nepatří mezi nejvýznamnější zdroje BA, velmi vysokou nalezenou hodnotu koncentrace HI obsahoval vzorek evropského piva a to 67,5 mg/l (ze zkoumaných 195 vzorků piv) [3] a maximální nalezená hodnota českého piva byla 19,8 mg/l [54]. Česká piva obsahují vysoké hodnoty obsahu CAD, který má sice menší toxické účinky než HI a TYR, ale na druhou stranu zesiluje účinek těchto BA [3] [54] [55]. Je to způsobeno zejména následkem kontaminace kvasnic nebo mladiny enterobakteriemi [3]. V jedné studii se Buňka a kol. (2012) zabývali obsahem BA v českých pivech a zjistili, že zhruba v 75 % případů byl TYR přítomen v koncentračním rozmezí 0–10 mg/l, asi 20 % případů obsahovalo pivo 10–50 mg/l TYR a zbylé vzorky piv obsahovaly TYR v koncentraci 50–100 mg/l [55]. Otravy TYR jsou časté u dalších druhů potravin jako

fermentované masné výrobky, kysané zelí a sýry. Příkladem může být jev označovaný jako „sýrová reakce“, což je otrava způsobená vysokou hladinou TYR v sýrech. Množství TYR pod 10 mg/l piva by nemělo u zdravých jedinců představovat zdravotní riziko [53], [3].

Stanovení prahu toxicity BA a polyaminů je však velmi obtížné. Toxická dávka je silně závislá na účinnosti detoxikačního mechanismu jedince. Byla navržena horní hranice pro HI v potravinách 100 mg/kg potravin a 2 mg/l alkoholického nápoje, pro TYR 100-800 mg/kg potravin a pro PEA 30 mg/kg potravin [56]. HI je spojován s častými otravami jídlem, zatímco u TYR a PEA se předpokládá, že jsou iniciátory hypertenzní krize. Toxicita HI může být zvýšena přítomností jiných aminů, jako je CAD, PUT a TYR [57]. BA (PUT, CAD, SPD, SPM) mohou být také považovány za karcinogeny, kvůli jejich schopnosti reagovat s dusitany za vzniku potenciálně karcinogenních nitrózaminů [50] [53].

Obsah BA byl sledován u mnoha jiných potravin a krmiv, obsáhlé studie byly provedeny u vzorků sýra, rybích a masných výrobků, vajec a hub. U potravin, u nichž došlo v procesu výroby k fermentaci, nebo u kterých došlo k mikrobiální kontaminaci, obsahují zpravidla více BA [51].

Alkoholické nápoje jako jsou pivo a víno patří mezi potraviny, které mohou právě z důvodu přítomnosti BA způsobovat u konzumentů zdravotní problémy. Alkohol, stejně jako antidepresiva, negativně ovlivňuje detoxikační systém a to tak, že významně snižuje aktivitu MOA, což vede k inhibici odbourávání BA z organismu, a tím ke zvýšení jejich toxicity [54], [57]. Proto se toxický efekt BA a polyaminů zvyšuje a již nízké koncentrace HI (8-20 mg/l), TYR (25-40 mg/l) a PEA (3 mg/l) mohou představovat zdravotní riziko [58] [3].

Nejčastější BA, který je příčinou otrav z piva, je TYR, jehož účinky navíc umocní alkohol obsažený v pivu. Pivo může být rovněž příčinou bolesti hlavy u osob citlivých na migrény [51]. Od 1. 10. 2012 je zrušena vyhláška 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. Tato vyhláška ukládala limit pro HI v pivech 20 mg/l. V současnosti evropská legislativa ukládá pouze limity pro HI v rybách [59].

4.4 Zdroje biogenních aminů v pivu

Velká část publikovaných prací se liší v tom, jestli výskyt BA a polyaminů v pivu je více spjat s dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů (zejména laktobacilů a pediokoků)

[57], nebo s množstvím BA a polyaminů v použitých surovinách (ze sladu a chmele) [7]. Z review autorů Kalač a Křížek (2003), kteří uvádějí přehled BA v pivech z celého světa, vyplývá, že technologie výroby nealkoholických piv žádným způsobem neovlivňuje obsah BA v porovnání s alkoholickými [3]. Také nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi různými typy piva (mezi světlými/tmavými, extraktu mladiny 10%/12%) a koncentrací aminů [60].

BA v pivu se mohou rozdělit do dvou skupin, a to na skupinu sestávající se z PUT, SPD, SPM a AGM, která představuje BA pocházející zejména ze sladu, zatímco skupina HI, TYR a CAD představuje BA vznikající činností bakterií mléčného kvašení [3] [53].

4.4.1 Použité suroviny jako zdroje biogenních aminů

Ječný slad je hlavním zdrojem PUT, SPD, SPM a AGM, na jejichž množství má vliv kvalita a odrůda sladovnického ječmene [4]. Kromě ječmene je ve sladovnictví používána i pšenice. Jistou alternativou za pšenici a pšenici špaldu představuje pšenice dvouzrnka *Triticum dicoccum*, která má výrazně nižší obsah BA [61].

Další surovinou používanou při výrobě piva je chmel, u kterého hodnoty PUT, SPD, SPM a AGM dosahují nižších hodnot oproti koncentracím ve sladu [3]. Ačkoli jiné zdroje uvádějí, že obsah TYR, PEA, PUT, SPD a SPM je v chmelu relativně vysoký, nicméně jejich množství je zanedbatelné vzhledem k velmi malému použitému množství při výrobě piva [53]. Pro srovnání pak vyšší koncentrace HI a TYR byly naměřeny v extraktu chmelu než sušeném chmelu a chmelových granulích [60].

Použitá voda by neměla obsahovat BA a polyaminy žádné [3].

4.4.2 Dekarboxylázová aktivita bakterií vyskytujících se v procesu výroby piva

Mezi významné producenty BA patří již zmínění zástupci bakterií mléčného kvašení (kmeny rodu *Pediococcus* a *Lactobacillus*) [62]. Startérové kvasinky mohou být kontaminovány těmito rody bakterií a tím se může výrazně zvýšit produkce BA v pivu [62].

Značné množství TYR a HI vytváří v lahvovém pivu především pasterací přeživší laktobacily [54] [63]. Ke stejnému závěru dospěli i Kalač a Křížek (2003), kteří uvádí, že vysoké úrovně HI a TYR byly zjištěny v pivech s vyšší aciditou, která poukazovala na činnost mléčných bakterií [3]. Mezi další prokázanými producenty BA patří *Lactobacillus*

frigidus, *L. brevissimilis* and *L. brevis* [3]. Také u *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum* byla prokázána tvorba TYR [63].

Velký potenciál v degradaci HI a TYR byl zpozorován u *Pediococcus acidilactici* a *Brevibacterium linens* [64] a *Lactobacillus sakei* [65]. Zástupci rodu *Pediococcus* sp. (zejm. *P. damnosus*) jsou také jednou z příčin vysokého obsahu TYR v pivu [66] [3]. Účinným zamezením růstu pediokoků je mytí droždí kyselinou fosforečnou [3].

Vyšší hodnoty TYR, HI, PEA, TR také vykazovaly spontánně kvašená piva a svrchně kvašená piva [3]. Mezi významné producenty CAD a PUT patří *Enterobacter* nebo *E. coli* [63] [3].

K tvorbě aminů dochází také v plechovkách a sudech. Zvýšené množství aminů lze očekávat u piva kontaminovaného mléčnými bakteriemi během výroby, při nedostatečné eliminaci bakterií při filtraci a jejich nedostatečné inaktivaci při pasteraci. Vysoký obsah aminů se může vyskytnout u některých piv, při jejichž výrobě byla použita pšenice, neboť mléčné bakterie jsou součástí fermentační mikroflóry. Zdrojem bakterií produkujících BA mohou být i kontaminované kvasinky [54].

Izquierdo-Pulido (1995) ve svém článku „Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation“ stanovoval spektrofluorometrickou metodou tvorbu HI a TYR u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* (spodní kvašení) a zjistil, že tento kmen nemá schopnost tvořit BA během kvašení piva [57].

V současnosti bylo publikováno jen velmi málo studií zabývajících se problematikou degradace BA a polyaminů u konkrétních kmenů mikroorganismů. Cílem této práce je zmonitorovat případnou produkci nebo degradaci BA vybranými kmeny kvasinek v různě obohacených růstových médiích.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- monitorovat dekarboxylační nebo degradační aktivitu pivovarsky významných kmenů kvasinek *in vitro*,
- stanovit vliv suplementace kultivačních medií na obsah BA.

K dosažení těchto cílů bylo využito analýzy vzorků po derivatizaci dansylchloridem metodou HPLC s UV detekcí.

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

Kultivace kvasinek a příprava vzorků spolu se stanovením BA na kapalinovém chromatografu probíhala na dvou od sebe oddělených pracovištích Ústav inženýrství a ochrany životního prostředí a Ústavu technologie potravin. Použitý materiál a přístroje obou ústavů je popsán v následujících kapitolách.

6.1 Zařízení

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

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

Automatické mikropipety, Biohit a Nichyrio, Finsko

Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Box laminární BIO IIA, typ Biohazard TELSTAR, ČR

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

Horkovzdušná sušárna, Memmert, Německo

Chladnička, Elektrolux, Švédsko

Laboratorní třepačka Kavalier LT2, Votice, ČR

Odstředivka EBA 20, Hettich ZENTRIFUGEN, Německo

pH metr EUTECH INSTRUMENTS pH510, Nizozemsko

Vortex Heidolph, Reax top, Německo

6.2 Chemikálie a pomocné látky

1,7-heptandiamin, Sigma-Aldrich, USA

Aceton, Sigma-Aldrich, USA

Acetonitril, Sigma-Aldrich, USA

Agar Agar, Type I, GRM666, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie

Aminokyseliny, arginin, histidin, tyrozin, fenylamin, Sigma-Aldrich, USA

Dansylchlorid Merck, Německo

Dusík v tlakové nádobě, Linde, ČR

Heptan, Sigma-Aldrich, USA

Hydrogenuhlíčitán sodný a uhličitán sodný bezvodý, Merck, Německo

Kyselina chloristá, Merck, Německo

Kyselina chlorovodíková, Merck, Německo

Malt Extract Agar Base (w/Mycological Peptone, M 137-500 g), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie

Yeast Extract Powder (RM 027), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie

6.3 Použité mikroorganismy

Pro účely této práce bylo použito 25 kmenů kvasinek získaných z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. v Praze (Research Institute of Brewing and Malting; RIBM). Jedná se kulturní kvasinky využívané pro výrobu piva a divoké kvasinky: *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 3, 6, 9, 10, 11; *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 145, 146, 147, 148; *Debaryomyces hansenii* DSM 70244; *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7; *Kluyveromyces marxianus* RIBM km; *Pichia fermentans* RIBM KI ½; *Rhodotorula* sp. RIBM A9; *Torulaspota delbrueckii* RIBM T1, T2, T3, T4; *Zygosaccharomyces bailli* RIBM BS 197/B; *Candida* sp. RIBM C6, C7.

6.4 Příprava inokula

Pro oživení zamražených vzorků daných kmenů bylo odebráno 500 µl buněčné suspenze v glycerolu [750 µl kultury, 750 µl 30% (v/v) glycerolu] a přeneseno do Malt bujónu. Inokulace byla uskutečněna v laminárním boxu za aseptických podmínek. Takto připravené vzorky kvasinek byly kultivovány 48 hodin při 30 ± 2 °C. Po oživení kultur v tekutém médiu byl proveden křížový roztěr buněčné suspenze na pevnou půdu Malt Agar (Malt Extract Agar Base; HiMedia). Inokulace i inkubace probíhala za stejných podmínek, jako při oživování kmenů. Pro zajištění dostatečné vitality byly každé 3 týdny přeočkovávány na pevnou půdu Malt Agar (Malt Extract Agar Base; HiMedia).

Pro výzkum byla použita dekarboxylační média: Média Malt Agar a Minerální médium, která byla suplementována BA: TY, HI, PUT v koncentraci 0,07 % (w/v), případně samostatným přídatkem TY v koncentraci 0,07 % (w/v), nebo o AMK (AMK; Sigma-

Aldrich): arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin o koncentraci 0,3 % (w/v). Do některých médií byl navíc přidán Yeast extract (Yeast Extract Powder; HiMedia), jako zdroj nutrientů pro zohlednění přínosu autolyzované kvasničné biomasy v procesu fermentace. Suplementace obou médií znázorňuje *Tabulka 6: Přehled použitých medií obohacených o různé suplementy*.

Tabulka 6: Přehled použitých medií obohacených o různé suplementy

Médium	Suplement (koncentrace)
MALT*	Tyramin (0,7 g/l)
MALT	AMK: arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin (3 g/l)
MALT	BA: tyramin, histamin a putrescin (0,7 g/l)
MM**	Tyramin (0,7 g/l)
MM	AMK: arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin (3 g/l)
MM	BA: tyramin, histamin a putrescin (0,7 g/l)
MM	Tyramin (0,7 g/l) a kvasničný extrakt (1 g/l)
MM	BA: tyramin, histamin a putrescin (0,7 g/l) a kvasničný extrakt (1 g/l)

* MALT - Malt agar **MM - Minerální médium

MALT bujón

Smícháním 10 g MALT Broth s 500 ml destilované vody byl připraven bujón, který byl následně plněn do zkumavek po 5 ml. Sterilizace probíhala v autoklávu při $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.

MALT agar (pH $5,4 \pm 0,2$ při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Pevná kultivační půda byla připravena smísením 25 g Malt Extract Agar Base s 500 ml destilované vody. Sterilizace média probíhala v autoklávu při $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. Médium bylo za horka rozlito do Petriho misek po 12 ml.

Ingredience	[g/l]
Sladový extrakt	30,00
Mykologický pepton	5,00
Agar	15,00

Minerální médium

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

Hodnota pH všech medií byla upravena na 6,8–7 přidáním kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol/l.

Do připravených medií byly následně inokulovány kmeny kvasinek a kultivovány při $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hod. Po ukončení kultivace bylo z každé kultivační půdy odebráno 100 μl buněčné suspenze a přeneseno v pěti opakováních do identických medií. Tato média pak byla ponechána v termostatu po dobu 72 hodin při $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Jako kontroly byla využita neinokulovaná média ($n=6$) od každé varianty půdy. Vzorky byly po kultivaci odstředovány ($3421 \times g$; $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; 20 minut).

Poté byla provedena stabilizace vzorků smísením 750 μl odstředěného supernatantu a 750 μl kyseliny chloristé o koncentraci 1,2 mol/l. Tímto způsobem byly připraveny i slepé kontroly. Stabilizované vzorky byly uchovávány při $-18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a posléze podrobeny derivatizaci.

6.5 Screening obsahu biogenních aminů v supernatantech po kultivaci vybraných kvasničných kmenů

Před derivatizací byl vzorek rozmražen. K 1000 μl vzorku v derivatizační nádobce bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin o koncentraci 500 mg/l). Následně bylo ke vzorku přidáno 1,5 ml karbonátového pufru (0,5 M NaHCO_3 a 0,5 M NaCO_3 v poměru 5:1) o pH 11,0–11,1 a 2 ml acetonového roztoku dansylchloridu (5 g/l). Takto upraveným vzorkem bylo třepáno v temnu po dobu 20 hodin. Následně k němu bylo přidáno 200 μl prolinu. Vzorky byly opět třepány, tentokrát po dobu 1 hodiny. Poté bylo přidáno 3 ml heptanu a po 3 minuty byl vzorek třepán ručně. Následně byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialky, ve které pak byl vzorek odpařován při teplotě $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu a mohl být dále zpracováván pro následnou analýzu v kapalinovém chromatografu. Bezprostředně před analýzou v chromatografickém systému však musel být vzorek přefiltrován přes

jednorázový stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm . Následná detekce BA byla prováděna na HPLC s UV detekcí při vlnové délce 254 nm. Všechny separace probíhaly na koloně Agilent Zorbax Eclipse C18 s parametry 50 x 3,0 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), chromatografický systém byl dále tvořen autosamplérem (LabAlliance SHLA84000), binární pumpou, odplyňovačem, UV/VIS-DAD detektorem a termostatem kolon (Agilent Technologies).

7 VÝSLEDKY

Byla sledována dekarboxylázová aktivita u 25 kmenů kvasinek kultivovaných v 8 variantách médií *in vitro*. Podle stanoveného množství BA a polyaminů v HPLC, byla posuzována schopnost produkovat nebo degradovat BA. Konkrétně bylo sledováno množství tyraminu (TYR), tryptaminu (TR), fenyletylaminu (PEA), putrescinu (PUT), kadaverinu (CAD), histaminu (HI), sperminu (SPM) a spermidinu, (SPD). V následujících kapitolách bude popsáno zjištěné množství jednotlivých BA polyaminů u konkrétních kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 3, 6, 9, 10, 11; *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 145, 146, 147, 148; *Debaryomyces hansenii* DSM 70244; *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7; *Kluyveromyces marxianus* RIBM km; *Pichia fermentans* RIBM KI ½; *Rhodotorula* sp. RIBM A9; *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, T2, T3, T4; *Zygosaccharomyces bailli* RIBM BS 197/B; *Candida* sp. RIBM C6, C7. V Tabulce 7: Použité kmeny kvasinek a jejich zkratky je celkový přehled kmenů kvasinek se zkratkami použitými v grafech.

Tabulka 7: Použité kmeny kvasinek a jejich zkratky

Název kmene	Použitá zkratka
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIBM 2	SC RIBM 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIBM 3	SC RIBM 3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIBM 6	SC RIBM 6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIBM 9	SC RIBM 9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIBM 10	SC RIBM 10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIBM 11	SC RIBM 11
<i>Saccharomyces pastorianus</i> RIBM 139	SP RIBM 139
<i>Saccharomyces pastorianus</i> RIBM 140	SP RIBM 140
<i>Saccharomyces pastorianus</i> RIBM 145	SP RIBM 145
<i>Saccharomyces pastorianus</i> RIBM 146	SP RIBM 146
<i>Saccharomyces pastorianus</i> RIBM 147	SP RIBM 147
<i>Saccharomyces pastorianus</i> RIBM 148	SP RIBM 148
<i>Debaryomyces hansenii</i> DSM 70244	DSM 70244
<i>Hanseniaspora uvarum</i> RIBM A4	HU RIBM A4
<i>Hanseniaspora uvarum</i> RIBM A7	HU RIBM A7
<i>Kluyveromyces marxianus</i> RIBM km	KM RIBM KM
<i>Pichia fermentans</i> RIBM KI 1/2	PF RIBM KI 1/2
<i>Rhodotorula</i> sp. RIBM A9	R RIBM A9
<i>Torulasporea delbrueckii</i> RIBM T1	TD RIBM T1
<i>Torulasporea delbrueckii</i> RIBM T2	TD RIBM T2

<i>Torulaspora delbrueckii</i> RIBM T3	TD RIBM T3
<i>Torulaspora delbrueckii</i> RIBM T4	TD RIBM T4
<i>Zygosaccharomyces bailli</i> RIBM BS 197/B	ZB RIBM BS 197/B
<i>Candida</i> sp. RIBM C6	C RIBM C6
<i>Candida</i> sp. RIBM C7	C RIBM C7

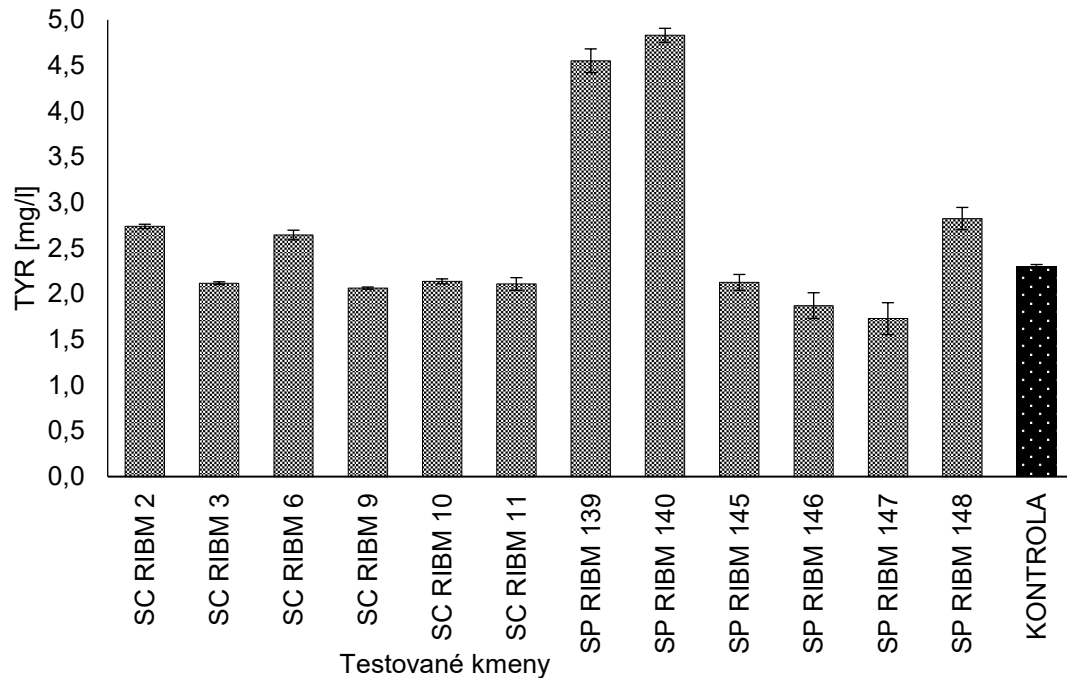
Naměřené hodnoty konkrétních BA a jsou vyobrazeny a rozděleny do dvou grafů, kdy první graf popisuje kulturní kmeny kvasinek a druhý kmeny divokých kvasinek. Grafy byly vkládány pouze tehdy, když byla detekována produkce/degradace BA v rámci většiny testovaných kmenů (s výjimkou minerálního média suplementovaného pouze aminokyselinami). U některých vzorků nebyly BA detekovány, ať už z důvodu, že daný kmen BA neprodukoval anebo z důvodu meze detekce. V médiích s přidavkem TYR a BA o koncentraci 700 mg/l [0,07 % (v/w)] se celkové množství TYR v kontrolách pohybovalo okolo 650 ± 20 mg/l oproti očekávaných 700 mg/l (tato hodnota je průměrem pro všechna média, minerální i Malt, která jsou jinak nutričně bohatá). Působením vysokých teplot během sterilace medií v autoklávu dochází k tepelné degradaci BA, toto tvrzení podpírá výzkum Krausové a kol. (2004, 2007) kteří potvrdili, že během tepelných úprav dochází ke snižování BA [67], [68]. K částečné degradaci BA může docházet i díky možnosti reakce BA s přítomnými redukcujícími sacharidy za vzniku produktů Maillardovy reakce. Důkazem byla i o to intenzivnější barevná změna půdy po sterilaci medií v autoklávu, která ukazuje na možný obsah vzniklých melanoidinů [69] [70] a také to, že obsahy BA kontrolních vzorků většinou byly nižší v Malt bujónu (více cukru a dalších látek) v porovnání s minerálním médiem. Pro určení dekarboxylázové aktivity není tato ztráta podstatná.

7.1 Malt bujón s aminokyselinami

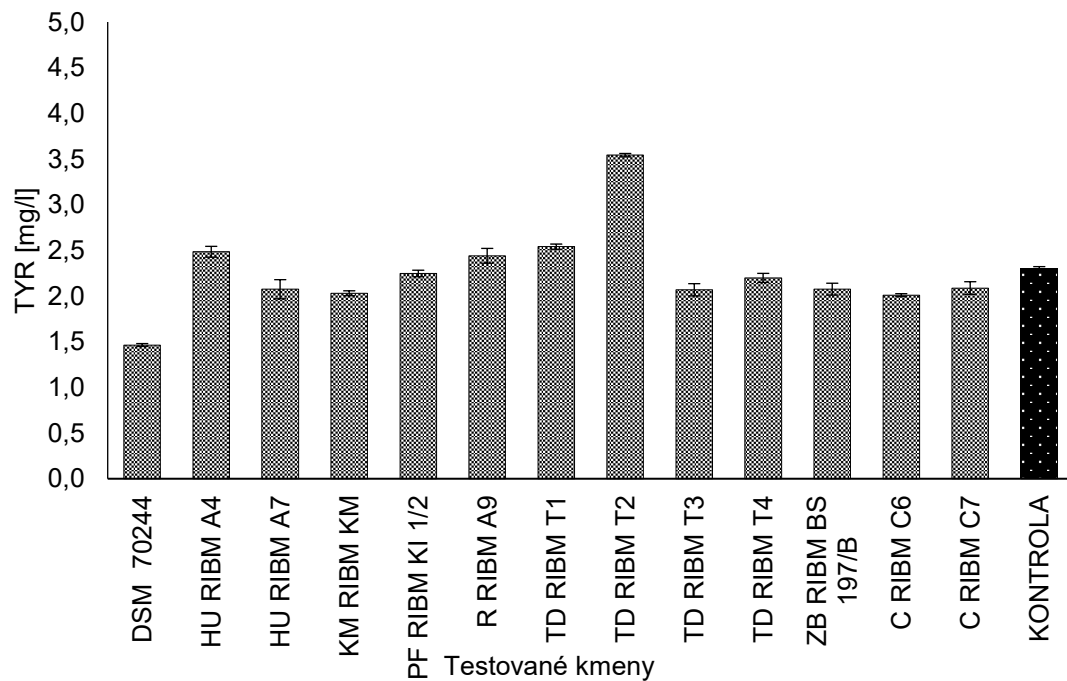
Malt bujón byl suplementován AMK (arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin) o koncentraci 0,3 % (w/v).

Významná produkce TYR byla prokázána u kmenů *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140 a *Torulaspora delbrueckii* RIBM T2 (Obrázek 10, 11). Vyšší hodnoty TYR oproti kontrole měly i vzorky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 148, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, *Rhodotorula* sp. RIBM A9

a *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2. Zbylé kvasničné kmeny měly obsah TYR nižší. Celkově se obsah TYR ve vzorcích pohyboval od 1,5-4,8 mg/l.



Obrázek 10: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

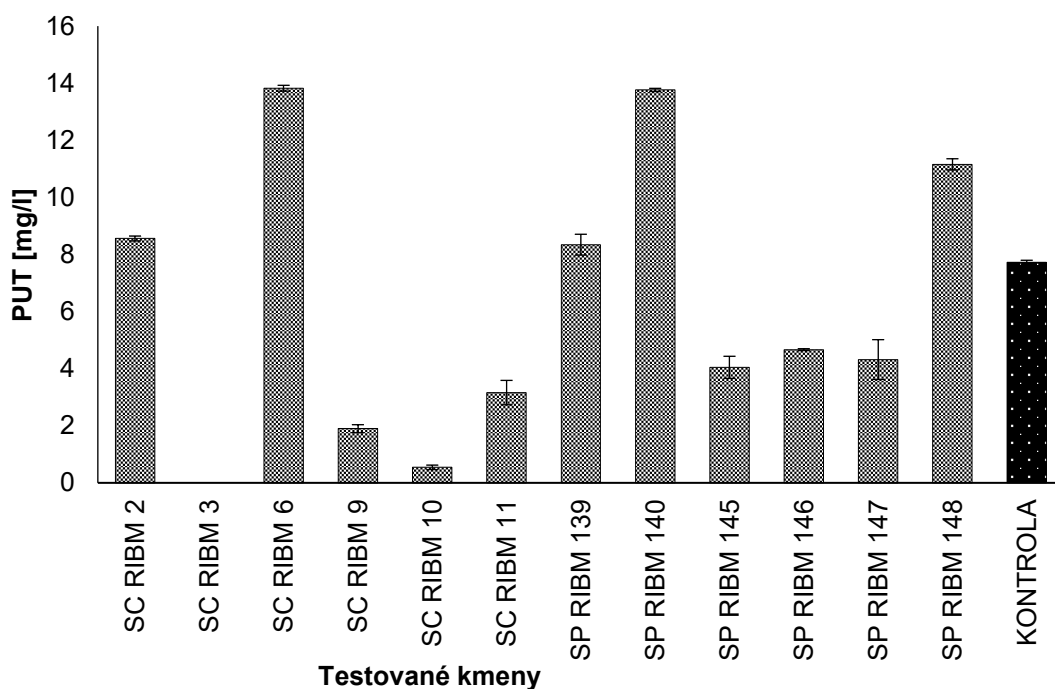


Obrázek 11: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

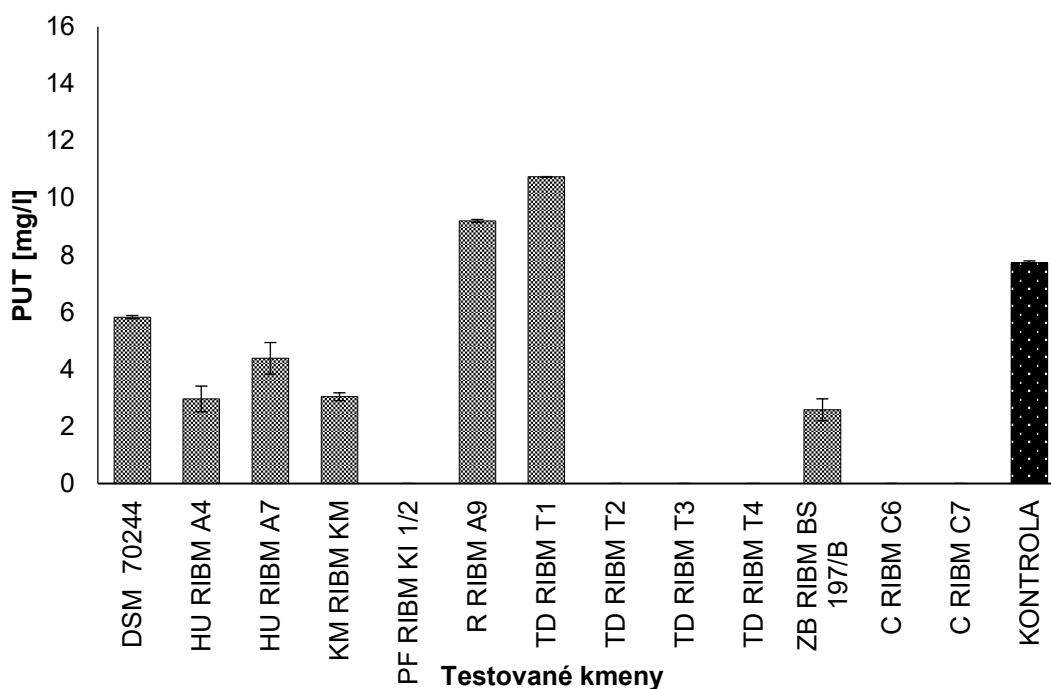
TR byl produkován pouze některými kmeny kulturních pivovarských kvasinek a to v rozmezí 2,2-4,0 mg/l (nezobrazená data).

Ještě nižší detekce byla u PEA, kdy koncentraci $3,6 \pm 0,1$ mg/l a $0,7 \pm 0,1$ mg/l obsahovalo médium po kultivaci kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2 a *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146 (nezobrazená data).

Nejvýznamnější produkce ($6,1 \pm 0,1$ mg/l) PUT byla detekována u *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 6 s celkovým obsahem PUT $13,8 \pm 0,1$ mg/l. Sestupně pak následovaly kmeny *Saccharomyces pastorianus* RIBM 140, 148, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 1 a *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139. Ostatní kmeny kvasinek obsahovaly PUT o nižší koncentraci, než byla hodnota kontroly (Obrázek 12, 13).



Obrázek 12: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



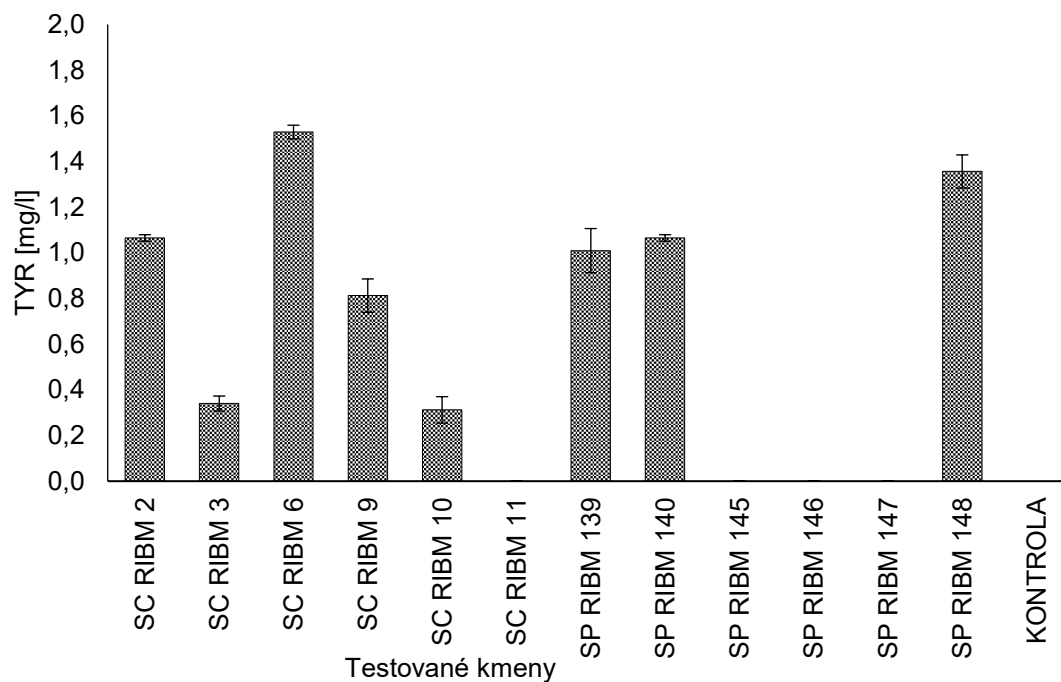
Obrázek 13: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Hodnoty CAD se pohybovaly v rozmezí 0,4-1,5 mg/l. Obsah HI byl detekován pouze u asi poloviny vzorků v rozmezí od 1,0-7,6 mg/l. Hodnoty SPM byly detekovány v rozmezí 1,2-20,0 mg/l a SPD 0,4-11,2 mg/l (nezobrazená data).

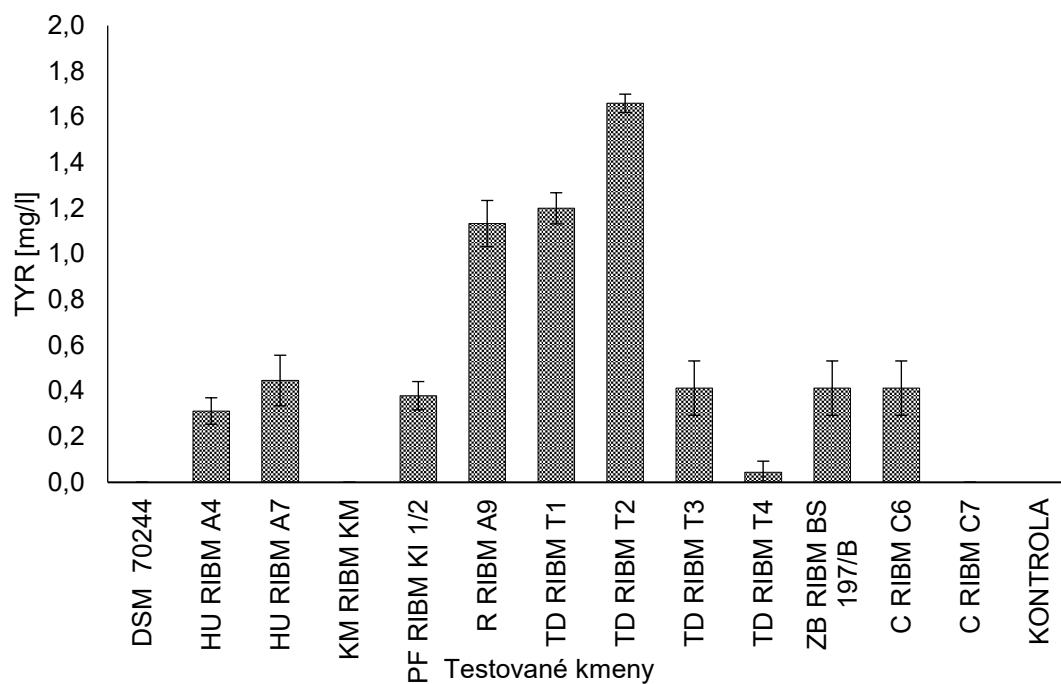
7.2 Minerální médium s aminokyselinami

V minerálním médiu obohaceném o 0,3 % (w/v) AMK (arginin, histidin, tyrozin a fenylalanin), byla detekována nejnižší produkce BA.

V porovnání s produkcí v Malt bujónu s AMK, kde produkce byla TYR dosahovala až 4,8 mg/l, zde se hodnoty produkce pohybovaly do 1,7 mg/l (Obrázek 14, 15).



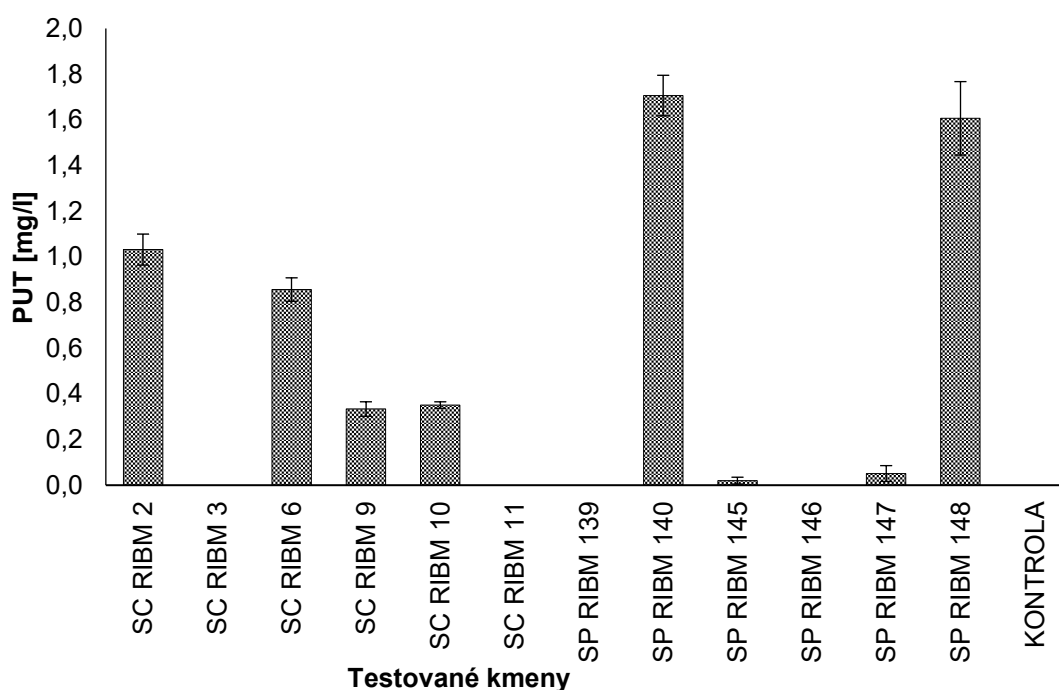
Obrázek 14: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



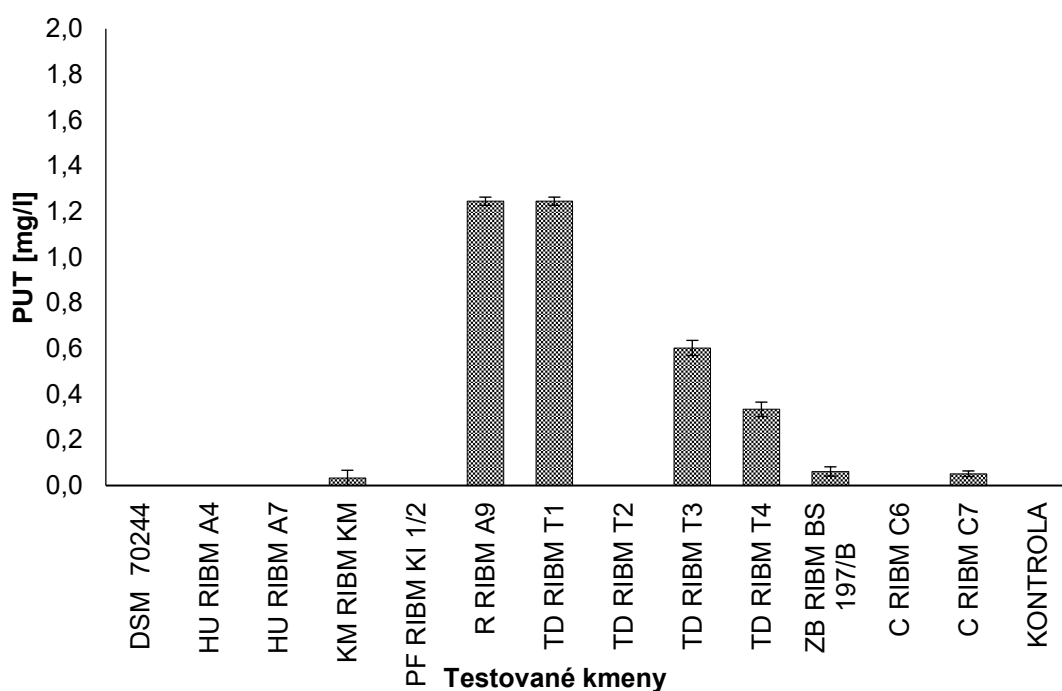
Obrázek 15: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Hodnoty obsahu TR byly detekovány pouze v médiích po kultivaci kulturních kmenů kvasinek. Jejich množství se pohybovalo do 1,5 mg/l. PEA nebyl u žádného kmene detekován (nezobrazená data).

Vyššího obsahu PUT (Obrázek 16, 17) bylo dosaženo u pūd s kultivovanými kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T1, T3. Ostatní pūd s kmeny kvasinek měly hodnoty nižší. Obsah PUT se nacházel do 1,7 mg/l.



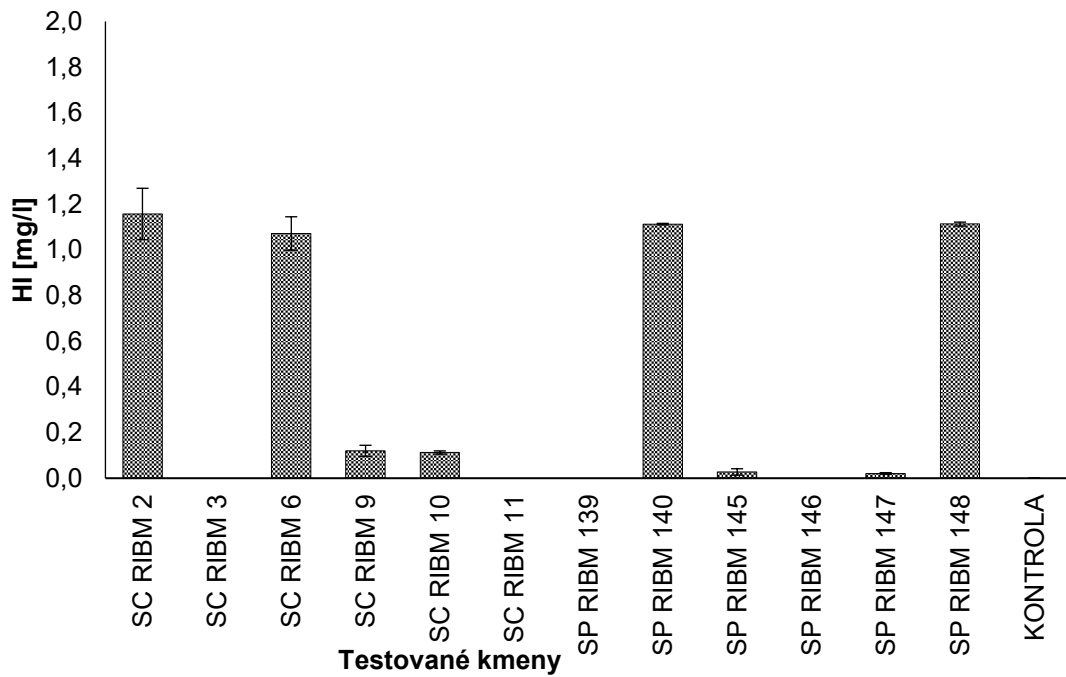
Obrázek 16: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



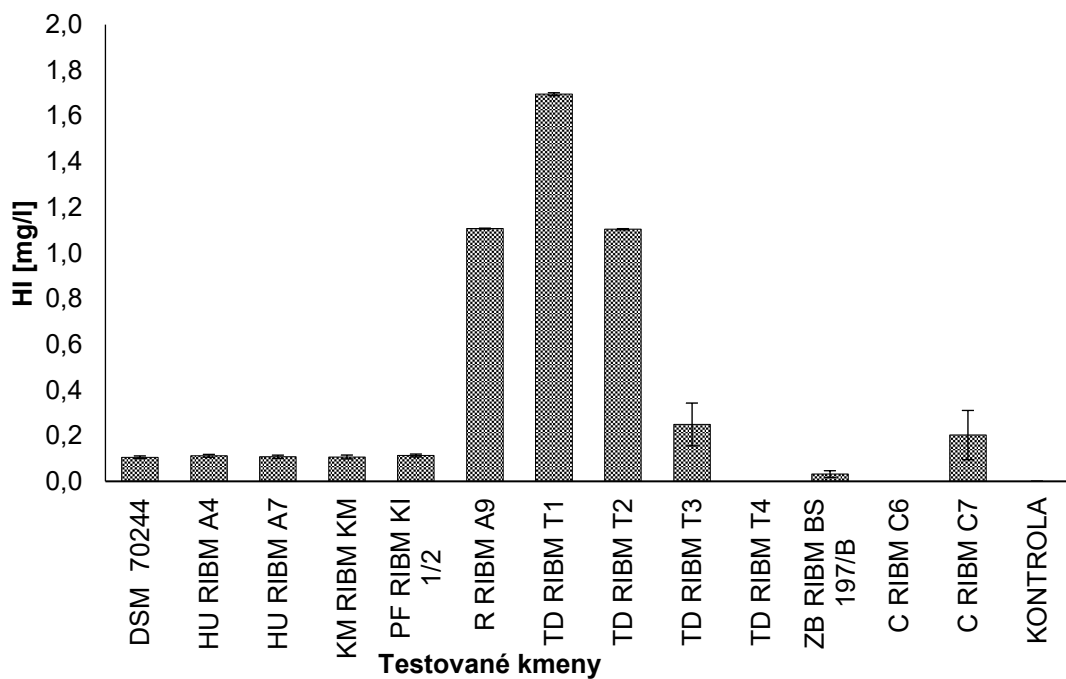
Obrázek 17: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Obsah CAD byl detekován pouze u *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2 za velmi nízké koncentraci $1,1 \pm 0,1\text{ mg/l}$ (nezobrazená data).

Hodnoty HI se pohybovaly do 1,7 mg/l. Nejvyšší produkce byla zaznamenána u kmenů kvasinek *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, a dále pak srovnatelně produkovaly kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 140, 148, *Rhodotrula* sp. RIBM A9, *Torulasporea delbrueckii* RIBM T2 (Obrázek 18, 19).



Obrázek 18: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



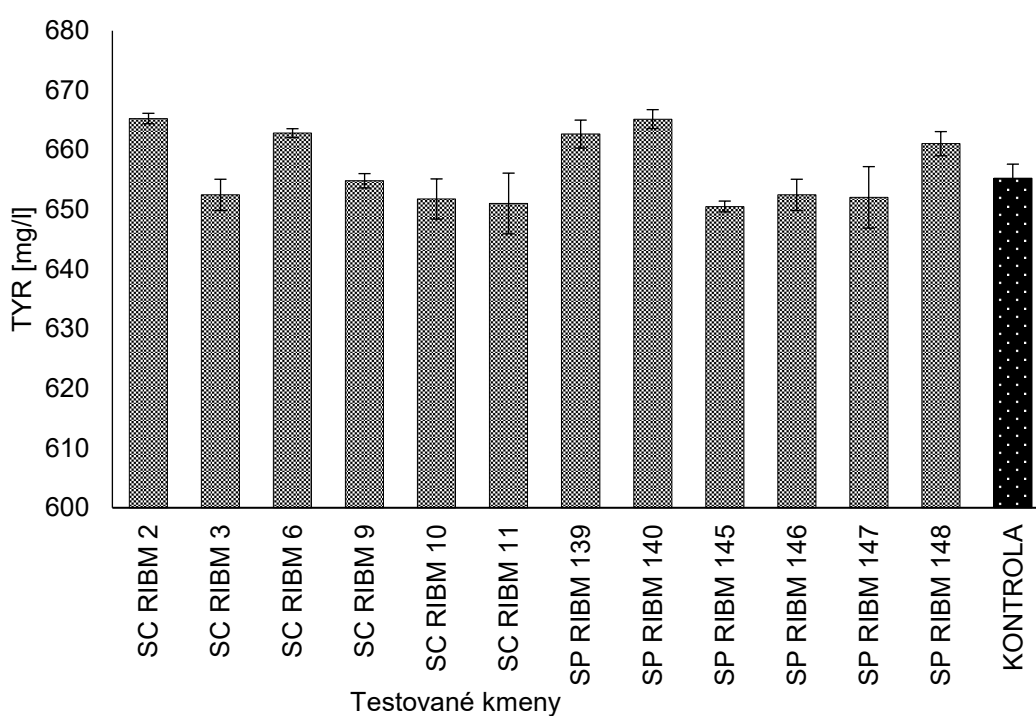
Obrázek 19: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Obsahy SPM v médiích se pohybovaly do 1,2 a SPD do 1,3 mg/l a produkovaly je jen zástupci divokých kmenů kvasinek (nezobrazená data).

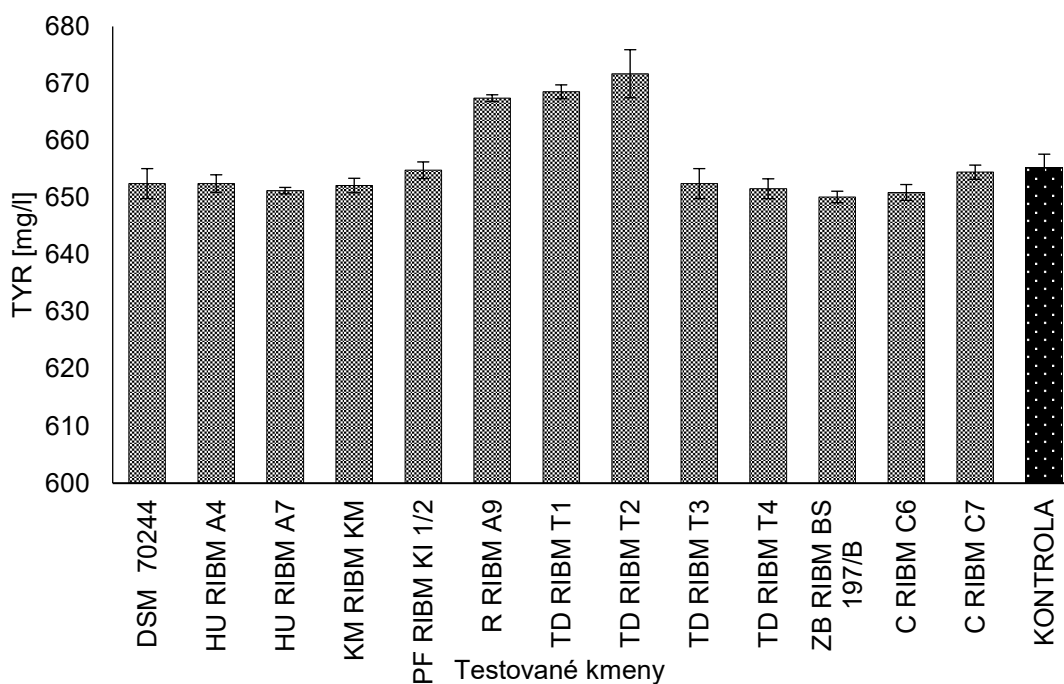
7.3 Malt bujón s tyraminem

Ve variantě Malt bujón s 0,07 % TYR (v/w) byla zjištěna detekce BA a polyaminů u více supernatantů po kultivaci kmenů, než tomu bylo u předcházejících médií.

U kulturních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 3, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148 spolu s divokými kmeny *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, T2 byla prokázána produkce TYR o 7,4-16,5 mg/l (Obrázek 20, 21). Ostatní kmeny TYR degradovaly, kdy maximální úbytek o 4,7 mg/l byl prokázán u *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145. Jako další degradující kmeny byly určeny *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A7 a *Candida* sp. RIBM C6. Média po kultivaci ostatních kmenů měla obsah TYR nižší oproti kontrole, ale statisticky nebyla prokázána jejich degradace.



Obrázek 20: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

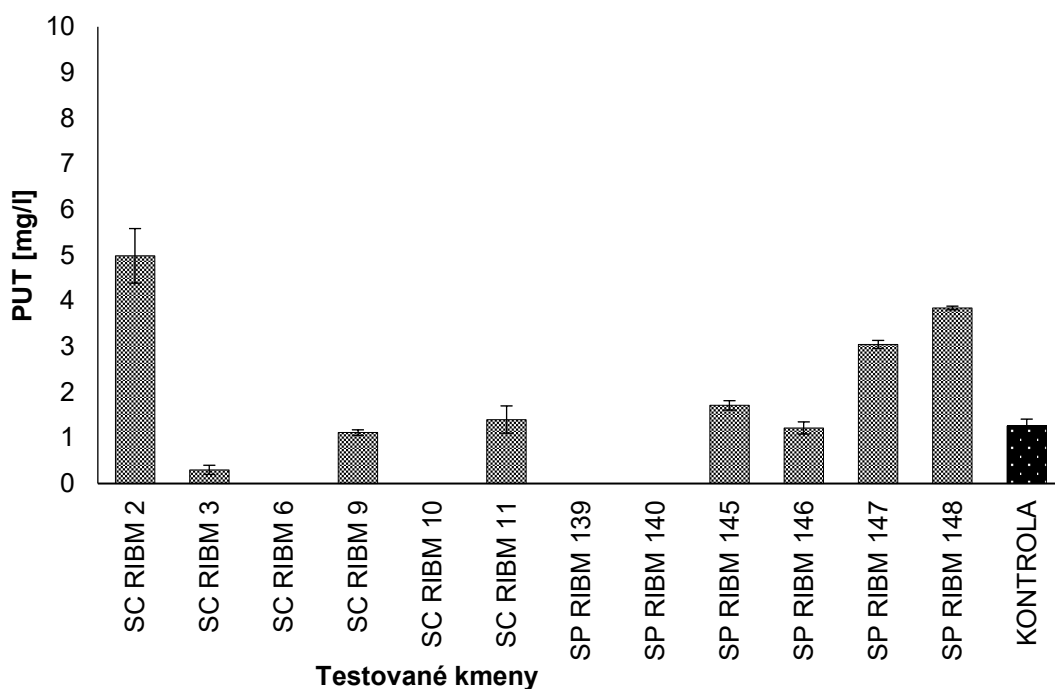


Obrázek 21: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

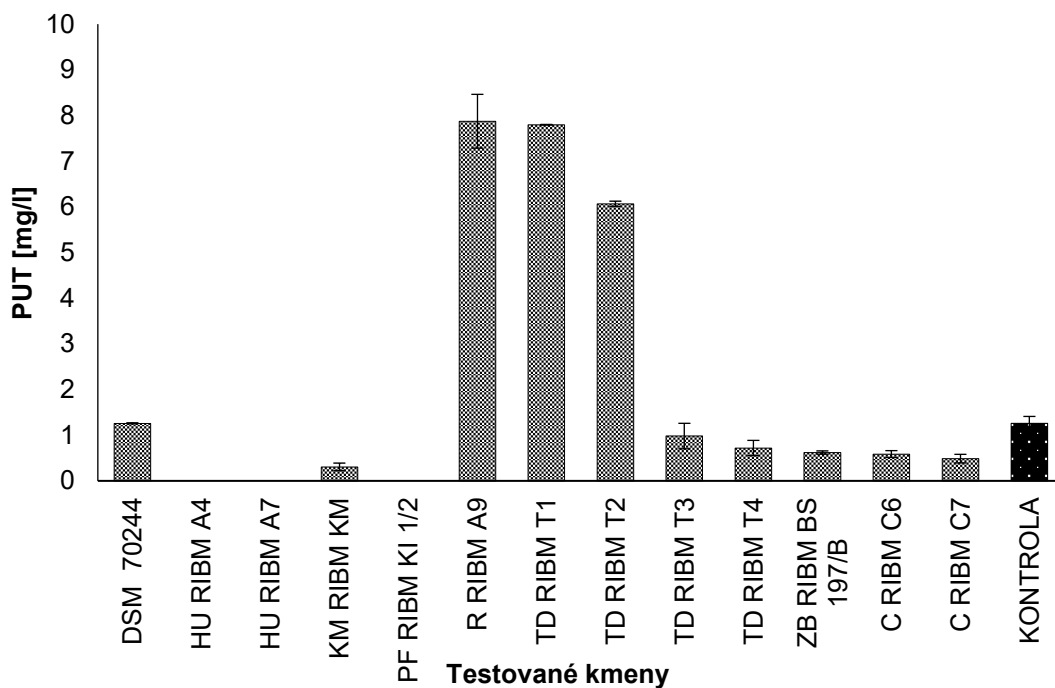
TR byl detekován v množství 1,1-1,4 mg/l (nezobrazená data).

Hodnoty PEA byly detekovány v rozmezí 1,1-2,4 mg/l a to v pouze u pěti kmenů kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7).

Hodnoty PUT byly zaznamenány i u kontrolního vzorku. Celkové obsahy u jednotlivých kmenů znázorňují Obrázky 22 a 23. Nejvyšší produkce dosáhly opět kmeny *Rhodotorula* sp. RIBM A9 a *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2. Prokazatelná produkce nastala i kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 147, 148. Produkce se pohybovala v rozmezí 0,5-7,9 mg/l.



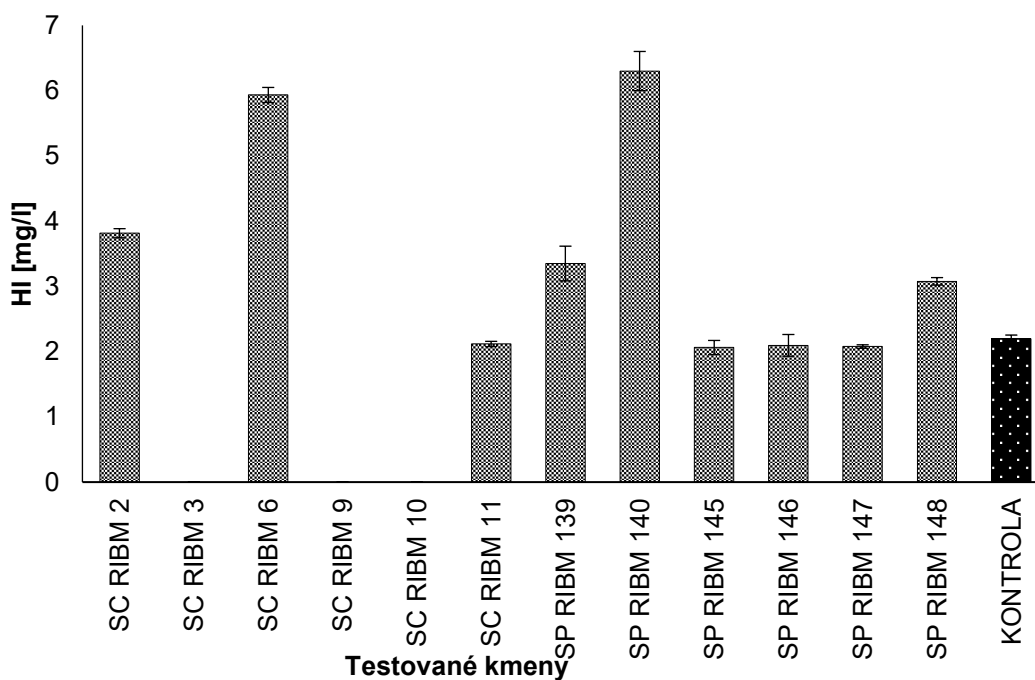
Obrázek 22: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C



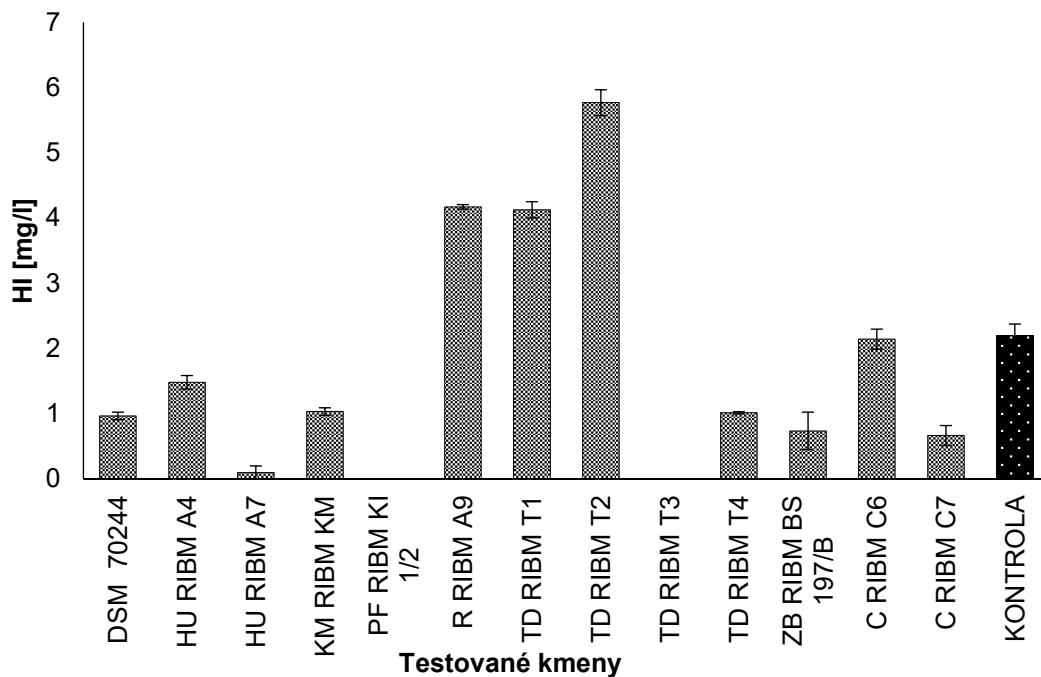
Obrázek 23: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

Obsah CAD se pohyboval do 2 mg/l a to pouze u 3 kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, *Kluyveromyces marxianus* RIBM km (nezobrazená data).

Obsah HI je znázorněn níže (Obrázek 24, 25). U kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, kmeny *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2 byla prokázána produkce HI, tyto kmeny produkovaly i TYR. Obdobný trend u ostatních kmenů, které předtím degradovaly TYR degradovaly HI i zde, nebo se detekované obsahy v médiích s kultivovanými kmeny velmi blížily hodnotám kontrole. Produkce HI byla maximálně 3,7 mg/l (Obrázek 24, 25).



Obrázek 24: Obsah HI v Malt Broth s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

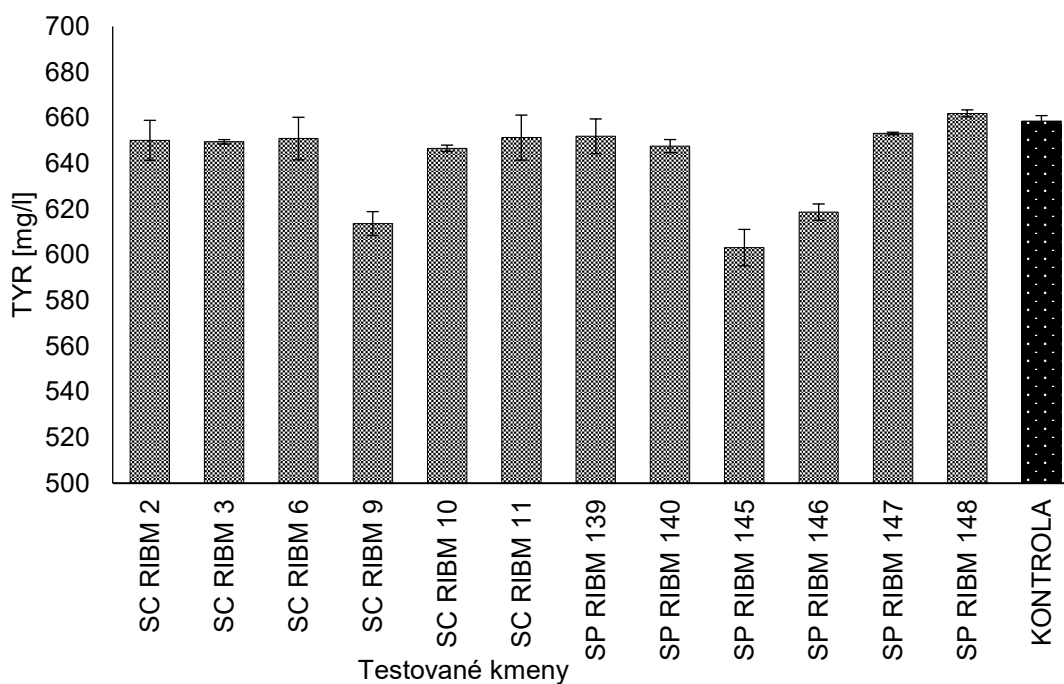


Obrázek 25: Obsah HI v Malt Broth s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

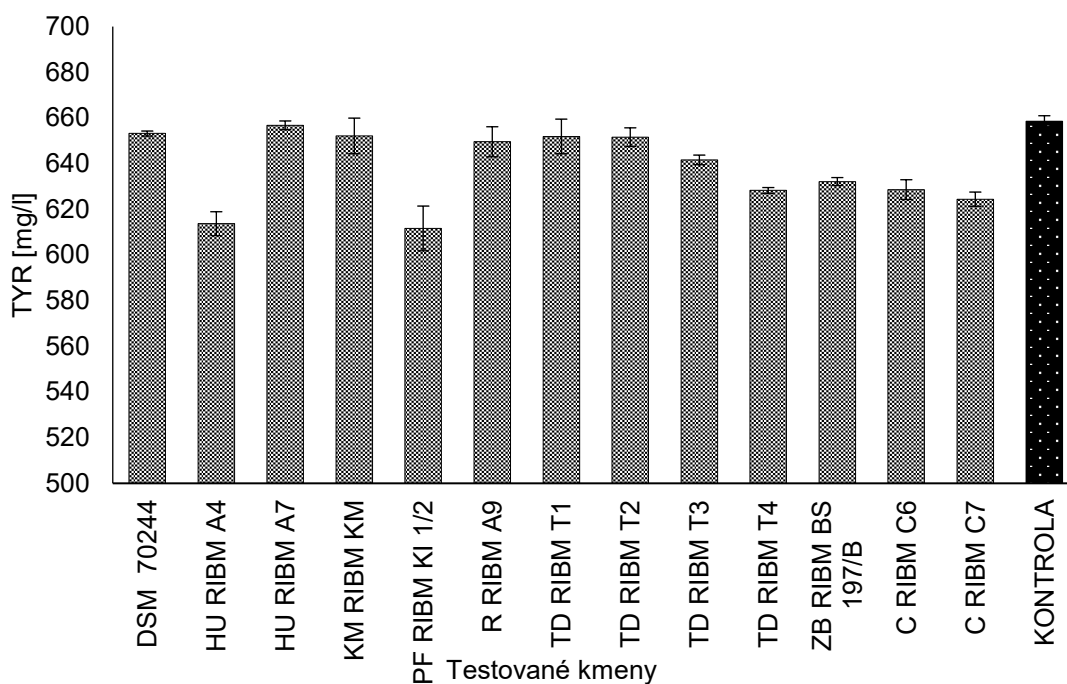
Detekované hodnoty SPM se pohybovaly v rozmezí 0,4-3,3 mg/l a SPD 0,7-2,1 mg/l (nezobrazená data).

7.4 Minerální médium s tyraminem

U minerálního média obohaceného o TYR se hodnoty obsahu TYR u supernatantů pohybovaly v rozmezí 603,1-662,0 mg/l. Nejvýraznější degradace TYR byla sledována u kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145 o více jak 50,0 mg/l. Vyšších hodnot HI dosahovalo médium s kultivovaným kmenem *Saccharomyces pastorianus* RIBM 148. Ostatní kmeny TYR degradovaly v rozmezí 1,8-47,0 mg/l (Obrázek 26, 27).



Obrázek 26: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



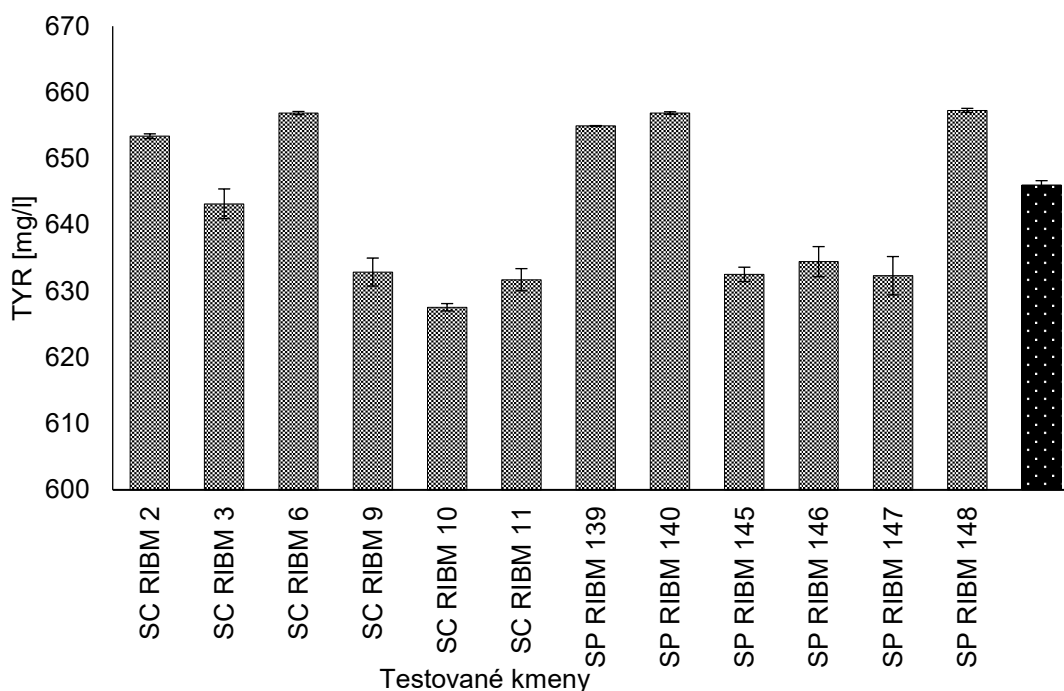
Obrázek 27: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

TR byl detekován pouze u kmene *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4 v koncentraci $2,8 \pm 0,1$ mg/l. Stejně tomu tak bylo i u PEA s detekcí $2,0 \pm 0,1$ mg/l a u PUT produkovaly

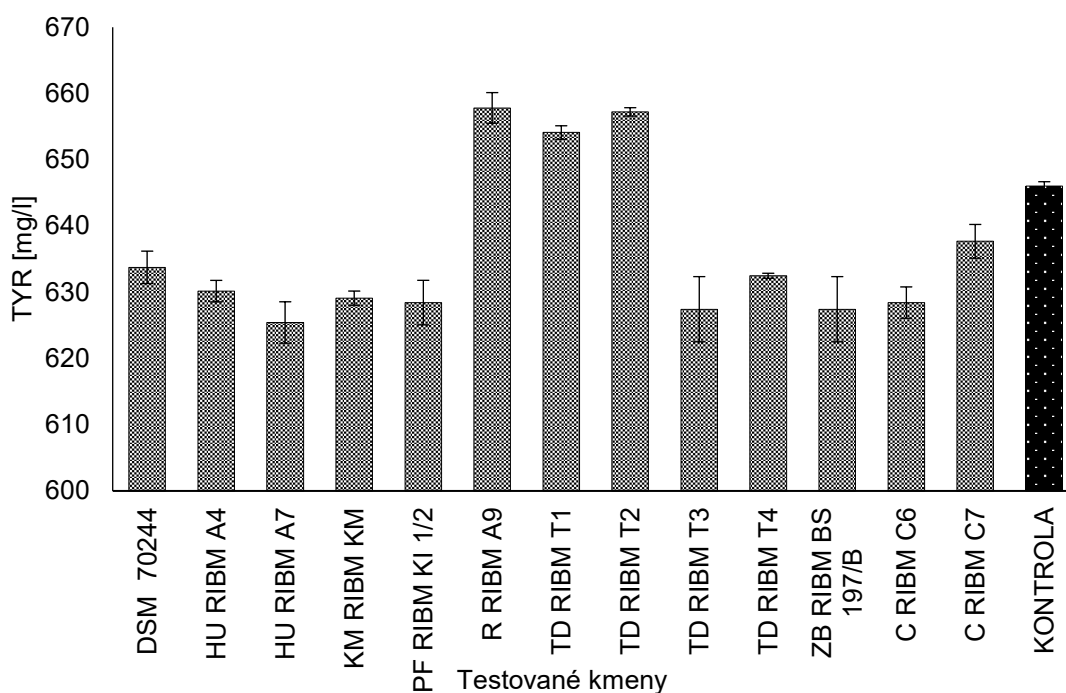
pouze kmeny *Rhodotrula* sp. RIBM A9 ($0,45 \pm 0,1$ mg/l) a *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1 ($1,2 \pm 0,1$ mg/l). CAD nebyl detekován u žádného z kmenů, HI pouze u kmenů *Saccharomyces pastorianus* RIBM 148 ($2,4 \pm 0,1$ mg/l) a *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4 ($3,0 \pm 0,1$ mg/l). Obsahy SPM a SPD byly velmi podobné. SPM byl detekován v rozmezí 0,4-1,6 mg/l a SPD 0,3-1,7 mg/l (nezobrazená data).

7.5 Malt bujón s biogenními aminy

Koncentrace detekovaného TYR v Malt bujónu, který byl obohacen o kombinaci BA, se pohybovala v rozmezí 625,4-657,9 mg/l (Obrázek 28, 29). Vyšší hodnoty TYR byly opět zaznamenány u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2, kdy produkce těchto kmenů se pohybovala v rozmezí 7,4-11,8 mg/l. Ostatní kmeny měly obsah TYR nižší, nejvyšší produkce bylo dosaženo u kmene *Hanseniaspora uvarum* RIBM A7, který degradoval TYR o více než 20 mg/l.



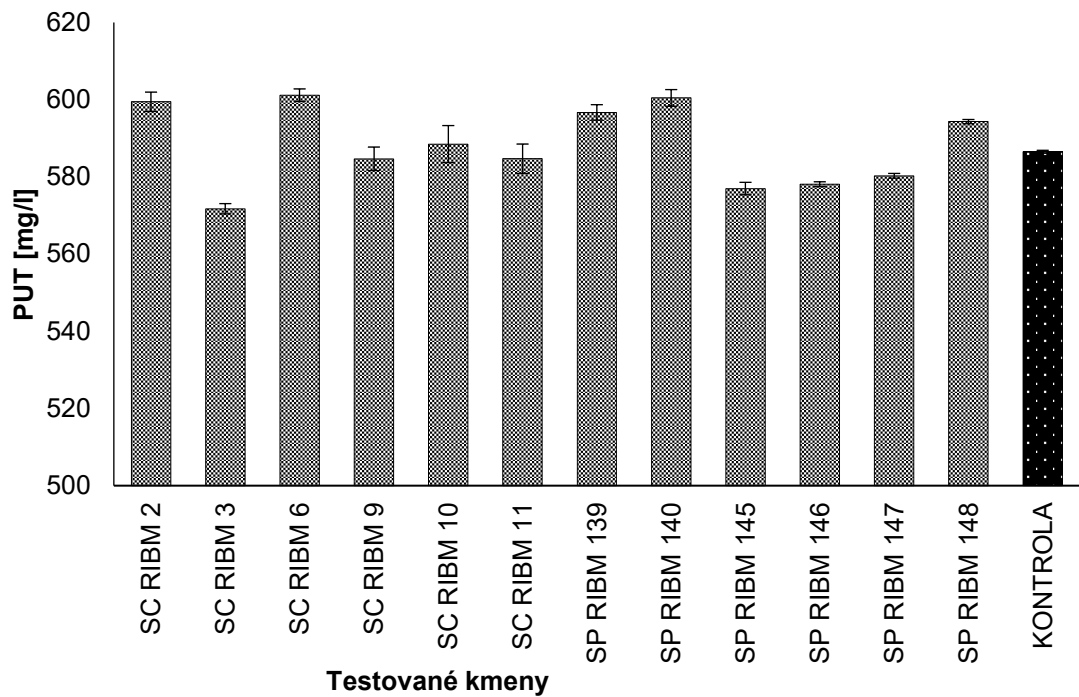
Obrázek 28: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



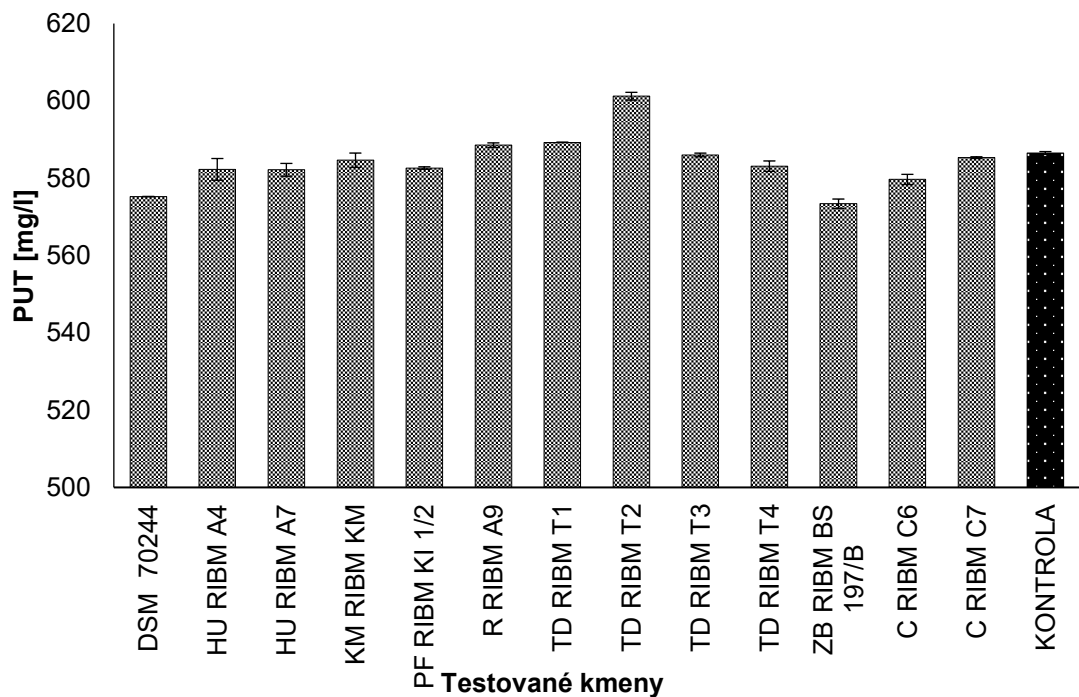
Obrázek 29: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

TR byl detekován pouze u kulturních kmenů kvasinek a jeho množství se pohybovalo v rozmezí 1,5-2,6 mg/l (nezobrazená data). Hodnoty PEA byly v koncentraci od 0,7-1,5 mg/l a to pouze u 4 kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, 148 (nezobrazená data).

Obdobný trend jako u TYR, byl shledán u obsahu PUT. Vyšší hodnoty PUT byly detekovány u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T2 a s minimálním rozdílem i u *Rhodotorula* sp. RIBM A9 a *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1 (Obrázek 30, 31).



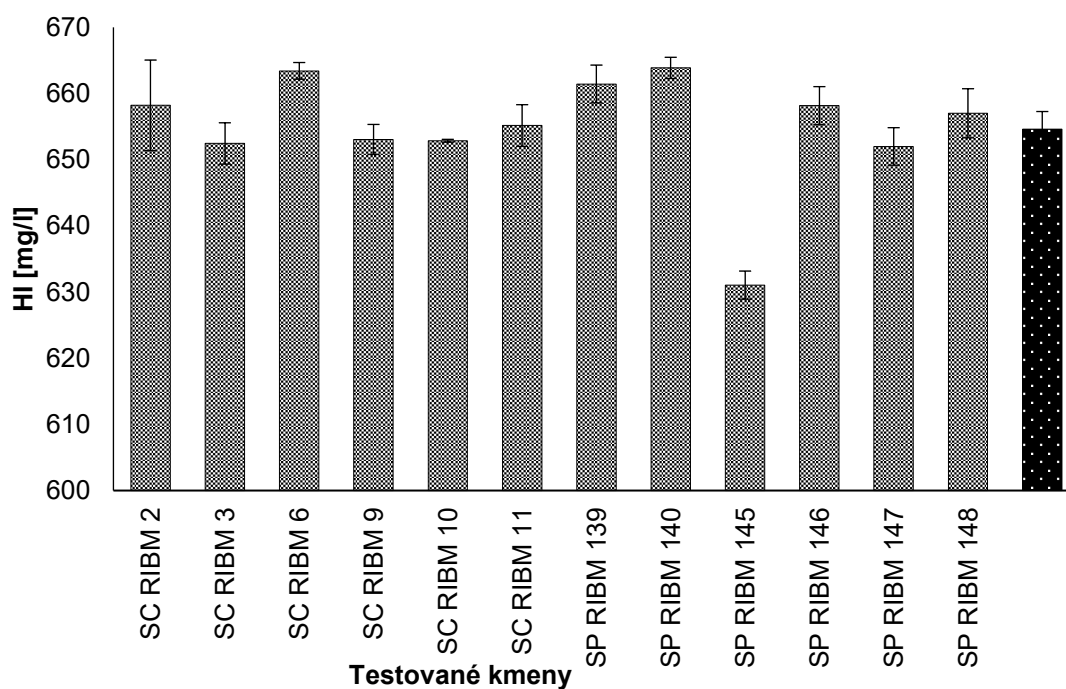
Obrázek 30: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C



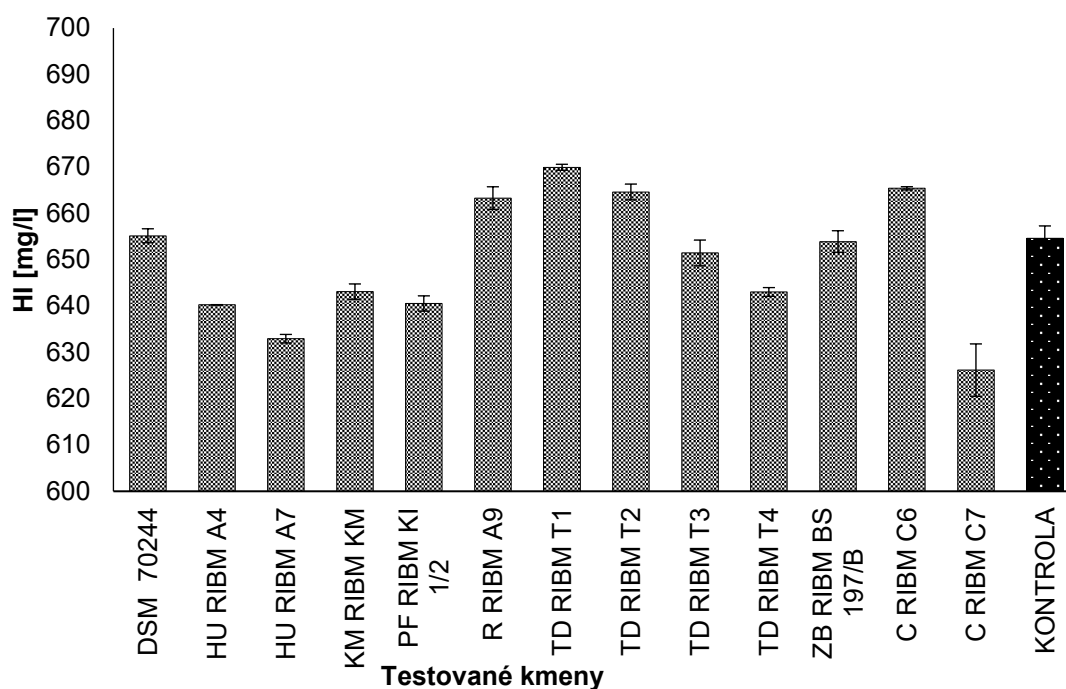
Obrázek 31: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

CAD nebyl detekován u žádného ze sledovaných kmenů kvasinek.

Hodnoty HI byly vyšší u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, 11 *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 146, 148, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Rhodotrula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2 a u *Candida* sp. RIBM C6. Kulturní kmeny kvasinek produkovaly HI do 9 mg/l a divoké kmeny do 15 mg/l. Nález produkce HI kmene *Candida* sp. RIBM C6 se liší s dosavadní degradací BA tohoto kmene v popsáných médií (Malt bujón/minerální médium s AMK/TYR) (Obrázek 32, 33).



Obrázek 32: Obsah HI v Malt Broth s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

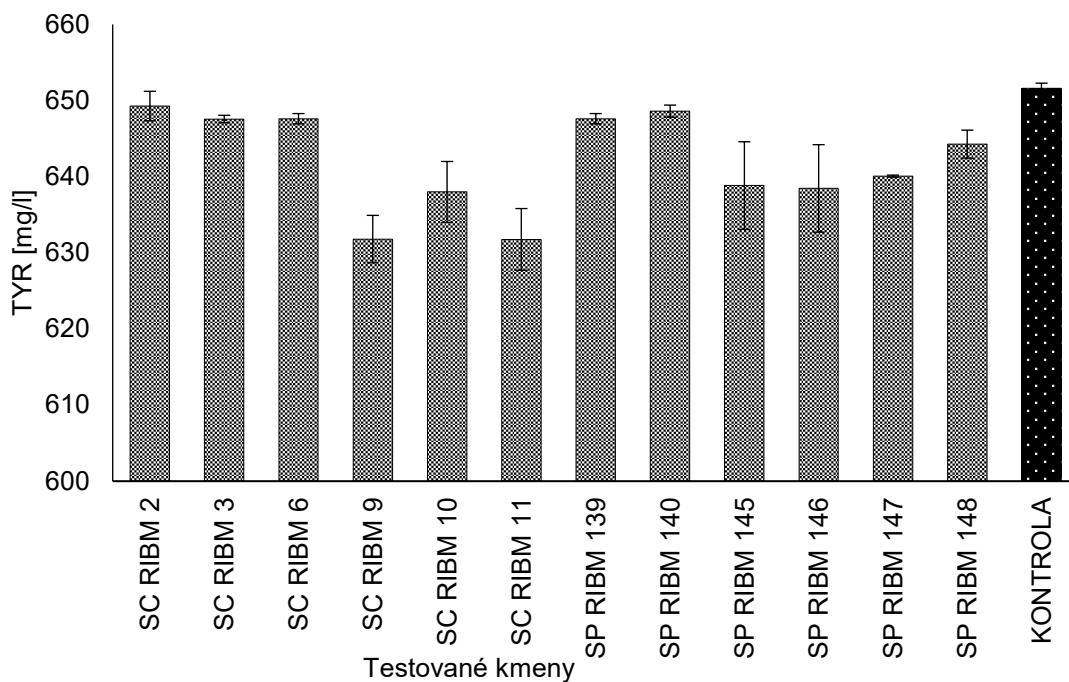


Obrázek 33: Obsah HI v Malt Broth s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

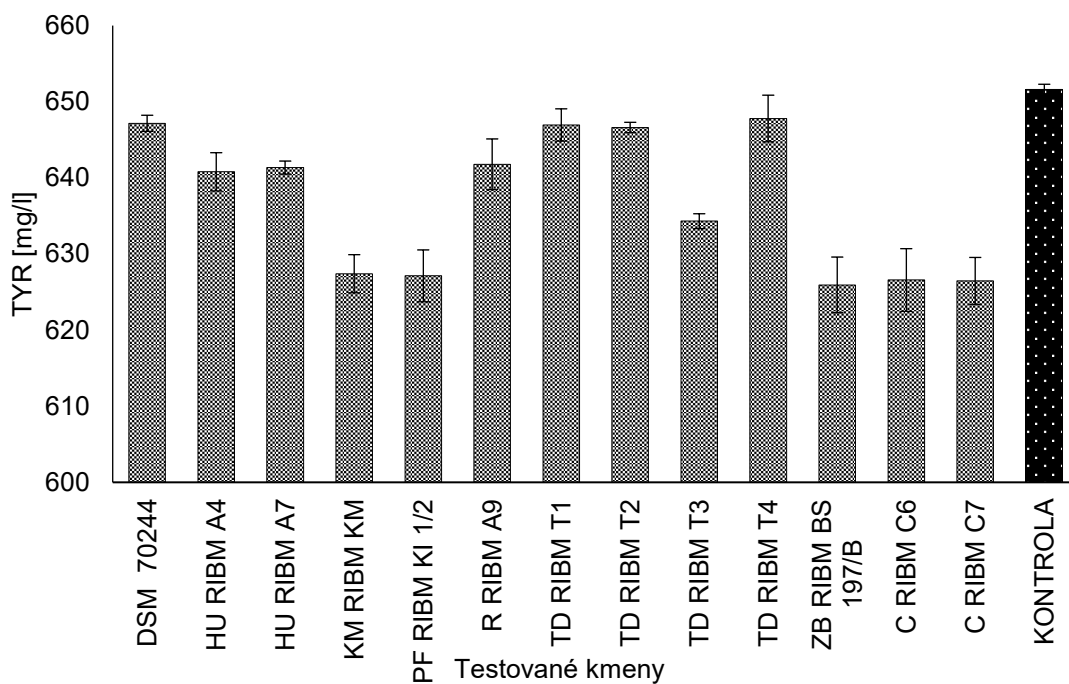
Hodnoty SPM se pohybovaly v rozmezí 0,5-4,6 mg/l a u SPD do 2,4 mg/l (nezobrazená data).

7.6 Minerální médium s biogenními aminy

Ve variantě minerální médium s kombinací BA bylo detekováno množství TYR v rozmezí 626,0-652,0 mg/l (Obrázek 34, 35). Pouze v tomto médiu byly hodnoty obsahu BA u všech supernatantů s kultivovanými kmeny nižší oproti kontrole. Kmen *Zygosaccharomyces bailli* RIBM BS 197/B degradoval TYR nejvíce (o více jak 20 mg/l). Degradace TYR nastala i u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 148, *Rhodotrula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, které v jiných médiích TYR produkovaly. Mezi další degradující kmeny, které degradovaly i v jiných médiích, patří *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 9, 10, 11, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, 147, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7, *Kluveromyces marxianus* RIBM km, *Pichia fermentans* RIBM KI 1/2, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T3, *Zygosaccharomyces bailli* RIBM BS 197/B, *Candida* sp. RIBM C6, C7.



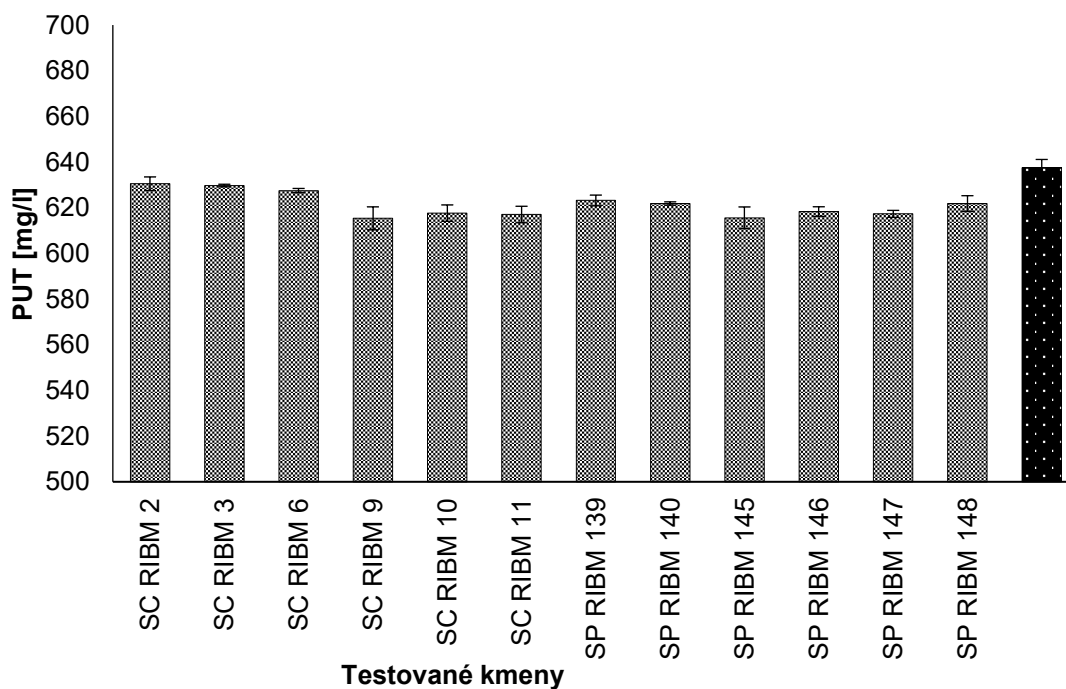
Obrázek 34: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



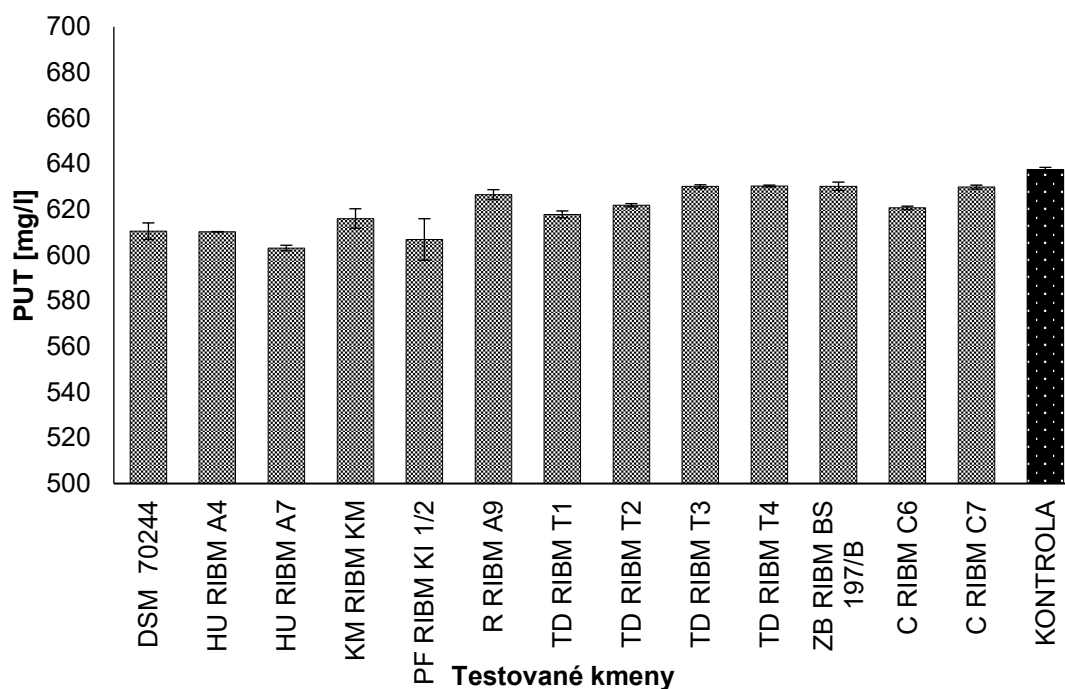
Obrázek 35: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

TR byl detekován pouze u kulturních kmenů kvasinek do koncentrace 2,6 mg/l. PEA produkovaly pouze dva kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2 ($1,3 \pm 0,2$ mg/l) a *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146 ($1,8 \pm 0,1$ mg/l) (nezobrazená data).

V rozmezí 603,1-630,5 mg/l byla detekována koncentrace PUT (Obrázek 36, 38). Opět jako tomu bylo u TYR, veškeré kmeny PUT degradovaly o 7,0-34,4 mg/l. Nejvyšší degradace dosáhl kmen *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4.



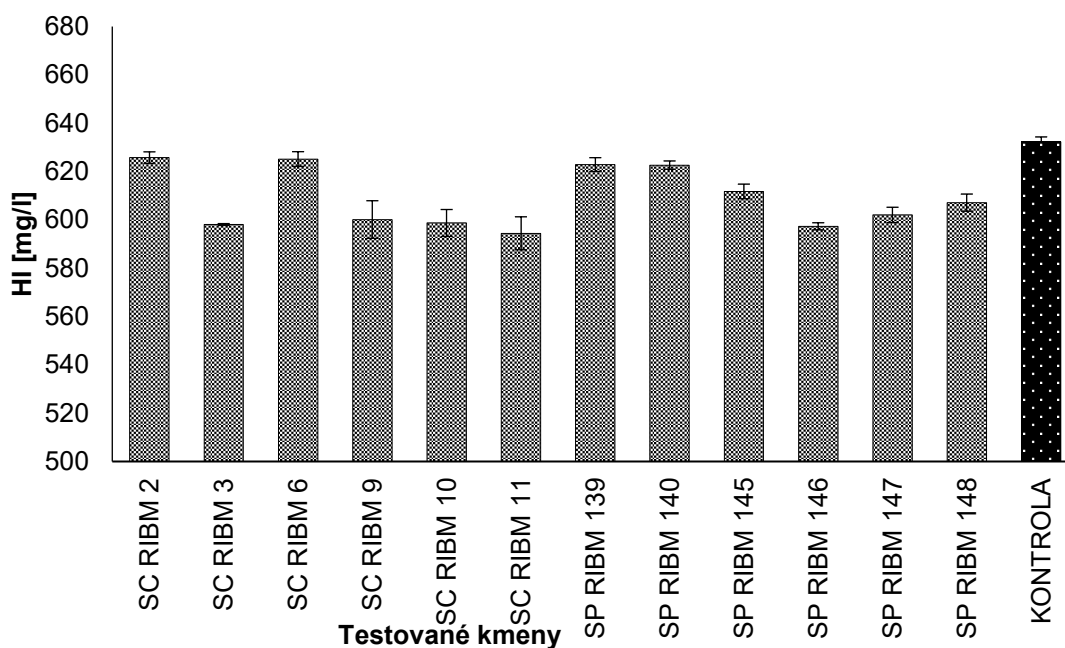
Obrázek 36: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



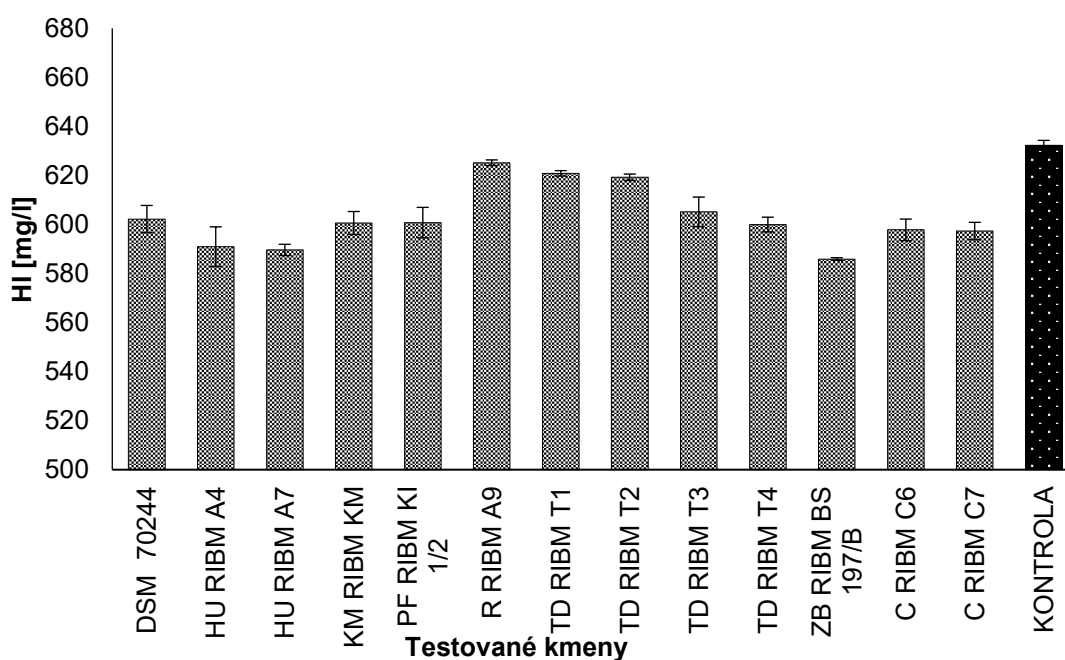
Obrázek 37: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Obsahy CAD byly detekovány v rozmezí 1,8-2,8 mg/l pouze u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, 9 a *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146 (nezobrazená data).

Obsah HI v supernatantu všech kultivovaných kmenů kvasinek byl nižší oproti kontrole. Nejvyšší degradace nastala u *Zygosaccharomyces bailli* RIBM BS 197/B o koncentraci HI $686,0 \pm 0,5$ mg/l. Celkově kmeny degradovaly HI od 6 mg/l (Obrázek 38, 39).



Obrázek 38: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

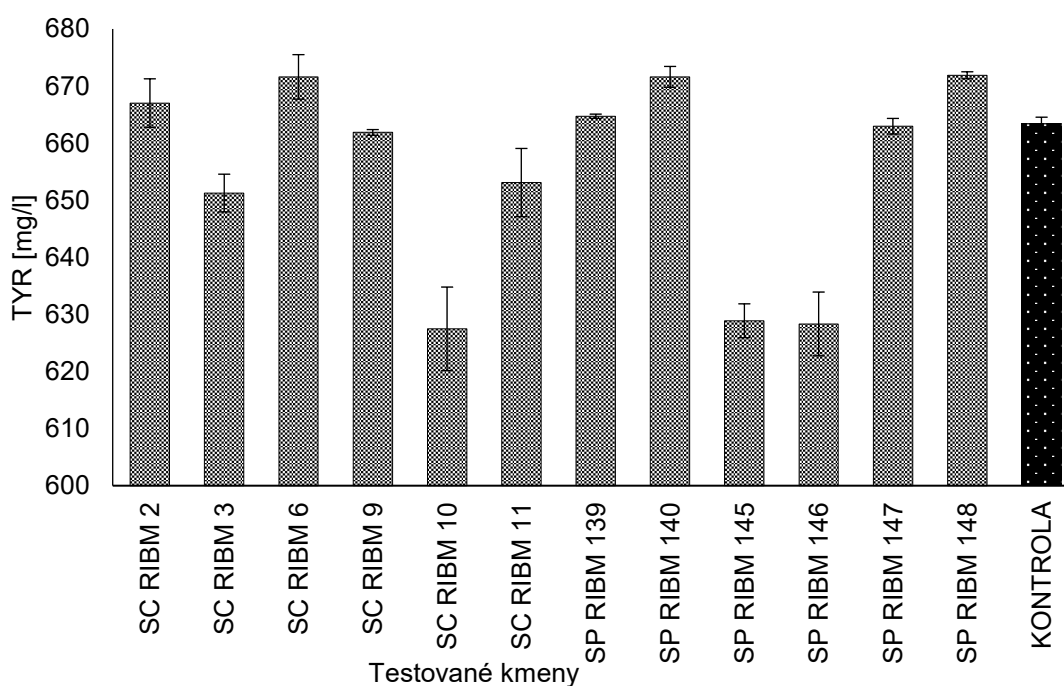


Obrázek 39: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

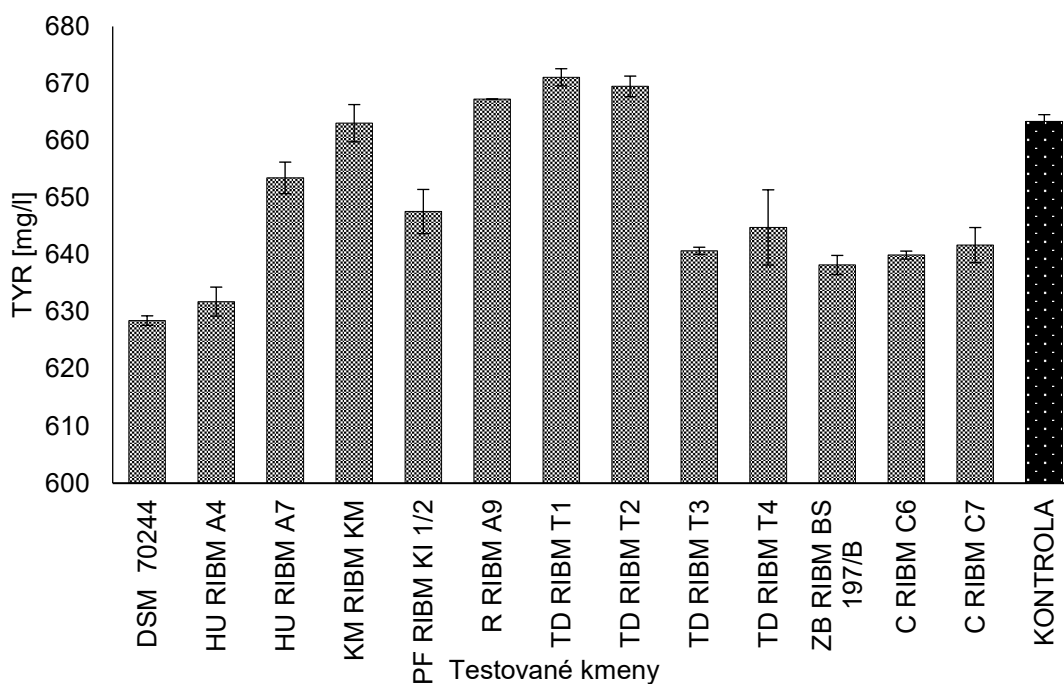
Obsah SPM u sledovaných kmenů se pohyboval 2,6 mg/l a SPD do 1,9 mg/l (nezobrazená data).

7.7 Minerální médium s tyraminem a kvasničným extraktem

U minerálního média obohaceného TYR a kvasničným extraktem bylo prokázáno, že kvasničné kmeny výrazněji degradují TYR (až o 35 mg/l) než produkují (do 8,5 mg/l). Detekované obsahy TYR se pohybovaly od 627,5-671,9 mg/l. Mezi supernatanty, které mají obsah TYR vyšší, patří ty se inokulovanými kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2 (Obrázek 40, 41). Ostatní půdy se zbylými kmeny měly nižší obsah TYR oproti kontrole. Z těchto kmenů za prokazatelně degradující TYR lze pokládat všechny kmeny kromě *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 9, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 147, *Kluyveromyces marxianus* RIBM km.

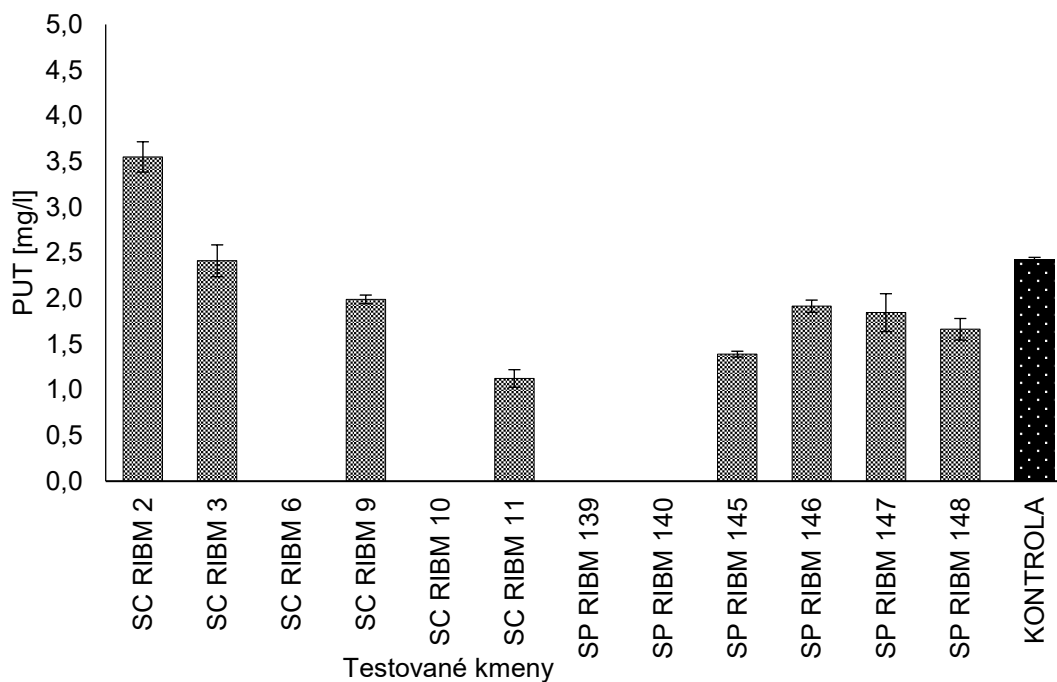


Obrázek 40: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

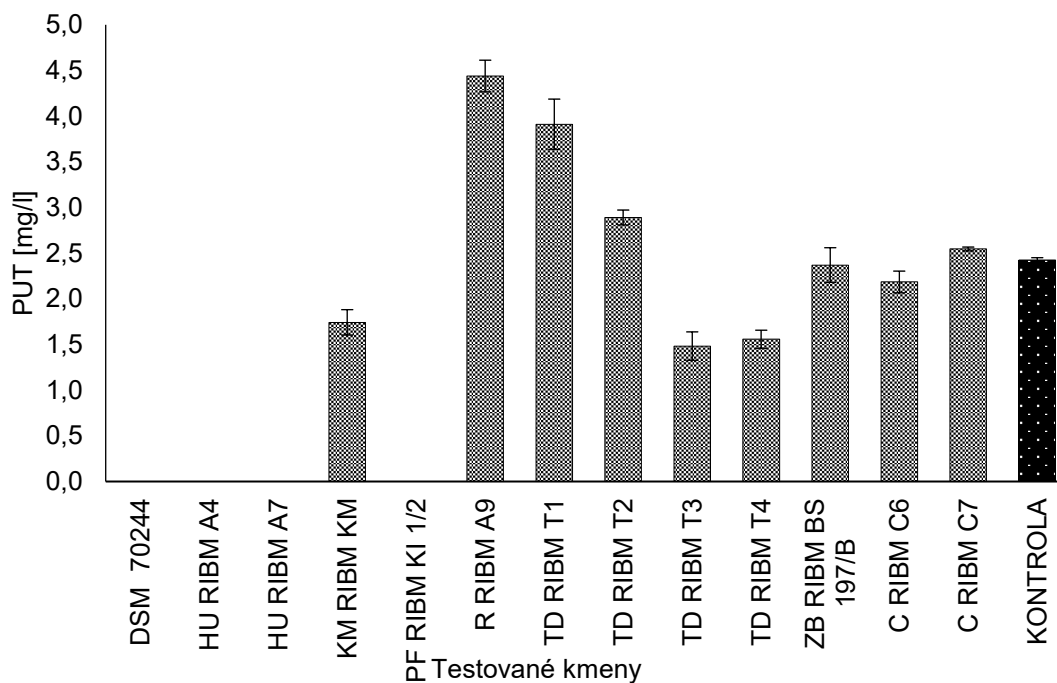


Obrázek 41: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Obsah TR byl detekován do 2,5 mg/l a obsah PEA do 2,6 mg/l (nezobrazená data). PUT byl detekován v rozmezí hodnot 1,1-4,4 mg/l. Jako kmeny s vyšším obsahem PUT byly určeny kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, T2 a *Candida* sp. RIBM C7 (Obrázek 42, 43).



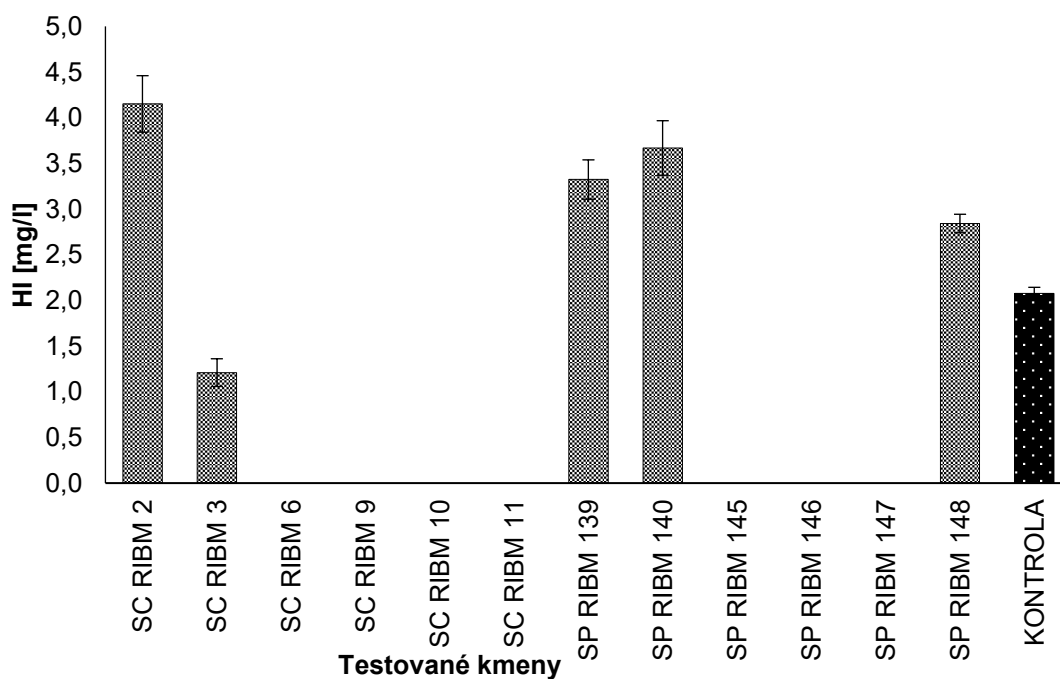
Obrázek 42: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



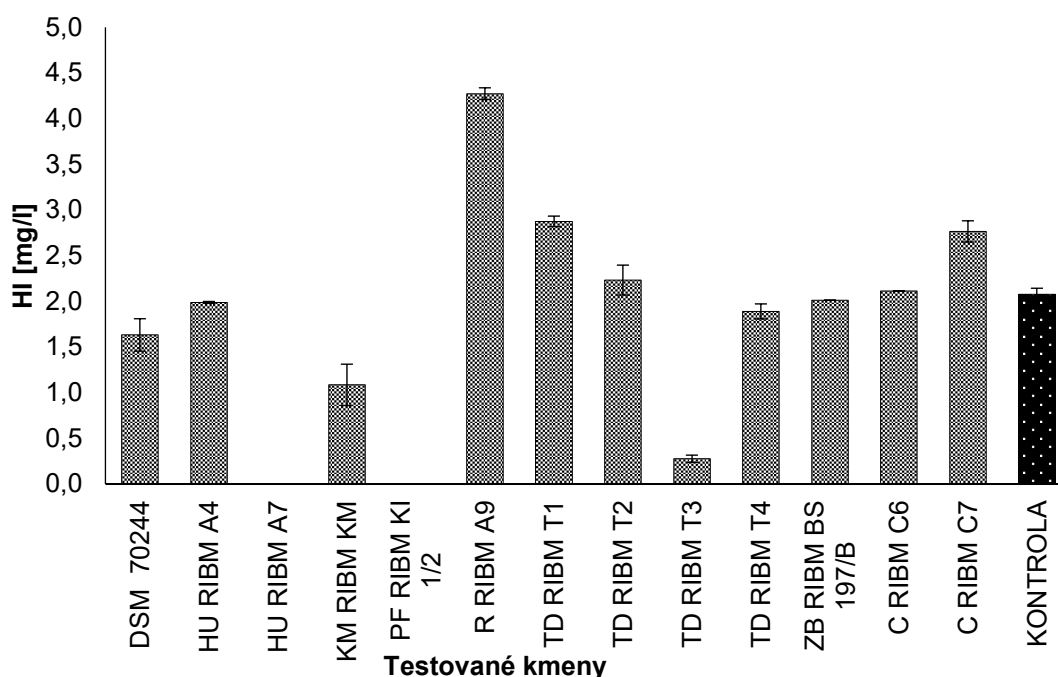
Obrázek 43: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

CAD byl naměřen pouze u kmene *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3 ($3,0 \pm 0,1$ mg/l) a *Kluyveromyces marxianus* RIBM km ($0,5 \pm 0,1$ mg/l) (nezobrazená data).

Obsahy HI byly detekovány v obsahu 0,3-4,3 mg/l. Z vybraných kmenů kvasinek byl vyšší obsah HI detekován v médiích se zainokulovanými kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, T2, *Candida* sp. RIBM C6, C7, které lze považovat za kmeny produkující TYR (kromě kmenů *Torulasporea delbrueckii* RIBM T2 a *Candida* sp. RIBM C6). Za degradujícími kmeny byly označeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Kluyveromyces marxianus* RIBM km, *Torulasporea delbrueckii* RIBM T3 (Obrázek 44, 45).



Obrázek 44: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

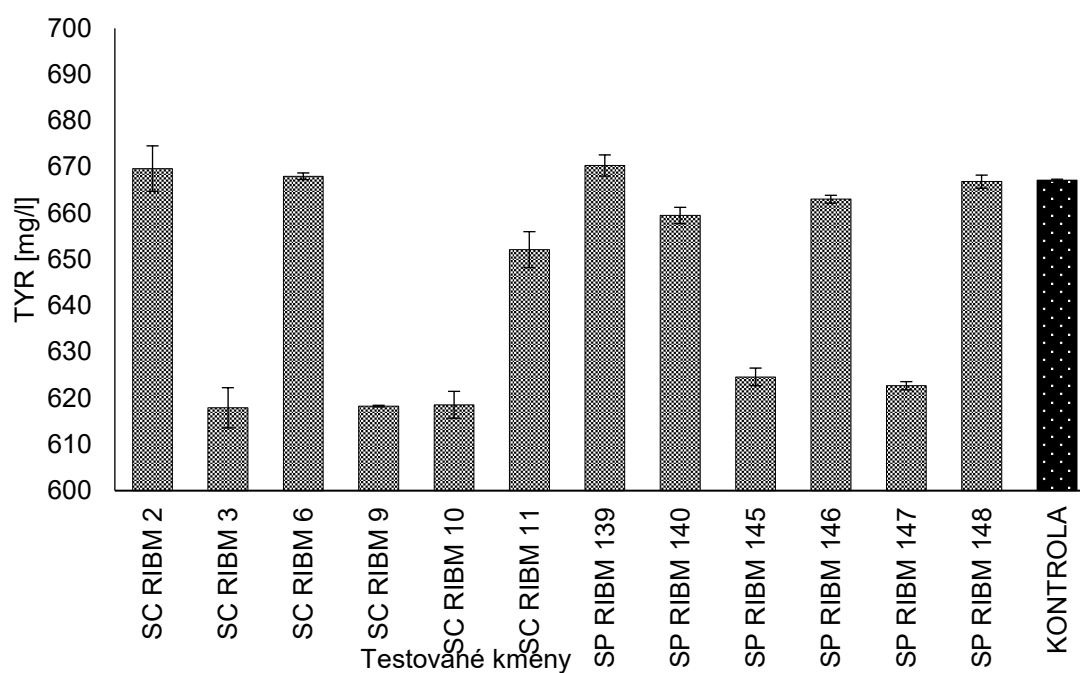


Obrázek 45: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

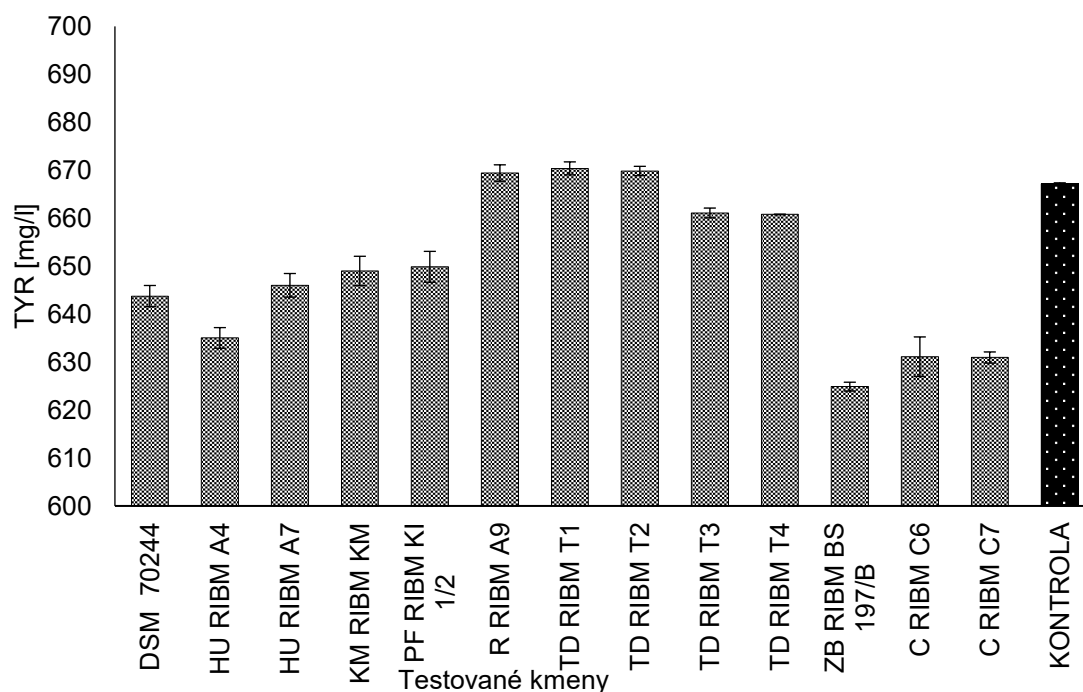
SPM byl detekován v obsahu do 1,4 mg/l a SPD do 2,4 mg/l (nezobrazená data).

7.8 Minerální médium s biogenními aminy a kvasničním extraktem

I přestože je dané médium obohacené o kombinaci BA s kvasničním extraktem, který je zdrojem sacharidů, vyšší obsah TYR oproti kontrole bylo dosaženo pouze u pūd s kultivovanými kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, *Rhodotorula* sp. RIBM A9 a *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, T2 nejvýše o 3,2 mg/l (Obrázek 46, 47). Ostatní kmeny TYR degradovaly a to až o 50 mg/l.



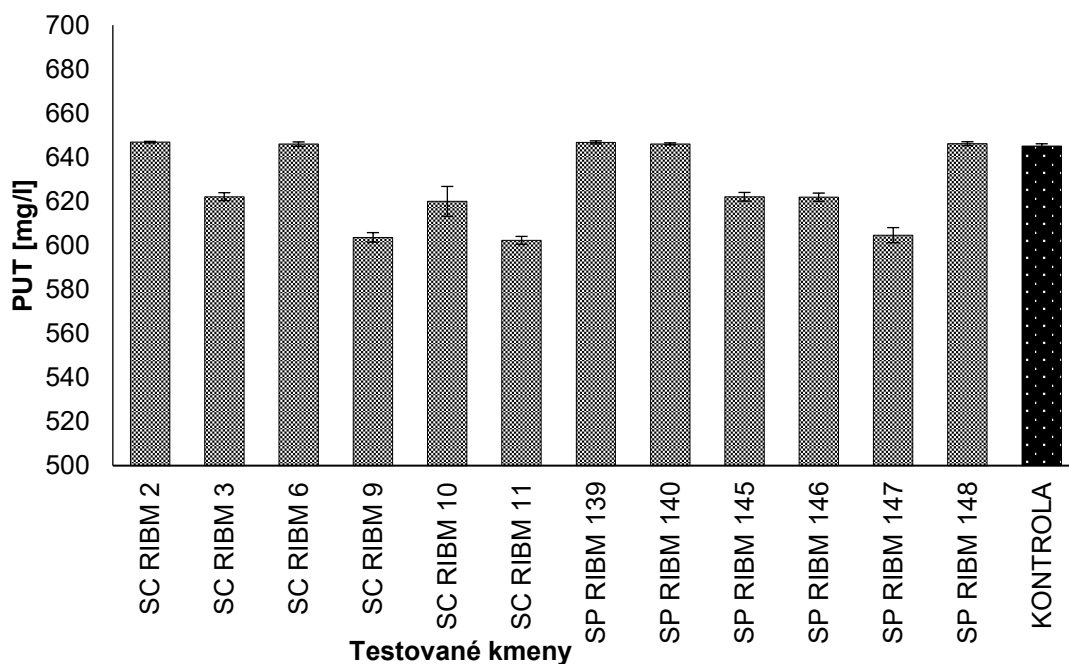
Obrázek 46: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C



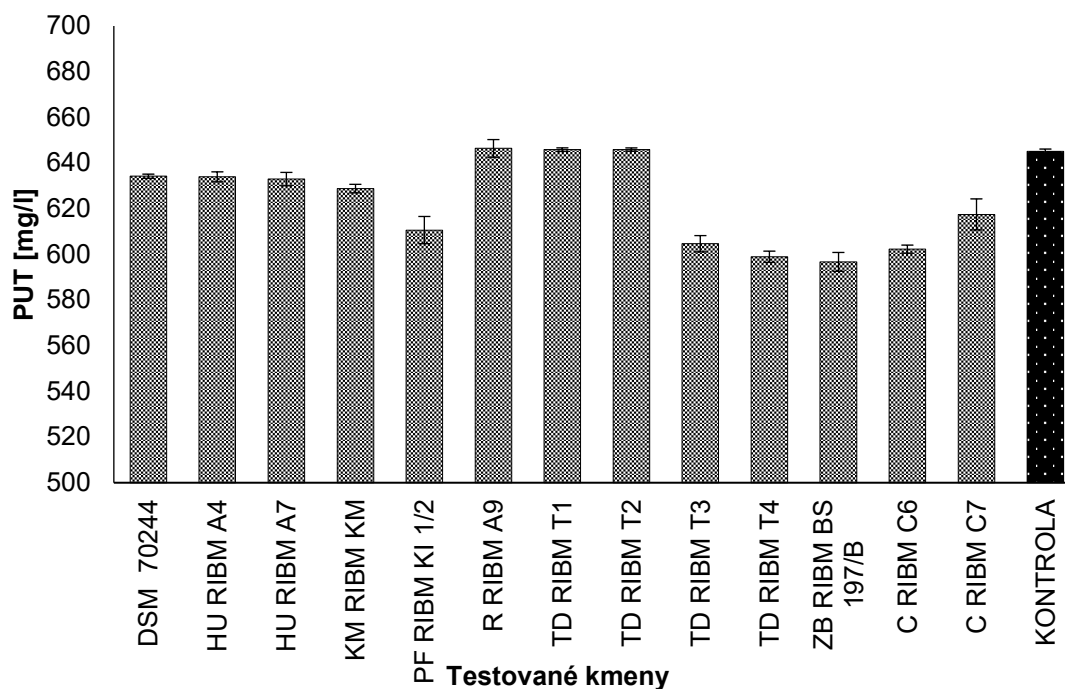
Obrázek 47: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C

TR byl detekován v rozmezí hodnot 2,2-3,6 mg/l. PEA byl prokázán pouze u divokých kmenů kvasinek, kde se jeho množství pohybovalo do 2,6 mg/l (nezobrazená data).

Obsah PUT v médiích s inokulovanými kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T1, T2 byl vyšší oproti kontrole maximálně o 1,8 mg/l (Obrázek 48, 49). Ostatní kmeny PUT degradovaly o 10,9-48,4 mg/l.



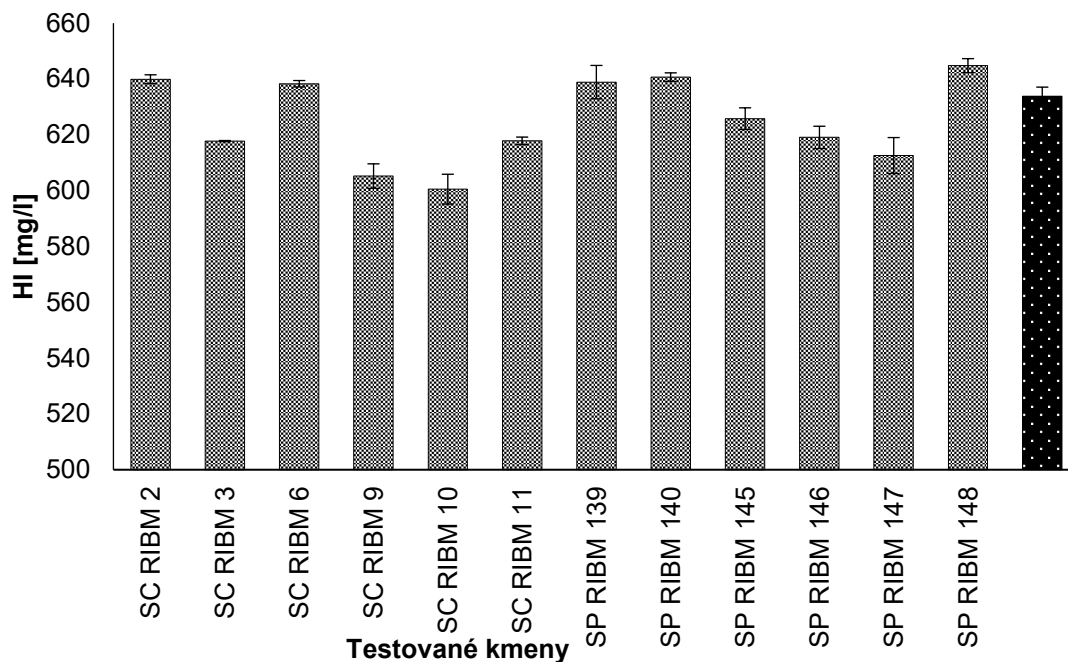
Obrázek 48: Obsah PUT v minerálním médiu s přísávkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C



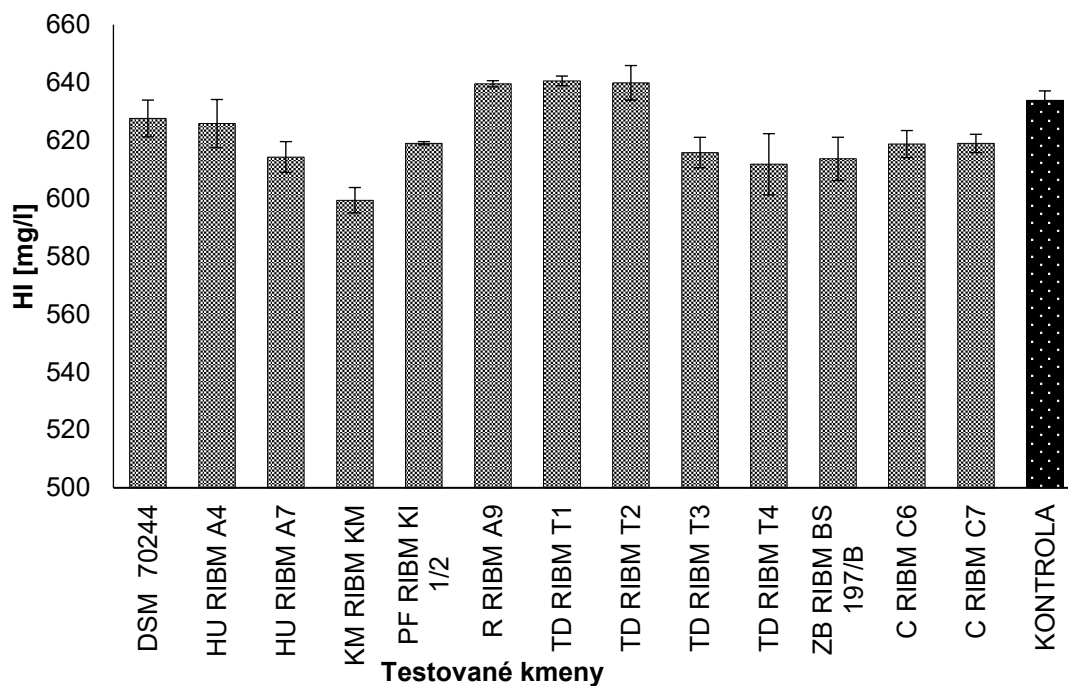
Obrázek 49: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

CAD nebyl detekován u žádného z médií po kultivaci kvasničných kmenů.

HI byl detekován u všech médií v rozmezí 599,3-644,8 mg/l. Vyšší obsahy byly zjištěny u supernatantů s kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2. K produkci HI u zmíněných kmenů došlo o maximálně 6,8 mg/l. Ostatní půdy po kultivaci zbylých kmenů měly obsah HI nižší. Rozdíl v úbytku HI je vyšší než nárůstu. K degradaci došlo až o 34,5 mg/l (*Kluyveromyces marxianus* RIBM km) (Obrázek 50, 51).



Obrázek 50: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C



Obrázek 51: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C
SPM byl detekován v rozmezí do 3,1 mg/l a SPD do 2,2 mg/l (nezobrazené hodnoty).

8 DISKUZE

Tato práce navazuje na dlouholetý výzkum v oblasti produkce BA a polyaminů zejména v pivu a sýrech, kterým se zabývá výzkumný tým odborníků na Ústavu technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Výstupem práce by měla být odpověď na otázku, zda je možné přidávkem určitých kmenů pivovarských kvasnic dosáhnout významného snížení obsahu BA a polyaminů v pivu (v prostředí), nebo jestli naopak některé kmeny nedisponují schopností vyšší koncentrace BA produkovat. Zvláště alarmující by pak byla produkce BA kulturními kmeny kvasinek, které se do mladiny přidávají záměrně.

Použitá média byla Malt bujón a minerální médium obohacené o představené suplementy (*Tabulka č. 6 v Kapitole 6.4*). Minerální médium simulovalo prostředí obecně živinově chudé. Záměrem bylo sledovat chování kvasinek, zda nebudou schopny BA využít v nehostinném prostředí jako substrát.

Minerální médium neobsahuje žádné cukry a disponuje jen velmi omezeným množstvím dusíkatých látek a zdrojem uhlíku. Na rozdíl od Malt bujónu se jedná skutečně o živinově velmi chudé prostředí. Malt bujón je speciální půdou určenou pro kultivaci kvasinek a je tvořen sladovým extraktem (zdroj sacharidů a uhlíku) a peptonem (zdroj dusíku, peptidů a uhlíku). V minerálním médiu byly tedy nejspíš kvasinky nuceny lyzovat část své biomasy pro získání potřebných živin pro svůj metabolismus. Za optimální koncentraci glukózy pro produkci BA je považováno množství 0,5-2,0 % (w/v) [43]. Cukry, jak je zmíněno výše, minerální médium nedisponuje.

Při produkci BA je obecně dostupnost AMK, jako prekurzor BA a polyaminů, obecně považována za důležitý faktor [43]. V případě suplementace minerálního média pouze o AMK pak existoval předpoklad, že by kvasinky se schopností dekarboxylázové aktivity mohly AMK využít jako prekurzory pro produkci těchto substancí. Tento předpoklad se potvrdil. Na základě výsledků této práce se zjistilo, že přidavek AMK na hodnoty BA, které vyprodukovaly testované kmeny, má zásadní vliv. Kdy v minerálním médiu obohaceném pouze o AMK produkovaly kmeny BA v množství do 1,7 mg/l a v Malt bujónu s AMK dosahovaly hodnoty produkce do 4,8 mg/l u TYR, do 4,0 mg/l u TR, do 3,6 mg/l u PEA, do 6,1 mg/l u PUT, do 1,5 mg/l u CAD, do 7,6 mg/l u HI, do 20,0 mg/l u SPM a do 11,2 mg/l u SPD. Tomuto poznatku odporuje výzkum (Izquierdo-Pulido et al., 2000), který sledoval souvislost mezi hodnotami tyrozinu a hladinou TYR v mladině a mezi těmito hodnotami nebyla nalezena žádná spojitost [66].

K produkci BA a polyaminů nedošlo u minerálních médiích obohacených pouze o BA. Všechny kvasničné kmeny degradovaly TYR (až o ± 25 mg/l), PUT (až o ± 30 mg/l) a HI (až o ± 45 mg/l). U minerálního média s TYR byla situace obdobná, kdy všechny kmeny kromě *Saccharomyces pastorianus* RIBM 148 TYR degradovaly a to až o 55 mg/l. Zmíněný kmen *S. pastorianus* RIBM 148 produkoval TYR ve velmi malém množství 3,4 mg/l.

U kmenů kultivovaných v minerálním médiu obohaceným o BA a kvasničný extrakt byla produkce BA velmi nízká (do 3 mg/l) a pouze u kmenů kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspota delbrueckii* RIBM T1, T2.

Potvrzena byla i teorie, že v minerálním médiu budou kvasinky více degrádovat BA a polyaminy oproti Malt bujónu, který je nutričně bohatší a kvasinky nejsou ochotny v takové míře využívat BA jako zdroje dusíku.

Pro kvasničné kmeny, které by v živných médiích neprodukovaly významné množství BA a polyaminů, a naopak v minerálním médiu by měly tendence obsah BA a polyaminy snižovat, by mohly být doporučeny pro hlavní i sekundární kvašení piva, při ležení v ležáckých tancích. Pro zmíněné použití byly navrženy kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, 9, 10, 11, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, 147 k dalšímu výzkumu potvrzení této vlastnosti.

Studie (Landete et al., 2007) uvádí, že během alkoholového kvašení nebyla pozorována produkce BA u kmenů kvasinek *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *bayanus*, *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, *S. cerevisiae* var. *Steiner*, *Candida boidinii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hansenula mrakii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia pinu*, *Rhodotorula rubra* [71]. Toto tvrzení ale vyvrací celá řada jiných autorů, kteří naopak tvrdí, že u zástupců těchto zmíněných druhů je potenciál produkce BA [55] [62] [18] [55] [3] [50] [72].

Tato práce nemůže tato tvrzení zcela vyvrátit ani podpořit. Pro potvrzení schopnosti produkce by bylo vhodné tento experiment doplnit molekulárními metodami. Bylo prokázáno, že živinové složení prostředí má zásadní vliv na metabolismus mikroorganismů, kdy v jednom prostředí mohou BA produkovat a v jiném degrádovat [50].

Takřka ve všech médiích (kromě minerálního média v kombinaci s TYR/BA) u konkrétních BA s detekovanou hodnotou kontroly (TYR, PUT, HI) byla prokázána produkční schopnost BA těchto kmenů:

- *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2
- *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 6
- *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139
- *Saccharomyces pastorianus* RIBM 140
- *Saccharomyces pastorianus* RIBM 148
- *Rhodotorula* sp. RIBM A9
- *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1
- *Torulaspora delbrueckii* RIBM T2

Produkční schopnost kulturních kmenů kvasinek obecně dosahovala produkce do 10 mg/l, u divokých kmenů byla produkce vyšší (až 15 mg/l). U ostatních kmenů ve všech médiích docházelo nejčastěji k degradaci BA. Haasová (2006) ve své práci uvádí, že schopnost degradovat TYR prokázaly *S. cerevisiae* RIBM 6, *S. pastorianus* RIBM 152, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244 a *Kluyveromyces marxianus* RIBM km [72]. S naším zjištěním odporuje pouze kmen *S. cerevisiae* RIBM 6, který BA převážně produkoval (kromě v minerálních médiích s přídavkem TYR/BA). To může být způsobeno rozdílným kultivačním prostředím. Izquierdo-Pulido (1995) uvádí, že kmen *S. cerevisiae* var. *uvarum* nemá schopnost tvořit BA během kvašení piva [57]. V prostředích jako je Malt s BA a Malt s TYR, které se prostředí mladiny blíží nejvíce, ze zástupců druhu *S. cerevisiae* produkovaly BA kmeny *S. cerevisiae* RIBM 2, 6, 169, 140.

Z výsledků této práce vyplívá, že veškeré kvasinky SPD i SPM téměř neprodukují. Vyšší hodnoty SPD a SPM byly detekovány pouze u Malt Bujónu s přídavkem AMK (SPM 1,2-19,9 mg/l; SPD 0,4-11,2 mg/l). Těchto vysokých hodnot dosahovaly kmeny *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T2, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7, ze zástupců divokých kmenů kvasinek. Z kulturních kmenů kvasinek to byly nejvíce *S. cerevisiae* RIBM 2 a 6.

U zbylých 6 médií byla situace úplně jiná, kdy detekované obsahy pro tyto dva polyaminy se pohybovaly \pm 0-2 mg/l. Halász et al. (1994) detekoval významné množství SPD a SPM u komerčních kmenů pivovarských kvasinek [50].

PEA a CAD nebyly detekovány u všech médií po kultivaci kmenů kvasinek. V případě, že byla jejich přítomnost prokázána, jejich koncentrace se pohybovala do 3 mg/l. Výskyt těchto BA v pivu bývá spojován zejména s procesem výroby sladu [73]. V této práci produkovaly PEA, CAD spolu s TR zejména kmeny *S. cerevisiae* RIBM 2, 3, *S. pastorianus* RIBM 145, 146, 148, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7 a *Kluyveromyces marxianus* RIBM km a to v koncentracích u TR do 4 mg/l, u PEA do 3,6 mg/l, u CAD do 3 mg/l a to napříč všemi médii.

Překvapivým zjištěním bylo, že 10 kmenů z 13 divokých kmenů kvasinek degraduje BA. V práci Baumlisberger at al. (2015) potvrdili, že kmen *Debaryomyces hansenii* má degradační schopnost BA. Také uvádí, že produkce BA není druhovou, ale kmenově specifickou vlastností [74]. Toto tvrzení podporují i výsledky této práce, kdy ne všechny kmeny výhradně produkují/degradují BA jako u kmenů *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* a *Torulaspora delbrueckii*. Kmeny *Candida* sp. byly označeny jako kmeny degradující BA. Proti tomuto tvrzení oponuje studie Qi et al. (2014), která prokázala, že *Candida versatilis* a *Zygosaccharomyces rouxii* jsou producenti TYR [75].

Opět je nutné poukázat na rozdílnost složení prostředí, ve kterém probíhala kultivace a která značně ovlivňuje degradaci nebo tvorbu BA. Tato práce už potvrdila, že stačí ovlivnit pouze jeden faktor (jako je živinová skladba) a dekarboxylázová aktivita daného kmene se může změnit.

Kalač a Křížek uvádějí, že množství HI, které může vyvolat zdravotní potíže u konzumenta se pohybuje 8-40 mg/kg a nad 100 mg/kg už dochází k těžkým otravám [44]. Produkce, kterou bychom mohli, vzhledem k přítomnosti etanolu v konečném produktu, považovat za významnou byla zvolena nad 2 mg/l pro HI v alkoholických nápojích. Tato hodnota byla stanovena na základě doporučení Brinka (1990), který také pro TYR stanovil hranici 100 mg/l. Žádný ze sledovaných kmenů neprodukoval tak významné TYR. Ale produkce HI už byla vyšší než doporučené množství. Nejvíce HI bylo detekováno v Malt bujónu s přísadkou BA. Hodnoty obsahu HI se pohybovaly do 1,7 mg/l u minerálního média s AMK, do 3,7 mg/l u Malt bujónu s TYR, do 2 mg/l u minerálního média s TYR a kvasničným extraktem, do 15,3 mg/l u Malt bujónu s BA a do 1,8 mg/l u minerálního média s BA a kvasničným extraktem. Při uvážení, že toxicita HI může být zvýšena přítomností aminů CAD, PUT a TYR [57], je zde potenciál způsobení poškození zdraví u citlivého jedince.

Produkce TYR byla zjištěna do 4,8 mg/l u Malt bujónu s AMK, do 1,7 mg/l u minerálního média s AMK, do 16,4 mg/l u Malt bujónu s TYR, do 3,4 mg/l u minerálního média s TYR, do 8,5 mg/l u minerálního média s TYR a kvasničným extraktem, do 11,2 mg/l u Malt bujónu s BA, do 3,2 mg/l minerálního média s BA a kvasničným extraktem.

PUT byl kvasničnými kmeny produkován v maximální koncentraci do 6,1 mg/l u Malt bujónu s AMK, do 1,6 mg/l u minerálního média s AMK, do 7,9 mg/l u Malt bujónu s TYR, do 1,2 mg/l u minerálního média s TYR, do 2,0 mg/l u minerálního média s TYR a kvasničným extraktem, do 14,7 mg/l u Malt bujónu s BA a do 1,8 mg/l minerálního média s BA a kvasničným extraktem.

Tato práce může sloužit jako výchozí materiál pro další posouzení v oblasti monitoringu dekarboxylázové aktivity kmenů kvasinek, které se mohou účastnit výroby piva. Pro potvrzení zjištěných degradačních schopností je důležité podrobněji prozkoumat chování sledovaných kmenů kvasinek v reálném prostředí jako je mladina a prostředí mladého piva. Další možností je potvrzení výsledků metodou PCR, která by potvrdila přítomnost genu kódující enzymy pro degradaci BA.

Na kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotrula* sp. RIBM A9, *Torulasporea delbrueckii* RIBM T1, T2 s potenciálem produkce BA a polyaminů, nelze nahlížet jako na nebezpečné kmeny ohrožující zdraví konzumenta. Tyto kmeny produkovaly BA v přijatelné mezi. Neopomenutelný je fakt, že mezi hlavními producenty BA v pivovarství jsou zejména pediokoky a laktobacily [3].

Nový pohled z hlediska regulace BA v potravinách přináší genové inženýrství. Bylo prokázáno, že odtraněním genu PEP4 v kvasinkách *S. cerevisiae*, který kóduje proteinázu A (enzym zodpovědný za produkci volných AMK), došlo k výraznému snížení BA (cca o 25 %) [76]. Podnětem pro další výzkum v oblasti snižování BA v pivu, by mohla být aplikace těchto kmenů neschopných hydrolyzovat bílkoviny. V mladině, nebo v mladém pivě mohou volné AMK sloužit jako substrát jiným mikroorganismům (zejména bakteriím mléčného kvašení). Potvrzením je i tento experiment, který prokázal utilizaci AMK, která vedla k výrazné tvorbě BA a polyaminů.

Význam výroby potravin s nižším obsahem BA je podstatný. Při volbě kmene na výrobu piva by měla být zohledňována hned vedle schopnosti rychlosti množení, míry rozkvašování mladiny, tvorby aromatických látek, pěnivosti, schopnosti sedimentace aj. i schopnost produkce/degradace BA a polyaminů v pivu.

9 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala schopností produkce/degradace BA a polyaminů vybranými kmeny kvasinek za podmínek *in vitro* v různě suplementovaných médiích. Na základě získaných výsledků pomocí HPLC s UV detekcí bylo zjištěno že:

- Produkční schopnost BA prokázaly kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 2, 6, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 139, 140, 148, *Rhodotorula* sp. RIBM A9, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T1, T2. Množství vyprodukovaných BA se pohybovalo do 10 mg/l, u divokých kmenů byla produkce do 15 mg/l.
- Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 3, 9, 10, 11, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 145, 146, 147, *Debaryomyces hansenii* DSM 70244, *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4, A7, *Kluyveromyces marxianus* RIBM km, *Pichia fermentans* RIBM KI ½, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T3, T4 se projevovaly jako degradující. Po dalším ověření této schopnosti v procesu kvašení piva by mohly být kulturní kmeny kvasinek záměrně voleny s cílem redukovat obsah BA.
- V nutričně chudých médiích, jako byla minerální média s BA a minerální média s TYR, téměř všechny kvasničné kmeny degradovaly BA (TYR až do 50 mg/l, PUT až do 30 mg/l, HI až do 50 mg/l).
- V minerálních médiích v porovnání s Malt bujónem došlo k vyšší utilizaci BA. Případná produkce naopak byla detekována spíše v živných médiích (Malt bujóny s/bez suplementace).

Z dosažených výsledků vyplývá, že množství BA, schopné ohrozit zdraví spotřebitele byla stanoveno pouze u HI, kdy nejvyšší produkce 15 mg/l bylo dosaženo u Malt bujónu obohaceného o BA.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Spotřeba potravin - 2016 | ČSÚ. *Český statistický úřad* | ČSÚ [online]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2016>
- [2] PREEDY, V. R. *Beer in health and disease prevention*. Burlington, MA: Academic, 2009, pp. 77-88, 129-135, 213-216. ISBN 9780123738912.
- [3] KALACH, P. a M. KRÍŽEK. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the institute od Brewing*. 2003, roč. 109, s. 123-128. ISSN:2050-0416.
- [4] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á. and W. HOLZAPFEL. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*. 1999, vol. 208, pp. 418–423.
- [5] BAMFORTH, CH. W. *Food, fermentation, and micro-organisms*. Ames, Iowa: Blackwell Science, 2005, pp. 66-73, ISBN 0632059877.
- [6] MATOULKOVÁ, D., KOPECKÁ, J. a P. KUBIZNIAKOVÁ. Brewing Microbiology – Wild Yeasts and Methods of Their Detection. *Kvasný průmysl*. 2013, 59, s. 246-257.
- [7] BENDOVIÁ, O. a M. KAHLER. *Pivovarské kvasinky*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1981, 270 s., váz.
- [8] BASAŘOVÁ, G. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015, ISBN 978-80-87109-47-2.
- [9] BELITZ, H.-D., GROSCH, W. and P. SCHIEBERLE. *Food chemistry*. 4th, rev. and extended ed. Berlin: Springer, 2009, ISBN 978-3-540-69933-0.
- [10] RAINIERI, S., ZAMBONELLI, C. and Y. KANEKO. Saccharomyces Sensu Stricto: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, vol. 96, no. 1 , pp. 1-9, ISSN:1389-1723.
- [11] KOHOUTOVÁ, P. a I. HOLLEROVÁ. Sbíрка pivovarských kvasinek VÚPS. *Kvasný průmysl*. 1997, 43, s. 9.
- [12] Sbíрка kvasinek. *Aktuality* [online]. Copyright © 2003 [cit. 12.04.2017]. Dostupné z: http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=47%3Asba-kvasinek&catid=99%3Avyzkum-obecne&Itemid=110&lang=cs
- [13] BUŇKOVÁ, L. Mikroorganizmy přítomné v potravinářství a kosmetice [přednáška]. Zlín: UTB, 2.11.2016

- [14] ECCO. *ECCO* [online]. Dostupné z: <https://www.eccosite.org/>
- [15] National Collection of Yeast Cultures. *National Collection of Yeast Cultures* [online]. Copyright © 2017 National Collection of Yeast Cultures. All Rights Reserved. [cit. 12.04.2017]. Dostupné z: <http://www.ncyc.co.uk/>
- [16] BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, ISBN 978-80-7080-734-7.
- [17] Sbíрка kvasinek. *Aktuality* [online]. Copyright © 2003 [cit. 12.04.2017]. Dostupné z: http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=47%3Asba-kvasinek&catid=99%3Avyzkum-obecne&Itemid=110&lang=cs
- [18] GRAEME, M. W. and G. G. STEWART. Review: *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*. 2016, 2, p. 30.
- [19] ŠAVEL, J. *Mikrobiologická kontrola v pivovarech*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1980, s. 148, ISBN 04-822-80.
- [20] VAUGHAN, A., O'SULLIVAN, T. and D. VAN SINDEREN. Enhancing the microbiological stability of malt and beer. A review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, 111 (4), pp. 355–371.
- [21] BARTH, R. *The chemistry of beer: The Science in the Suds*. Hoboken: Wiley, 2013, p. 170, ISBN 978-1-118-67497-0.
- [22] HLAVÁČEK, F. a A. LHOTSKÝ. *Pivovarství*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1972, 538 s., váz.
- [23] STEWART, G. G. Brewer's Yeast. *Encyklopedia of Food Microbiology*. 2014, vol. 3, s. 302-308.
- [24] ODSTRČIL, J. a M. ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006, s. 52. ISBN 80-7013-435-6.
- [25] VELÍŠEK, J. a K. CEJPEK. *Biosynthesis of Food Components*. Tábor: Osis, 2008, s. 58-65, ISBN 978-80-96659-12-1.
- [26] BRÁNYIK, T., VICENTE, A. A., DOSTÁLEK, P. and J. A. TEIXEIRA. A Review of Flavour Formation in Continunous Beer Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008, vol. 114, pp. 3–13.

- [27] PROCOPIO, S., BRUNNER, M. and T. BECKE. Differential transcribed yeast genes involved in flavour formation and its associated amino acid metabolism during brewery fermentation. *European Food Research and Technology*. 2014, 239(3), pp. 421-439.
- [28] VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G. and F. R. DELVAUX. Esters in beer – part 3: Why do yeast cell produce fruity flavours: the physiological role of acetate ester synthesis. *Cerevisia*. 2003, 29(1), pp. 19-29.
- [29] BAMFORTH, C. W. and M. KANAUCHI. Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*. 2004, vol. 110, pp. 83-93.
- [30] BENDOŤÁ, O. Diacetyl při kvašení a dokvašování piva. *Kvasný průmysl*. 1967, 13, s. 35-38.
- [31] LEWIS, M. and CH. W. BAMFORTH. *Essays in brewing science*. New York: Springer, 2006, ISBN 978-0387-33010-5.
- [32] CEJPEK, K. Vonné chuťové složky sladů. *Chemické listy*. 2014, 108, s. 426-435.
- [33] BASAŘOVÁ, G. a I. HLAVÁČEK. *České pivo*. 2. vyd. Praha: Nuga, 1999. ISBN 80-85903-08-3.
- [34] SIEGLER, K. a D. MATOULKOVÁ. Pivovarské kvasinky a reakce na stres. *Kvasný průmysl*. 2011, 57, s. 277-282.
- [35] GIBSON, B. R., LAWRENCE, S. J., LECLAIRE, J. P. R., POWELL, C. D. and K. A. SMART. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007, 31, pp. 535–569.
- [36] ZHAO, X. Q. and F. W. BAI. Mechanism of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 2009, pp. 23-30.
- [37] RIKHVANOV, E. G., I. V. FEDOSEEVA, N. N. VARAKINA, T. M. RUSALEVA and A. V. FEDYAEVA. Mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell death induced by heat shock. Effect of cycloheximide on thermotolerance. *Biochemistry*. 2014, 79(1), pp. 16-24, ISSN 0006-2979.
- [38] CONWAY, E. J. and W. McD. ARMSTRONG. The total intracellular concentration of solutes in yeast and other plant cells and the distensibility of the plant-cell wall. *Biochemical Journal*. 81, 1961, pp. 31–639.

- [39] KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. a kol. *Technologie výroby sladu a piva*. první. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., 2000. 398 s, ISBN 80-902658-6-3.
- [40] JENKINS, C., KENNEDY, A., THURSTON, P., HODGSON, J. and K. SMART. Impact of wort composition and serial repitching on lager brewing yeast fermentation performance and organelle integrity. Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Budapest, IRL Press: Oxford, 2001, pp. 378-387.
- [41] GARDINI, F., ÖZOGUL, Y., SUZZI, G., TABANELLI, G. and F. ÖZOGUL. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2016, vol. 71218. ISSN:1664-302X.
- [42] SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., ALEXANDRE, H., GRANDVALET, C., COTON, E., COTON, M., BARNAVON, L., BACH, B., RATTRAY, F., BUNTE, A., MAGNI, C., LADERO, V., ALVAREZ, M., FERNÁNDEZ, M., LOPEZ, P., PALENCIA, P. F. de, CORBI, A., TRIP, H. and J. S. LOLKEMA. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, 64, pp. 95–100.
- [43] SILLA-SANTOS, M. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29, pp. 213-231. ISSN 0168-1605
- [44] KALAČ, P. a M. KŘÍŽEK. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářské Revue*. 2005, 2, s. 40-42.
- [45] KALAČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science*. 2006, 73, s. 1-11.
- [46] AGOSTINELLI, E., MARQUES, M. P. M., CALHEIROS, R., GIL, F. P. S. C., TEMPERA, G., VICECONTE, N., BATTAGLIA, V., GRANCARA, S. and A. TONINELLO. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. Review article. *Amino Acids*. 2010, 38, pp. 393–403.
- [47] SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické Listy*. Brno, 2004, 98, s. 432–437.

- [48] LADERO, V., SÁNCHEZ-LLANA, E., FERNÁNDEZ, M. and ALVAREZ, M. A. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science and Technology*. 2011, 46, pp. 516–521.
- [49] MEDINA, M. Á., URDIALES, J. L., RODRÍGUES-CASO, C., RAMÍREZ, F. J. and F. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ. Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2003, 38, pp. 23–59.
- [50] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., and HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994, 5(2), pp. 42-49.
- [51] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, 29(7), pp. 675-690. ISSN: 09639969.
- [52] KAROVIČOVÁ, J. and Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. A review, 2005, 59(1), pp. 70-79.
- [53] 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, pp. 395-410, ISSN: 2159-5828.
- [54] KALACĚ, P., J. ŠAVEL, M. KRĚÍZEK, T. PELIKÁNOVÁ a M. PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 79, 2002, č. 4, s. 431–434.
- [55] BUŇKA, F., P. BUDINSKÝ, M. ČECHOVÁ, V. DRIENOVSKÝ, V. PACHLOVÁ, D. MATOULKOVÁ, V. KUBÁŇ a L. BUŇKOVÁ. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Research article*. online: Wiley Online Library, 9.srpen 2012, Institute of Brewing and Distilling.
- [56] BRINK, B. ten, DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J. and J. H. J. HUIS In't VELD.: Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1990, 11(1), pp. 73-84, ISSN 0168-1605.
- [57] IZQUIERDO-PULIDO, M., J. FONT-FÁBREGAS and C. VIDAL-CAROU, Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. *Food chemistry*. 1995, pp. 51-54, ISSN: 0308-8146.
- [58] MORENO-ARRIBAS, M. V. a M. C. POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009, ISBN 978-0-387-74116-1.

- [59] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny (Úř. věst. L 338, 22.12.2005, s. 11).
- [60] KALACĚ, P., HLAVATÁ, V. a M. KRĚŽEK. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry*. 1997, 58(3), pp. 209-214.
- [61] MOZZON, M., BOSELLI, E., OBIEDZIŃSKI, M. W. and N. G. FREGA. Occurrence of biogenic amines in beers produced with malted organic Emmer wheat (*Triticum dicoccum*). *Food Additives and Contaminants*. Part A, 2015, 32(5), pp. 756-67.
- [62] COSTANTINI, A., VAUDANO, E., DEL PRETE, V., DANEI, M. and E. GARCIA-MORUNO et al. Biogenic Amine Production by Contaminating Bacteria Found in Starter Preparations Used in Winemaking. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009, vol. 57, pp. 10664-10669.
- [63] LORENCOVÁ, E., BUŃKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŃ, V. a F. BUŃKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012, pp. 2086-2091.
- [64] LEUSCHNER, R. G., HEIDEL, M. and W. P. HAMMES. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 39, 1998, pp. 1–10.
- [64] TALON, R. and S. Leroy. Fermented Meat Products and the Role of Starter Cultures. *Encyklopedia of Food Microbiology*. 2014, vol. 1, pp. 870-874.
- [66] IZQUIERDO-PULIDO, M., A. MARINÉ-FONT a M. C. VIDAL-CAROU, Effect of tyrosine on tyramine formation during beer fermentation. *Food chemistry*. 2000, pp. 329-332.
- [67] KRAUSOVÁ, P., KALACĚ, P., KRĚŽEK, M. a T. PELIKÁNOVÁ. Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. *Meat science*. 2006, 73, pp. 640-644.
- [68] KRAUSOVÁ, P., KALACĚ, P., KRĚŽEK, M. a T. PELIKÁNOVÁ. Changes in the content of biologically active polyamines during storage and cooking of pig liver. *Meat Science*. 2007, 7, pp. 269-274.

- [69] PAULSEN, P., HAGEN, U. and F. Bauer. Changes in biogenic amine contents, non-protein nitrogen and crude protein during curing and thermal processing of *M. longissimus, pars lumborum* of pork. *European Food Research and Technology*. 2006, vol. 223, pp. 603-608.
- [70] VALDEZ, B. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. 2012, vol. 418, pp. 281-293, ISBN 978-953-307-905-9.
- [71] GUO, X., GUAN, X., WANG, Y., LI, L., WU, D., CHEN, Y., PEI, H. and D. XIAO. Reduction of biogenic amines production by eliminating the PEP4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of Chinese rice wine. *Food Chemistry*. 178, 2015, pp. 208–211.
- [72] LANDETE, J. M., FERRER, S. and I. PARDO. Biogenic amines production by lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, roč. 18, pp. 1569-1574.
- [73] HAASOVÁ, Z. *Schopnost produkce biogenních aminů vybranými kmeny kvasinek*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce E. LORENCOVÁ, s. 39-48.
- [74] IZQUIERDO-PULIDO M. L., MARINE-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic Amines Formation during Malting and Brewing. *Journal of Food Science*. 1994, roč. 59, č. 5, pp. 1104-1107.
- [75] BAUMLISBERGER, M., MOELLECKEN, U., KÖNIG, H. and H. CLAUS. The Potential of the Yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microorganisms*. 2015, 3, pp. 839-850.
- [76] QI, W., L.H. HOU, H.L. GUO, C.L. WANG, Z.C. FAN, J.F. LIU and X.H. CAO. Effect of salttolerant yeast of *Candida versatilis* and *Zygtosaccharomyces rouxii* o the production of biogenic amines during soy sauce fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, roč. 94, pp. 1537-1542, ISSN: 1097-0010.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AGM	Agmatin
AMK	Aminokyselina
BA	Biogenní amin
CAD	Kadaverin
CKT	Cylindrokónický tank
FAN	Free Amino Nitrogen
HI	Histamin
N-látky	Dusíkaté látky
PEA	2-fenyletylamin
PUT	Putrescin
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TR	Tryptamin
TYR	Tyramin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Transaminace [25].....	19
Obrázek 2: Dekarboxylace [25].....	19
Obrázek 3: Zjednodušené schéma vzniku většiny sensoricky aktivních složek během procesu fermentace [26]	20
Obrázek 4: Dekarboxylace kyseliny pyrohroznové za vzniku acetaldehydu [21].....	21
Obrázek 5: Syntéza etanolu [21].....	21
Obrázek 6: Schéma růstové křivky mikroorganismů	26
Obrázek 7: Probíhající změny během pivovarského kvašení [5]	27
Obrázek 8: Možný stres v průběhu propagace v pivovaru, kvašení a skladování [35]	29
Obrázek 9: Metabolické cesty tvorby BA [50].....	34
Obrázek 10: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	49
Obrázek 11: Obsah TYR v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	49
Obrázek 12: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	50
Obrázek 13: Obsah PUT v Malt Broth s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	51
Obrázek 14: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	52
Obrázek 15: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	52
Obrázek 16: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	53
Obrázek 17: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	54
Obrázek 18: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	54
Obrázek 19: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem AMK 0,3 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	55

Obrázek 20: Obsah TYR v Malt Broth s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	56
Obrázek 21: Obsah TYR v Malt Broth s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	57
Obrázek 22: Obsah PUT v Malt Broth s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	57
Obrázek 23: Obsah PUT v Malt Broth s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	58
Obrázek 24: Obsah HI v Malt Broth s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	59
Obrázek 25: Obsah HI v Malt Broth s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	60
Obrázek 26: Obsah TYR v minerálním médiu s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	61
Obrázek 27: Obsah TYR v minerálním médiu s přídavkem TYR 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	61
Obrázek 28: Obsah TYR v Malt Broth s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	62
Obrázek 29: Obsah TYR v Malt Broth s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	63
Obrázek 30: Obsah PUT v Malt Broth s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	64
Obrázek 31: Obsah PUT v Malt Broth s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	64
Obrázek 32: Obsah HI v Malt Broth s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	65
Obrázek 33: Obsah HI v Malt Broth s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	66
Obrázek 34: Obsah TYR v minerálním médiu s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C	66
Obrázek 35: Obsah TYR v minerálním médiu s přídavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	67

- Obrázek 36: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C68
- Obrázek 37: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....69
- Obrázek 38: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C
- Obrázek 39: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....70
- Obrázek 40: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....71
- Obrázek 41: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....72
- Obrázek 42: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....73
- Obrázek 43: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....73
- Obrázek 44: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....74
- Obrázek 45: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem TYR 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....75
- Obrázek 46: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....76
- Obrázek 47: Obsah TYR v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....76

Obrázek 48: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	77
Obrázek 49: Obsah PUT v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	78
Obrázek 50: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci kulturních kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	79
Obrázek 51: Obsah HI v minerálním médiu s přidavkem BA 0,07 % (w/v) a Yeast extraktu 0,1 % (w/v) po kultivaci divokých kmenů kvasinek po dobu 48 hodin při 30 °C ± 2 °C.....	79

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Divoké kvasinky v pivovarnictví [19]	15
Tabulka 2: Rozdělení AMK v mladině podle rychlosti asimilace kvasinkami [23]...	18
Tabulka 3: Charakteristika vůně a chuti různých typů piva [9].....	25
Tabulka 4: Zvýšená tolerance ke stresovým podmínkám po předchozím teplotním stresu.....	30
Tabulka 5: Přehled toxických účinků BA [25], [51]	35
Tabulka 6: Přehled použitých medií obohacených o různé suplementy.....	44
Tabulka 7: Použité kmeny kvasinek a jejich zkratky	47