

# Monitoring obsahu biogenních aminů v lahvovaných pivech v ČR

Bc. Markéta Čechová

---

Diplomová práce  
2012

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta ČECHOVÁ**  
Osobní číslo: **T10929**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Monitoring obsahu biogenních aminů v lahvovaných pivech v ČR**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Popis výroby alkoholického piva a podmínek skladování.
2. Výskyt biogenních aminů v pivech.
3. Faktory ovlivňující výskyt biogenních aminů v pivech.

### II. Praktická část

1. Skladovací pokus s nejméně 80 vzorky lahvovaných alkoholických piv hlavních pivovarů v ČR.
2. Měření pH a obsahu biogenních aminů metodou HPLC bezprostředně po zakoupení a následně na konci doby minimální trvanlivosti.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. **BASAŘOVÁ G., ŠAVEL J., BASAŘ P., LEJSEK T.** Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. 1. vyd. VŠCHT Praha, 2010, 904 s.
2. **KOSAŘ K. a kol.** Technologie výroby piva a sladu. 1. vyd. VÚPS Praha, 2000, 398 s.
3. **BRIGGS D., BOULTON C., BROOKES P., STEVENS R.** Brewing – Science and practice. 1st ed. , Woodhead Publishing Limited, 2004, 963 s.
4. **SILLA SANTOS, M.H.** Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 1996, 29, 213-231.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Helena Velichová, Ph.D.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**6. ledna 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

**21. května 2012**

Ve Zlíně dne 15. února 2012



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



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....

.....

---

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

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

*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.*

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

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

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

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

*(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-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 výtěžku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

## **ABSTRAKT**

Biogenní aminy bývají často přítomny v pivech. Jejich přítomnost v alkoholických nápojích může představovat závažné riziko pro zdraví konzumentů. Diplomová práce byla zaměřena na monitoring obsahu biogenních aminů v 99 alkoholických lahvových pivech vyrobených v České republice a dostupných v běžné obchodní síti. Obsah biogenních aminů byl monitorován pomocí HPLC po předchozí derivatizaci dansylchloridem bezprostředně po zakoupení a na konci doby použitelnosti. Biogenní aminy byly detekovány u všech testovaných piv s výjimkou jednoho vzorku. Jejich celkové množství v analyzovaných pivech dosáhlo maximální hodnoty 316,8 mg/l. V žádném z testovaných piv nebyl detekován histamin. U většiny piv (97 %) došlo během chladírenského skladování ke zvýšení celkového množství biogenních aminů. Obsah biogenních aminů může u piv na konci doby použitelnosti, dosahovat hodnot, které by mohly u některých osob způsobit zdravotní komplikace.

Klíčová slova: lahvové pivo, biogenní aminy, HPLC, skladování.

## **ABSTRACT**

The presence of biogenic amines in beer is frequent. Their presence in alcoholic beverages can represent a serious risk for consumers' health. This diploma thesis was focused on the monitoring of biogenic amine content in 99 samples of alcoholic bottled beer produced and available in the commercial network in the Czech Republic. The biogenic amine content was determined by the means of HPLC with precolumn derivatization by dansylchloride. The detection was realized immediately after the purchase of the samples and at the end of the shelf life. Biogenic amines were detected for all tested beers except for one sample. The total amount of these substances in the analyzed beers achieved the maximal value of 316.8 mg/l. No histamine was determined in beer samples. In majority of cases of tested beers (97%) during refrigerated storage the increase of total amounts of biogenic amines were occurred. The biogenic amine content in the samples of beer at the end of shelf life can achieve the values which could cause the health complications of some individuals.

Keywords: bottled beer, biogenic amines, HPLC, storage

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce Ing. Heleně Velichové, Ph.D za odborné vedení, rady a připomínky, které mi usnadnily vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům laboratoře analýzy potravin v budově U3 při Ústavu technologie a mikrobiologie potravin, především Ing. Ludmile Zálešákové, za rady a pomoc v laboratořích.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 VÝROBA PIVA.....</b>	<b>12</b>
1.1 SUROVINY PRO VÝROBU PIVA.....	12
1.1.1 Voda.....	12
1.1.2 Sladovnický ječmen.....	12
1.1.3 Chmel.....	13
1.1.4 Pivovarské kvasinky.....	15
1.2 VÝROBA SLADU .....	16
1.2.1 Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene .....	17
1.2.2 Máčení ječmene .....	17
1.2.3 Klíčení ječmene .....	18
1.2.4 Hvozdnění zeleného sladu .....	19
1.2.5 Odkličování, skladování a expedice hotového sladu .....	20
1.3 VÝROBA PIVA .....	20
1.3.1 Výroba mladiny .....	20
1.3.1.1 Šrotování sladu .....	21
1.3.1.2 Vystírání a rmutování .....	21
1.3.1.3 Scezování sladiny a vyslazování mláta .....	21
1.3.1.4 Chmelovar.....	22
1.3.1.5 Chlazení mladiny a odlučování kalů .....	22
1.3.2 Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva .....	23
1.3.3 Dokvašování a zrání piva .....	24
1.3.4 Závěrečné úpravy piva .....	24
1.4 ROZDĚLENÍ PIV .....	25
<b>2 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VÝSKYT V PIVU.....</b>	<b>27</b>
2.1 CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI BIOGENNÍCH AMINŮ .....	27
2.2 PŮSOBNÍ BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÝ ORGANIZMUS .....	28
2.3 MIKROORGANIZMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU .....	29
2.4 BIOGENNÍ AMINY V PIVU A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJICH VÝSKYT .....	29
2.4.1 Biogenní aminy v surovinách používaných pro výrobu piva .....	31
2.4.2 Vývoj obsahu biogenních aminů v pivu během výrobního procesu a skladování.....	33
2.5 BIOGENNÍ AMINY V OSTATNÍCH NÁPOJÍCH A POTRAVINÁCH .....	35
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
<b>3 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>39</b>



4.1	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	39
4.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ PIV PRO STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	42
4.3	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
5.1	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ V LEHKÝCH A VÝČEPNÍCH PIVECH.....	44
5.2	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ V LEŽÁCÍCH.....	49
5.3	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE SPECIÁLNÍCH A OCHUCENÝCH PIVECH.....	55
5.4	DISKUZE.....	59
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>76</b>

## ÚVOD

Pivo se v České republice těší velké oblibě a z alkoholických nápojů je u nás nejvíce konzumováno. Pivovarnictví má u nás dlouholetou tradici. Piva „českého“ typu jsou známa a oblíbena po celém světě. Výroba piva patří k nejvíce zakořeněným a zároveň u nás kvalitně vyráběným komoditám, exportovaným do mnoha zemí po celém světě.

V současnosti je při výrobě potravin a nápojů kladen značný důraz na jejich kvalitu a zdravotní nezávadnost. Mezi možná rizika lze zařadit kontaminaci potravin a nápojů, ke které může dojít během technologického procesu výroby, nebo přítomnost nežádoucích látek, které mohou mít mnohdy toxické účinky na lidský organizmus. Mezi takové látky se řadí i biogenní aminy, které vznikají v potravinách a nápojích působením některých mikroorganismů.

Diplomová práce pojednává o obsahu biogenních aminů v lahvových pivech zakoupených v obchodní síti v ČR. V teoretické části jsou popisovány suroviny pro výrobu piva a samotná výroba sladu a piva a rovněž rozdělení piv. Dále je teoretická část věnována charakteristice a vlastnostem biogenních aminů, jejich výskytu v pivu a surovinách používaných pro výrobu piva a působení biogenních aminů na lidský organizmus.

V praktické části bylo provedeno stanovení obsahu 8 biogenních aminů u 99 vzorků lahvových piv zakoupených v běžné obchodní síti v ČR. U výše zmíněných piv byla sledována změna množství biogenních aminů po zakoupení a následně během skladování a uplynutí doby použitelnosti.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 VÝROBA PIVA

Pivo je polydisperzní soustavou různých sloučenin. Lze ho charakterizovat jako slabě alkoholický nápoj vzniklý řízeným kvašením cukerného roztoku povařeného s chmelem. Chemické složení piva se může měnit v závislosti na obsahu extraktivních látek před kvašením (tzv. extraktu původní mladiny) a stupni prokvašení. Mezi základní znaky piva lze zařadit zlatavou barvu, charakteristickou hořkou chuť a po nalití do sklenice tvorbu kompaktní pěny [1 - 4].

### 1.1 Suroviny pro výrobu piva

Pivo se vyrábí z obilných sladů, vody a chmele za účasti mikroorganismů (pivovarských kvasinek). Někdy se k výrobě mohou používat chmelové výrobky (výtažky), případně náhražky sladu [1, 2, 4, 5].

#### 1.1.1 Voda

Ve sladařství a pivovarnictví je voda důležitou surovinou přímo ovlivňující kvalitu piva. Podle technologického postupu a vyspělosti technického zařízení se spotřebuje na výrobu 1 tuny sladu 10 až 15 hl vody a na 1 hl vystaveného piva 12 až 15 hl vody. Voda pro výrobu piva musí splňovat normu pro pitnou vodu a neměla by obsahovat alkalické uhličitany, chlor a větší množství iontů železa, manganu a dusičnanů [2, 5, 6].

Z pivovarského hlediska je důležité, že některé ionty obsažené ve vodě (především ionty vápníku a částečně i hořčíku) svými reakcemi s fosforečnany sladu způsobují snížení pH a tak působí pozitivně na činnost enzymů při rmutování. Na druhé straně hydrogenuhličitanové a uhličitánové ionty zvyšují pH a negativně ovlivňují varní proces. Pro výrobu světlých piv je vhodná měkká voda s menším podílem hořčíku a přechodné tvrdosti. Pro tmavá piva nevádí i tvrdší voda [1, 5].

#### 1.1.2 Sladovnický ječmen

Pro výrobu sladu lze využít více druhů obilí, prakticky se však používá pouze sladovnický ječmen. V zahraničí se v malé míře pro výrobu pšeničných piv sladuje i pšenice. V České republice se prakticky výhradně vyrábí několik druhů ječných sladů, z nichž převažuje výroba světlého sladu plzeňského typu [1, 7].

Ječmen (*Hordeum*) se pěstuje ve dvou formách – jako jarní, sloužící převážně jako ječmen sladovnický, a také jako ozimý pěstovaný pro jiné potravinářské účely (např. pro výrobu krup

nebo müsli). Jarní forma se 70–80% zastoupením osevních ploch v současnosti převažuje [8]. Pro výrobu sladu a sladových výtažků se na našem území pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého ječmene (*Hordeum vulgare* var. *nutans*). V menší míře se v ČR pěstují i některé ozimé ječmeny a šestiřadé ječmeny, které jsou však více rozšířeny ve světě. Většina odrůd pěstovaných v ČR a také mnohé zahraniční odrůdy mají genetický základ z odrůd pocházejících z oblasti Hané [1, 8].

Pro účely sladařského průmyslu se využívá ječné zrnko (obilka), které se skládá z obalových částí (pluch a plušek), zárodku (klíčku, embrya) a z endospermu, který zaujímá největší část obilky. Sladovnický ječmen je využíván pro svůj obsah škrobu a jeho možné štěpení na jednodušší zkvasitelné cukry. Hlavním zdrojem zásobních sacharidů, bílkovin a dalších složek, nutných při vytváření charakteristických vlastností sladu, je endosperm. Ze zárodku pak při klíčení vycházejí podněty k aktivaci enzymů. U sladovnického ječmene se posuzují kromě pěstitelských vlastností (tj. výnosu, náročnosti a odolnosti) zejména vlastnosti sladařské (chemické složení a vhodnost pro výrobu sladu). Mezi vlastnosti uplatňující se v technologii výroby sladu lze zařadit zejména klíčivost, objemovou hmotnost, podíl zrn nad sítím 2,5 mm a také odrůdovou čistotu a homogenitu. Velmi důležitý je minimální podíl cizích a biologicky poškozených zrn (např. plesnivých zrn nebo zrn se zahnědlými špičkami, která mohou být původci samovolného přepěňování piva, tzv. gushingu) [5, 7, 9].

Ječmen není schopen klíčit ihned po sklizni, po dobu několika týdnů po sklizni nastává jeho dormancie. Během této doby dochází v zrně k odbourání možných přítomných inhibitorů klíčení a současně k aktivaci stimulatorů klíčení. Jedná se o oxidační procesy, proto je důležitý přístup kyslíku k zrně, které se z tohoto důvodu musí pravidelně provětrávat. Dormancii lze snížit i dalšími fyzikálně chemickými zákroky (např. horkovzdušným sušením ječmene, máčením ve vodě syčené kyslíkem) [7].

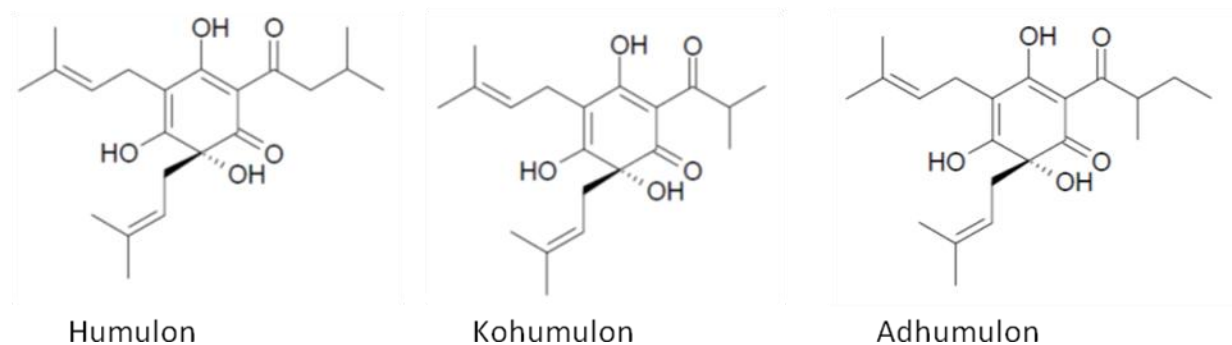
### 1.1.3 Chmel

K základním surovinám pro výrobu piva se řadí chmel. Jedná se o usušené chmelové hlávky samičích rostlin chmele otáčivého (*Humulus lupulus* var. *europaeus*) z čeledi konopovitých (*Cannabaceae*). Chmelové hlávky se skládají ze stopky, věténka, pravých a krycích listenů. Na vnitřní straně listenů se v době zrání chmele uvolňují pryskyřičná zrna lupulinu obsahující pivovarsky nejcennější složky chmele, pryskyřice a silice [4, 10].

Dle tržních hledisek jsou rozlišovány odrůdy jemné (aromatické), hořké, vysokoobsažné a ostatní. Pěstitelsky se chmely dělí na červeňáky a zeleňáky. Hlávky obou typů jsou světle zelené. Dle vegetační doby se rozeznává chmel raný, poloraný a pozdní [11].

Jakost chmele je ovlivněna především množstvím pivovarsky cenných látek, jako jsou chmelové pryskyřice, polyfenolové látky a silice. Chmelové pryskyřice jsou původcem hořké chuti. Chmelové polyfenoly se uplatňují v průběhu technologie při srážení vysokomolekulárních bílkovin a chmelové silice vytváří charakteristické chmelové aroma. Nutný je nízký obsah cizorodých látek a dusičnanů jako přirozené složky [technologie sci.muni]. V současné době se mohou při výrobě piva přidávat i chemicky modifikované hořké látky [2, 4, 12].

K nejdůležitějším složkám chmele a chmelových výrobků lze zařadit původce hořké chuti piva, chmelové pryskyřice. Tvoří je několik chemicky podobných látek. Nejúčinnější z nich je skupina  $\alpha$ -hořkých kyselin (humulon, kohumulon, adhumulon, obr. 1). Další skupinou jsou  $\beta$ -hořké kyseliny (lupulon, kolupulon, adlupulon), jež mají menší účinek než  $\alpha$ -hořké kyseliny [1, 6, 13].



Obr. 1. Příklad  $\alpha$ -hořkých kyselin vyskytujících se v rostlině chmele [12].

Chmelová silice je směs uhlovodíků, kyslíkatých sloučenin a v nepatrném množství sirných sloučenin terpenové řady. Uděluje chmelu charakteristickou vůni a tvoří se v konečných fázích zrání rostliny. Chmel obsahuje 0,5 – 3 % hm. silic. Při chmelovaru větší část silic vytéká a do piva přechází pouze malé množství, a proto je dávkování aromatických chmelů zařazeno před koncem chmelovaru. Hlavní součástí evropských odrůd chmele, tvořících až 90% chmelové silice, jsou čtyři složky myrcen, karyofylen, humulon a farnesen [1, 6].

#### 1.1.4 Pivovarské kvasinky

Pivovarská výroba se zakládá na využití kvasinek. Použití kvasnic k výrobě piva je možné i v podobě spontánně kvašených piv s ne zcela přesně definovanou mikroflórou, která často kromě kvasinek zahrnuje i bakterie. Čisté kultury kvasinek našly uplatnění zejména v pivovarské velkovýrobě, kde s rostoucí výrobou bylo zapotřebí zajistit její standardnost [14].

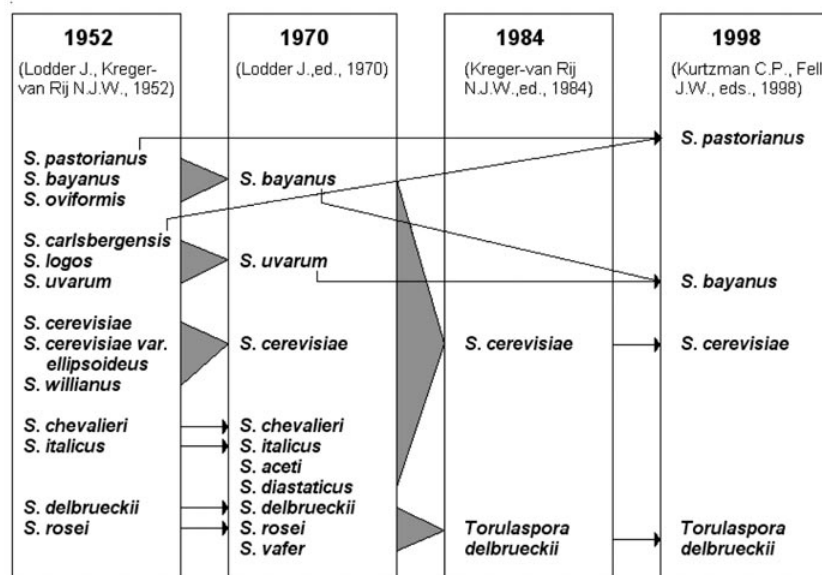
Použití čistých kultur pivovarských kvasinek bylo v pivovarství zavedeno až v 80. letech 19. století [15]. Pivovarské kvasinky nepředstavují taxonomickou, ale pouze technologickou skupinu kvasinek. Taxonomicky jsou pivovarské kvasinky v rámci komplexu *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces* v úzkém slova smyslu) řazeny do dvou druhů – *Saccharomyces cerevisiae* (tzv. svrchní pivovarské kvasinky) a *Saccharomyces pastorianus* (spodní pivovarské kvasinky). Spodní pivovarské kvasinky mají hybridní původ, bylo zjištěno, že obsahují genetický materiál pocházející ze svrchních pivovarských kvasinek [14, 15].

Genetické druhové rozdíly mezi pivovarskými kvasinkami se rovněž odráží v jejich technologických vlastnostech a ve výrobním použití. Spodní pivovarské kvasinky se používají při výrobě piva typu ležáků s kvašením při teplotě 7 – 15 °C. Na konci hlavního kvašení sedimentují na dno kvasné nádoby. Svrchní pivovarské kvasinky slouží pro výrobu piv pšeničného typu s optimální teplotou kvašení 18 – 22 °C. Na konci hlavního kvašení jsou svrchní kvasinky vytvořeným oxidem uhličitým vynášeny do tzv. kvasničné deky na hladinu mladého piva. Svrchní kvasinky vytváří dále bohatší spektrum sensoricky aktivních látek a snadněji sporulují [1, 15].

Od zavedení čistých kultur v pivovarství dánským mikrobiologem Emilem Christianem Hansenem v 80. letech 19. století prošla klasifikace pivovarských kvasinek velkými změnami. Spodní pivovarské kvasinky byly postupně řazeny do různých druhů a poddruhů – *S. pastorianus*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. monacensis*, *S. uvarum*, *S. uvarum* subsp. *carlsbergensis* apod. První systém kvasinek, založený na buněčné morfologii a schopnosti zkvašovat monosacharidy, byl sestaven v roce 1912. Spodní pivovarské kvasinky byly tehdy klasifikovány jako *S. carlsbergensis*, svrchní jako *S. cerevisiae*. Další změny v reklasifikaci pivovarských kvasinek nastaly v letech 1950, 1970, 1984 a s vývojem metod molekulární biologie i v roce 1998 (obr. 2) [14, 15].

V současné době jsou do komplexu *Saccharomyces sensu stricto* řazeny jak spodní pivovarské kvasinky, označované dříve jako *S. uvarum*, tak i svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevi-*

*siae*. Kvasinky *S. cerevisiae* byly tedy spolu s vinařskými, lihovarskými a pekařskými kvasinkami sloučeny do jediného druhu. Spodní pivovarské kvasinky se nyní označují jako *S. pastorianus* a svrchní jako *S. cerevisiae*. Oba druhy lze od sebe navzájem spolehlivě odlišit pouze metodami analýzy nukleových kyselin [14, 15].



Obr. 2. Některé taxonomické změny technologicky významných kvasinek [14].

Během technologického procesu výroby piva podléhají kvasinky řadě stresových faktorů, mezi které lze zařadit i osmotický tlak mladiny. Bylo zjištěno, že kvašení v 16° a 20° mladině vedlo ke zpomalení buněčného dělení a k prodloužení doby kvašení oproti kvašení v 12° mladině. Při opakovaném nasazení kvasinek docházelo k prohloubení tohoto efektu. Vitalita kvasinek se s rostoucí osmolaritou mladiny rovněž snížila. Působení stresových faktorů kvasinek může mít vliv i na sensorický profil piva. U piva vyráběného při vyšší osmolaritě byla zjištěna zvýšená koncentrace diacetylu a pentandionu a nižší koncentrace acetaldehydu [15].

## 1.2 Výroba sladu

Účelem sladování je vyrobit řízeným klíčením ječmene slad, v němž budou obsaženy potřebné enzymy, aromatické a barevné látky nezbytné pro výrobu mladiny a následně určeného druhu piva. Slad se vyrábí naklíčením a hvozdením sladovnického ječmene ve sladovnách. Hlavními produkty jsou světlé, tmavé a speciální slady. Ze sladu se však vyrábí i sladové výtažky používané v různých potravinářských výrobcích, v textilním průmyslu a ve farmacii [2, 4, 7, 16].



Slad se vyrábí z ječmene po čtyř- až pětítýdenním dozrání v silech. Nejprve se ječmen předčistí, poté se namáčí ve zvláštních nádobách (náduvnících). Vyklíčený ječmen se následně suší (hvozdí) na hvozdu. Teplota sušení se volí podle typu vyráběného sladu [5].

### 1.2.1 Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene

Před začátkem výroby sladu je nutné zbavit ječmen nečistot, příměsí a prachu a rozdělit jej dle velikosti zrna [1]. Ječmen je dodáván do sladoven ihned po sklizni. Z každé dodané partie ječmene se odebírá přesně stanovené množství vzorků a je podrobena analýze. Kromě hmotnosti se kontrolují i ostatní předepsané znaky, tj. obsah vody, bílkovin, zlomků nečistot, podíl zrna nad sítím 2,5 mm, napadení škůdci či mikrobiální kontaminace ječmene [7]. Mechanicky poškozené obilky se mohou pokrývat myceliem skladištních hub a tvořit ložiska samozahřívání. Samozáhřev pak končí naprostým rozkladem skladovaného zrna [6].

Kritická vlhkost zrna při skladování je 14 %. Překročením této hodnoty se do chodu uvedou biochemické reakce, jejichž výsledkem je zvýšená produkce oxidu uhličitého, vody a tepla [6].

Čerstvě sklizený ječmen se nachází v období tzv. dormance, což znamená, že není schopen rychle vyklíčit. Způsobuje to zvýšený obsah inhibitorů klíčení (dorminů), které jsou přítomny především v obalových částech zrna. Postupným odbouráváním dorminů oxidací, se začnou v zrně vytvářet stimulatory klíčení gibbereliny a zrno je schopné vyklíčit. Tento proces je sice možné urychlit, ale z hygienických a ekologických důvodů se dává přednost přirozenému odležení [2, 6, 16, 17].

### 1.2.2 Máčení ječmene

Cílem máčení je zvýšit obsahy vody v ječném zrně z 12 – 15 % na 42 – 48 % v závislosti na typu sladu (pro světlé slady obsah vody kolem 42 %, pro tmavé spíše 48 %). Zvýšeným obsahem vody se v obilce aktivují enzymy a zahájí se klíčení. Dosažený obsah vody v namočeném zrně se nazývá stupeň domočení a liší se podle druhu vyráběného sladu [1, 6]. Dalším důvodem máčení je i odstranění splavků a lehkých nečistot, umytí zrna a zejména vyloužení nežádoucích látek (barevné a hořké látky, kyselina křemičitá a bílkoviny z pluch). Tyto látky zhoršují sensorické vlastnosti piva a podporují tvorbu zákalů [1, 2, 6, 7].

Existuje několik způsobů máčení, ale u všech je vždy první máčecí voda, obsahující také dezinfekční prostředky, značně znečištěna, rychle se z ní vyčerpává kyslík a musí být proto brzy

vyměněna. Nejběžnějším způsobem je máčení s provzdušňovacími přestávkami, kdy se máčecí voda podle teploty a množství vzdušnění 1 – 3 krát vyměňuje. Mezi každým napouštěním se dělá přestávka 4 – 6 hodin, aby se zrno dobře provzdušnilo. Celková doba máčení se pohybuje od 60 do 90 hodin, nejčastěji pak 72 hodin. Celkové ztráty při máčení by neměly překročit 3 % hmotnosti namáčeného ječmene [1, 4, 6, 7, 16].

### 1.2.3 Klíčení ječmene

Cílem sladařského klíčení ječmene je aktivace enzymového systému zrna, syntéza dalších enzymů, docílení požadované vnitřní přeměny (tzv. rozluštění) zrna při omezené vegetaci. Řízení klíčení, neboli vedení hromad, se liší podle druhu vyráběného sladu, technického vybavení sladovny a kvality zpracovávaného ječmene. Klíčení sladovnického ječmene klasickým způsobem probíhá na humnech, což jsou prostorné místnosti s hladkými podlahami a účinným větráním. V současné době se ke klíčení ječmene používají také pneumatické posuvné hromady. Charakteristická stádia klíčení jsou nazývána jako mokrá hromada, suchá hromada, pukavka, mladík, vyrovnaná a sejmutá hromada [1, 7, 16]

Z hlediska technologie patří mezi nejvýznamnější enzymy klíčení fosfatázy, cytázy, proteázy a hlavně amylázy. S výjimkou  $\alpha$ -amylázy jsou ostatní enzymy v malém množství v ječmeni již přítomny. Fosfatázy odštěpují kyselinu fosforečnou ve formě solí, čímž se v zrně vytváří slabě kyselá reakce potřebná pro optimální průběh klíčení a aktivaci enzymů. Cytázy jako komplex enzymů štěpí neškrobové polysacharidy celulózu a hemicelulózu na jednoduché pentosany. Cytázy způsobují při klíčení rozluštění zrna a mají vliv na křehkost a kvalitu sladu [2, 6, 7]. Proteázy při klíčení štěpí bílkoviny na jednodušší složky (peptidy, oligopeptidy až na aminokyseliny). Štěpení bílkovin je důležité pro jakost a trvanlivost piva [6, 18].

Největší význam při zpracování sladu rmutováním mají amylázy, neboť štěpí škrob na zkvasitelnou formu. Čím déle se hromada vede při nízké teplotě, tím větší je aktivace a tvorba amyláz.  $\beta$ -amyláza je již v ječmeni v malé míře obsažena,  $\alpha$ -amyláza při klíčení teprve vzniká [7].

Konečným produktem klíčení je zelený slad, který má mít zdravou vůni, mírně zavadlé kořínky, správně vyvinutou střílku a má být dobře rozluštěn. Podle vývinu střílky rozlišujeme tzv. krátké slady (délka střílky je 1/3 až 1/2 délky zrna), obvykle nedoluštěné a dlouhé slady (střílka nad 3/4 délky zrna), které jsou vhodné pro výrobu tmavých sladů [2, 4, 5, 7, 16].

Při klíčení dochází k trojnásobnému až šestinásobnému zvýšení obsahu riboflavinu a také zdvojnásobení úrovně niacinu. Většina vitaminů je však zničena během následujícího procesu hvozdnění [1, 6, 7].

#### 1.2.4 Hvozdnění zeleného sladu

Hvozdnění je závěrečnou fází výroby sladu. Cílem hvozdnění je zastavit vegetační pochody, snížit obsah vody, redukovat část enzymové aktivity, vytvořit chuťové, barevné a oxidoredukční látky, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy sladu a piv. Snížením obsahu vody během hvozdnění se stává slad skladovatelným a stabilním. Zelený slad je na hvozdně nejprve předsušen při teplotách do 60 °C, následně pak vyhřát a dotažen při teplotách od 80 do 105 °C [1, 2, 4, 6].

Technologie hvozdnění je upravována podle druhu vyráběného sladu, podle obsahu vody v zeleném sladu a podle typu hvozdu. Po skončení procesu hvozdnění dochází k odstranění kořínků zvaných sladový květ. Ten má vysoký obsah biologicky významných látek a je vyhledávanou surovinou v krmivářství i ve fermentačních technologiích [7].

Při skladování je třeba vytvořit takové podmínky, aby slad přijal malé množství vody nutné k tzv. technologickému odležení, ovšem aby nezvlhl (kritická hranice je 5 % vlhkosti). Pro expedici se slad balí do jutových pytlů nebo je volně ložen přímo do dopravních prostředků určených pro potraviny [6].

Převážnou část výroby tvoří světlé slady plzeňského, vídeňského a dortmundského typu. Český (plzeňský) slad se vyrábí z ječmene se středním obsahem bílkovin (do 11 %) a vlhkostí zrna 42 – 45 %. Hlavní zásadou při výrobě tohoto sladu je omezení nadměrného vzniku barevných a aromatických sloučenin a maximální uchování enzymové aktivity a křehkosti sladu. Je to krátký slad, který se nejprve hvozdní 2 x 12 hodin při teplotě 40 – 50 °C a posledních 5 hodin se volí dotahovací teplota 80 °C. Slad je vhodný pro výrobu světlých piv typu ležáků, konzumních piv a speciálních piv s různou koncentrací původní mladiny [1, 5, 6].

Slad vídeňský je podobný českému, dotahovací teplota je však vyšší (85 – 95 °C). Vídeňský slad má 2x vyšší hodnotu barvy než světlý plzeňský slad a je přechodem mezi světlými a tmavými slady. Slady dortmundského typu jsou určeny pro výrobu světlých piv z tvrdé dortmundské vody. Jsou vhodná pro piva vysoko prokvašená s vyšší stupňovitostí [1].

Hojně vyráběný je i slad bavorský (mnichovský), který je určen pro výrobu tmavých piv. Jedná se o slad dlouhý s obsahem bílkovin 12 % a vyšším a vlhkostí 46 – 48 %. Hvozdí se 2 x 24 hodin s dotahovací teplotou 105 °C [1, 7].

Slady speciální se používají k výrobě tmavých nebo speciálních piv. Od běžných světlých a tmavých sladů se liší především enzymovou aktivitou, kyselostí, barvou a vůní. Jejich přidáním k běžným sladům lze ovlivnit sensorické vlastnosti piva, zejména chuť, barvu, aroma a pěnivost. Do této skupiny patří slad karamelový, barevný, diastatický, nakuřovaný nebo lihovarský [1, 6, 7].

### **1.2.5 Odkličování, skladování a expedice hotového sladu**

Na hvozdění navazuje odkličování sladu, při němž se slad zbaví klíčků, poškozených zrn a prachu, současně se dochladí a poté se uskladní do sladových sil, ojedinele na sladové půdy, kde se ponechá 4 – 6 týdnů odležet (dozrát). Před expedicí se zpravidla činí ještě jeden, především marketingový krok, kdy je slad pulírován neboli leštěn na leštičkách [2, 6].

## **1.3 Výroba piva**

Technologii výroby piva lze rozdělit na tři hlavní technologické procesy:

1. výroba mladiny ze sladu, chmele a vody, popř. za použití surogátů (náhražek sladu),
2. kvašení mladiny a dokvašování mladého piva pivovarskými kvasinkami,
3. závěrečné úpravy a stáčení zralého piva do transportních nádob či obalů.

Mladina se ve světě vyrábí dvěma odlišnými způsoby. V západních zemích převládá jednormutový infuzní způsob bez povaření rmutu, v ČR a v řadě evropských zemí je rozšířen vícermutový dekokční způsob s povařováním rmutů [6, 7].

### **1.3.1 Výroba mladiny**

Cílem přípravy mladiny je převést do roztoku extraktivní látky sladu a chmele a zajistit tak dostatek živin pro metabolismus kvasinek a úměrnou hořkost finálního výrobku [1, 13]. Výroba mladiny sestává z následujících technologických operací: šrotování sladu (příp. surogátů), vystírání sladového šrotu do vody, rmutování, scezování sladiny a vyslazování sladového mláta, chmelovar a závěrečné úpravy mladiny [1, 2, 4, 7].

### **1.3.1.1 Šrotování sladu**

Šrotování sladu je mechanický proces, jehož úkolem je rozdrtit sladová zrna a zpřístupnit endosperm pro štěpné procesy ve varně a zachovat celistvost pluch, které slouží jako přirozená filtrační vrstva při scezování [1]. Šrotování se musí přizpůsobit kvalitě sladu a technickému vybavení varny. Čím méně je slad rozluštěn, tím jemněji se musí šrotovat [7]. Při nadměrném rozdrčení se vyluhují do roztoku nežádoucí látky z pluch, které ovlivňují nepříznivě chuť, barvu a koloidní stabilitu piva. Naopak při nedostatečném rozdrčení endospermu se snižuje výtěžek extraktu [19].

Šrotování může probíhat za sucha, za mokra nebo šrotování s navlhčením pluch. Ke šrotování za sucha se používají válce. Pro šrotování za mokra se slad namáčí po dobu 50 – 70 sekund v namáčecí šachtě při teplotě vody 50 – 70 °C. Slad se poté šrotuje na dvouválcovém zařízení a mokrý šrot putuje rovnou do rmutovací pánve. Zvlhčením pluch se zvyšuje jejich pevnost, což je základní filtrační vrstva u scezování sladiny. Vlhčí se vodou o teplotě 30 °C pomocí trysek těsně před mletím s dobou výdrže asi 2 minuty [6].

### **1.3.1.2 Vystírání a rmutování**

Cílem vystírání je dokonalé smíchání sladového šrotu s nálevem vody. Rmutování má za cíl převedení žádoucích složek extraktu varních surovin do roztoku. Rmutováním dochází k mnoha enzymovým reakcím, včetně zcukření škrobu. Tyto pochody probíhají většinou při teplotách optimálních pro činnost enzymů, jež způsobují rozštěpení a převedení požadovaného podílu surovin do roztoku [6, 7].

Šrot se smísí s vodou, stanoví se teplota vystírky a její hustota, která má odpovídat vyráběnému typu piva. Při výrobě světlých piv se volí řidší vystírka, při výrobě tmavých piv hustší. Celková doba vystírání je 10 – 30 minut. Rmutování navazuje plynule na vystírání a slouží k přípravě sladiny s požadovanou extraktovou skladbou. Toho se dosahuje postupným zahříváním části vystírky na rmutovací teploty optimální pro činnost jednotlivých skupin enzymů [1, 6].

### **1.3.1.3 Scezování sladiny a vyslazování mláta**

Scezování je proces oddělení sladového extraktu (sladiny) od pevného podílu zcukřeného rmutu, tzv. mláta. Provádí se většinou ve scezovací kádi, kdy se mláto po určité době usazuje

na dno. Přes vrstvu mláta protéká sladina, která se takto zároveň čistí. Zfiltrovaný podíl extraktu sladu se označuje jako předek [5, 7].

Následuje získání extraktu zachyceného v mlátě horkou vodou, které se nazývá vyslazování. Získané vodní výluhy, výstřelky, po spojení s předkem dávají celkový objem sladiny pohromadě. Cílem scezování je získat čistou sladinu a maximum extraktu, který do procesu přinesly suroviny. Proces vyslazování se opakuje tak dlouho, dokud není dosaženo požadované stupňovitosti výstřelků, obvykle 1%. Poslední výstřelky, tzv. patoky, se většinou vedou do odpadu. Zbylé mláto se z kádě vyhrne a dopraví do zásobníku mláta. Odtud se pak distribuuje zemědělským podnikům jako krmivo [1, 2, 4, 5].

#### **1.3.1.4 Chmelovar**

Vaření sladiny s chmelem, tzv. chmelovar, má za cíl zkoncentrování mladiny, sterilaci mladiny, koagulaci vysokomolekulárních látek a převod hořkých chmelových látek do roztoku. Výsledným produktem chmelovaru je mladina. Ta je ve srovnání s výchozí sladinou koncentrovanější (řádově se odpaří 5 – 10 % vody), obsahuje nižší počet mikroorganismů a neobsahuje žádné aktivní enzymy [2, 20].

Při vaření sladiny s chmelem probíhá řada fyzikálních, chemických a biochemických reakcí, za spolupůsobení vlivu mechanického pohybu, jejichž výsledek se promítá ve složení mladiny a ovlivňuje další průběh technologie a vlastnosti piva [1].

Celková doba chmelovaru se pohybuje od 90 do 120 minut. Chmel se přidává nejčastěji ve formě chmelových granulátů či extraktů. Výsledná mladina musí svým složením odpovídat vyráběnému pivu, tzn. že při výrobě např. 10° světlého piva musí obsahovat 10 % hm. extrahovaných látek. Dalším možným postupem je výroba piva s vyšší extraktivností, které se následně dořeďuje na požadovanou extraktivnost. Mladina obsahuje kromě vody také sacharidické složky, dusíkaté látky, chmelové a minerální látky, polyfenoly a vitaminy [1, 7].

#### **1.3.1.5 Chlazení mladiny a odlučování kalů**

Vyrobená mladina se musí před zakvašením ochladit z teploty blízké bodu varu na zákvasnou teplotu. Ta je při klasickém kvašení 4 – 7 °C, u zrychlených postupů 10 – 15 °C a u svrchního kvašení 12 – 18 °C. Z technologického hlediska je důležité, aby se mladina při chlazení zároveň provzdušnila a vyloučily se z ní jemné a hrubé kaly, které by mohly způsobovat pro-

blémy při kvašení. Zchlazená mladina se nakonec provzdušní sterilním vzduchem, aby měly kvasinky v průběhu hlavního kvašení dostatečné množství kyslíku [1, 5, 7].

### 1.3.2 Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva

Zchlazená mladina, zbavená kalů je ve výrobním procesu meziproduktem, který se zpracovává na pivo kvašením. Piva vyráběná v ČR a také většina piv zahraničních se vyrábí spodním kvašením. Svrchně kvašená piva se vyrábí ve Velké Británii pod označením „ale“, „porter“ nebo „stout“. V ČR se lze se svrchně kvašeným pivem setkat např. v podobě piva pšeničného [3, 6, 7].

Pro kvašení mladiny se původně používal zákvas z předchozí várky. V současné době se pod pojmem pivovarské kvasinky rozumí 2 druhy kvasinek, jež se vzájemně liší svými vlastnostmi a to se také odráží v jejich technologickém použití. Svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kvasí při teplotách v rozsahu 15 – 23 °C a používají se zejména na výrobu pšeničných piv. Po ukončení kvašení jsou vznikajícím oxidem uhličitým vynášeny na hladinu, kde tvoří tzv. deku. Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces pastorianus* slouží k výrobě piv plzeňského typu. Teploty kvašení se pohybují mezi 6 – 12 °C a po ukončení kvašení sedimentují na dno kvasných nádob [5, 7, 14].

Hlavní kvašení probíhá obvykle v otevřených kvasných kádích spodními pivovarskými kvasinkami. Cílem kvašení je řízená přeměna zkvasitelných sacharidů glukózy, maltózy a maltotriózy na etanol a oxid uhličitý za současného vytvoření organoleptických vlastností piva. Tento proces je možné zjednodušeně popsat základní sumární rovnicí:



Zároveň se v malé míře tvoří i vedlejší kvasné produkty, které mají taktéž vliv na chuťový charakter piva [6, 7, 21].

V kádích umístěných v chlazených prostorech zvaných spilka lze pozorovat několik stádií hlavního kvašení. První fází se říká zaprašování, kdy se po 12 až 24 hodinách začne na povrchu mladiny objevovat první bílá pěna vyvolaná unikajícím CO<sub>2</sub>, která je transportována od stěn kádě k jejímu středu (tzv. odrážení). Mírně klesá hodnota pH a extraktu, mírně stoupá teplota. Druhým stadiem hlavního kvašení je tvorba nízkých bílých kroužků, které se začínají objevovat přibližně 36 hodin po naplnění kádě. Tento proces trvá dva až tři dny, kdy se tvoří charakteristické růžice pěny smetanové barvy. Klesá hodnota pH a extraktu, stoupá teplota. Stadium vysokých hnědých kroužků je obdobím nejintenzivnější činnosti kvasinek, kdy jsou

vysrážené kaly vynášeny na povrch kroužků, které barví pěnu dohněda. Klesá hodnota pH a extraktu, stoupá teplota, musí se začít včas chladit. Posledním stadiem je tzv. propadání deky, kdy se výrazně snižuje intenzita kvašení. Kroužky se propadají, ale tzv. deka se musí včas sebrat. Mladé pivo je zralé k sudování do ležáckého sklepa. Tímto stadiem je proces hlavního kvašení ukončen [1 - 3, 6, 21].

Na dno kvasné kádě současně sedimentují spodní kvasinky, které se po stáhnutí piva sbírají, propírají studenou vodou a znovu nasazují do provozu [1, 6].

### 1.3.3 Dokvašování a zrání piva

Při dokvašování a zrání piva tradičním postupem probíhá řada změn původního složení mladého sudovaného piva a to v závislosti na teplotě, hradícím tlaku, době dokvašování a zrání piva [1 - 3, 6, 21].

Dokvašování a zrání mladého piva probíhá v ležáckém sklepě, kde při pozvolně klesajících teplotách až na 1 – 3 °C pivo pozvolna dokvasí, číří se, zraje a sytí vznikajícím oxidem uhličitým. Číření piva během dokvašování a zrání závisí na teplotě a na množství kalických částic, které jsou součástí chladového zákalu a sedají na dno ležáckých nádob společně s mrtvými kvasinkami, strhávajícími další podíl vysokomolekulárních polyfenolových a dusíkatých látek [1, 6, 7].

Během dokvašování a zrání piva dochází k přeměně látek, upravuje se nepříjemná hořkost a kvasničná chuť mladého piva a vytváří se typický buket a chuť zralého piva. Mění se obsah rozpuštěných látek i těkavých složek piva a to v závislosti na použitých surovinách, technologii a na kmenu kvasinek použitých při výrobě piva [1 - 3, 21].

### 1.3.4 Závěrečné úpravy piva

Při filtraci dokvašeného piva se mají odstranit kalící látky a má se docílit požadované čirosti a zvýšení biologické a koloidní trvanlivosti. Čirost a vysoká kvalita výrobku jsou základní vlastnosti požadované spotřebiteli při zachování ostatních znaků kvality piva. Filtrace piva se nejčastěji provádí na křemelinových a deskových celulózových filtrech různé konstrukce. Nejmodernějším a stále více se rozšiřujícím způsobem jsou membránové filtrace, které jsou ovšem nákladnější [6, 7].

Dalším důležitým krokem je docílení požadované biologické stability piva jeho pasterací. Provádí se zejména v lahvích či v plechovkách v ponorných, deskových nebo tunelových pas-



terech při teplotě 62 °C po dobu 20 – 30 minut. Jestliže je biologická stabilita zvyšována pomocí filtrace, používají se zpravidla membránové separační postupy [1, 7].

U exportních piv, kdy je nezbytné zaručit mnohaměsíční trvanlivost, se provádí stabilizace založená na principu odstranění prekurzorů zákalů piva, především vysokomolekulárních dusíkatých látek, polyfenolů, dusíkatých iontů a rozpuštěného kyslíku [6].

Konečnou fází výroby je stáčení piva do transportních a spotřebitelských obalů. Aby neutrpěla kvalita piva, je při stáčení nutné zamezit ztrátám oxidu uhličitého a styku piva s kyslíkem. Z tohoto důvodu se v moderních linkách stáčí pivo pod tlakem oxidu uhličitého do obalů přeplněných oxidem uhličitým nebo směsí oxidu uhličitého s dusíkem [6, 7].

## 1.4 Rozdělení piv

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích (v platném znění) se pivem rozumí pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, který vedle kvasným procesem vzniklého alkoholu a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu [22].

Piva se dle výše zmíněné vyhlášky [22] rozdělují na:

- spodně nebo svrchně kvašené – vyrobené za použití kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a případně i spontánní mikroflóry mléčných nebo octových bakterií,
- světlé pivo – vyrobené převážně ze světlých sladů,
- tmavé a polotmavé pivo – vyrobené z tmavých sladů, sladů karamelových, případně barevných sladů ve směsi se světlými,
- řezané pivo – vyrobené při stáčení smíšením světlých a tmavých piv stejné skupiny,
- lehké pivo – vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny do 7 % hmotnostních a s obsahem využitelné energie nejvýše 130 kJ/100 ml,
- výčepní pivo – vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 8 – 10 % hm.,
- ležák – pivo vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 11 – 12 % hm.,

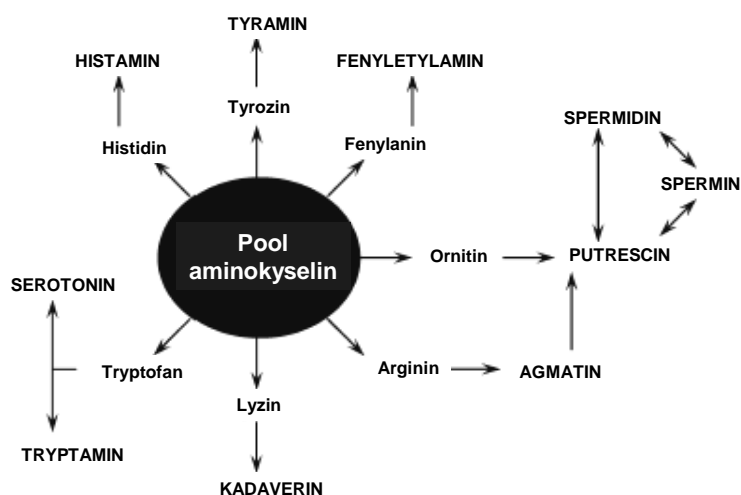
- speciální pivo – vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 13 % hm. a vyšším,
- porter – tmavé pivo vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 18 % hm. a vyšším,
- pšeničné pivo – vyrobené s podílem extraktu z použitého pšeničného sladu vyšším než jedna třetina hmotnosti celkově dodaného extraktu,
- kvasnicové pivo – vyrobené dodatečným přídatkem podílu rozkvašené mladiny do hotového piva v průběhu stáčení,
- ochucené pivo – vyrobené s přídatkem látek určených k aromatizaci a potravních doplňků.

## 2 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VÝSKYT V PIVU

### 2.1 Charakteristika a vlastnosti biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární zásadité sloučeniny odvozené od aminokyselin. Jsou významnými sloučeninami, které se vyskytují v živých organizmech a které vykazují biologickou aktivitu. Biogenní aminy se nacházejí také v potravinách a nápojích, kde vznikají činností některých mikroorganismů, které mají aktivní enzymy dekarboxylázy odštěpující z aminokyselin COOH skupinu. Podle chemické struktury lze z potravinářského hlediska nejvýznamnější biogenní aminy rozdělit na alifatické (putrescin, kadaverin), aromatické (tyramin, fenyletylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin) a polyaminy (putrescin, kadaverin, agmatin, spermin, spermidin) [23, 24].

Základní podmínkou vzniku biogenních aminů je přítomnost aminokyselin (nebo látek, ze kterých mohou aminokyseliny vznikat) v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů vybavených příslušnými enzymy a vhodné podmínky pro růst a množení těchto mikroorganismů. Proces vzniku biogenních aminů je katalyzován mikrobiálními dekarboxylázami a tvorba těchto látek postupuje od proteinů přes peptidy k aminokyselinám, jejichž dekarboxylací vznikají (obr. 3) [25].



Obr. 3. Tvorba biogenních aminů z aminokyselin. Upraveno podle [26].

Biogenní aminy mohou oxidativní deaminací poskytovat aldehydy. Za zvýšené teploty mohou reagovat s mastnými kyselinami za vzniku amidů mastných kyselin. S proteiny reagují za

vzniku derivátů kyseliny diaminopropionové. Biogenní aminy mohou být také dále přeměňovány na prekurzory alkaloidů, a to zejména v rostlinných materiálech [23].

## 2.2 Působení biogenních aminů na lidský organizmus

Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, např. polyaminy ovlivňují syntézu proteinů, stabilizují membrány nebo plní neurofyzikální funkce, kdy se účastní přenosu nervového vzruchu na synapsích. Mohou také působit jako vnitrobuněční poslové. Rovnováha koncentrace biogenních aminů v buňkách je dána nejen jejich biosyntézou a degradací, ale také různými formami příjmu a exkrece [25, 27 - 29].

Jsou-li biogenní aminy přijímány ve vysokých dávkách, mohou se u některých jedinců projevat jejich toxické účinky na nervový a vaskulární systém. Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vazomotorní aminy působí přímo nebo nepřímo na vaskulární (cévní) systém [24, 25, 30]. Mezi příznaky konzumace vysokých dávek biogenních aminů lze zařadit zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenzi nebo hypertenzi a migrény [24]. Schopnost detoxikace biogenních aminů v lidském organismu je individuální, rozdílná u různých jedinců a je ovlivněna několika faktory. Normální příjem biogenních aminů je metabolizován účinným detoxikačním systémem ve střevech. Tento systém je založen na aktivitě enzymů monoaminoxidáz (MAO), diaminoxidáz (DAO) a histidinmetyltransferáz (HMT) [27, 30]. Při vysokém dietárním příjmu biogenních aminů však tento enzymový systém již není schopen eliminovat biogenní aminy zcela. Mezi rizikové skupiny patří zejména děti, alergici, lidé užívající inhibitory monoaminoxidáz (např. antidepressiva nebo antiparkinsonika). Odbourávání biogenních aminů (zejména polyaminů) je také negativně ovlivňováno současným příjmem alkoholu, kdy vznikající acetaldehyd inhibuje funkci enzymů degradujících biogenní aminy [27, 31].

Při hodnocení toxického účinku je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatních faktorů, jakými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. Z tohoto důvodu je velmi obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů. Jednotlivé BA mohou tyto nežádoucí účinky vyvolávat přímo (např. histamin nebo tyramin) anebo jsou schopny inhibovat detoxikační enzymatický systém (např. putrescin nebo kadaverin) [27, 28].

### 2.3 Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou

Schopnost dekarboxylace aminokyselin byla zjištěna u mikroorganismů s příslušnými enzymy (histidin-, lyzin-, arginin-, ornitin-, tryptofan- nebo tyrozindekarboxylázou). Velmi častými producenty biogenních aminů jsou bakterie mléčného kvašení (např. zástupci rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus* a další) [32 - 35]. Mezi dekarboxyláza pozitivní bakterie se řadí mnohé rody a druhy čeledi *Enterobacteriaceae* [36 - 38] nebo zástupci rodů *Pseudomonas* [39], *Clostridium*, *Bacillus* [25] a mnohé další.

Méně často, pravděpodobně v důsledku přítomnosti deaminačních mechanismů, je popisována produkce biogenních aminů u kvasinek a plísní. Bylo zjištěno, že některé kmeny *Saccharomyces cerevisiae* mohou produkovat biogenní aminy [40, 41]. Produkce biogenních aminů, zejména agmatinu, fenyletylaminu a kadaverinu, byla rovněž zjištěna u některých kvasinek účastnících se fermentace vína [41].

Schopnost produkovat biogenní aminy není vlastnost typická pro daný druh, spíše specifická pro určité kmeny, takže různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v produkci biogenních aminů [32, 33, 42, 43].

Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory. Mezi vnější faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl a dalších látek (např. etanol, oxid siřičitý aj.) [34, 36, 42 - 48].

### 2.4 Biogenní aminy v pivu a faktory ovlivňující jejich výskyt

Sledování výskytu biogenních aminů v potravinách a nápojích je významné z hlediska toxikologického i technologického. Údaje o výskytu biogenních aminů napomáhají sledovat bezpečnost a kvalitu potravin a nápojů a mohou rovněž poukazovat na hygienu výrobních provozů. V případě zvýšeného výskytu biogenních aminů v potravinách a nápojích je důležité, zda se jedná o fermentované produkty. Fermentované potraviny a nápoje, kam se řadí i pivo, mohou často obsahovat biogenní aminy jako přirozenou složku [25, 28 - 30, 49]. Toto tvrzení lze zdůvodnit tím, že procesu výroby fermentovaných potravin se účastní řada mikroorganismů, a proto je zde větší pravděpodobnost, že mnohé z nich budou syntetizovat dekarboxylázové

enzymy. Proto lze také ve fermentovaných potravinách očekávat vyšší výskyt biogenních aminů než v potravinách nefermentovaných [25, 50]. Obsah biogenních aminů v určitých potravinách a nápojích může značně kolísat, někdy až v rozmezí několika řádů. Obvyklé obsahy biogenních aminů v potravinách se pohybují řádově v jednotkách až desítkách miligramů na kilogram (litr), hodnoty ve stovkách mg/kg (mg/l) bývají pokládány za vysoké [24].

Konzumace piva může být považována za potenciální zdravotní riziko pro spotřebitele z důvodu přísunu biogenních aminů do organismu. Vysoký příjem BA není zpravidla způsoben přítomností BA ve vysokých koncentracích v jednotlivých pivech, ale spíše značnou konzumací piva v krátkém intervalu. Ze zdravotního hlediska je třeba přítomnosti BA v pivech věnovat významnou pozornost, protože přítomný etanol může inhibovat aktivitu enzymů odbourávajících BA (zejména MAO) [51, 52].

Výskyt biogenních aminů v pivech může být ovlivněn kvalitou použitých surovin, technologií výroby a rovněž mikrobiální kontaminací během výrobního procesu nebo během skladování [52 - 54]. Z tohoto důvodu lze aminy vyskytující se v pivu rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje putrescin, agmatin, spermin a spermidin, které jsou považovány za běžnou složku piva pocházející primárně ze sladu nebo dalších surovin využívaných při výrobě piva. Do druhé skupiny bývá řazen histamin, tyramin a kadaverin, které zpravidla ukazují na aktivitu kontaminující mikroflóry (zejména bakteriemi mléčného kvašení) během výroby [53].

Množství biogenních aminů v pivech kolísá podobně jako v ostatních potravinách. Hlavním aminem vyskytujícím se v pivu, který má nežádoucí fyziologický efekt na organismus, je tyramin. Obsah histaminu v pivu je nižší a má pravděpodobně i nižší toxikologický dopad na jedince. Nebyla rovněž zjištěna signifikantní korelace mezi detekovaným množstvím tyraminu a histaminu a množstvím alkoholu v pivu. Podobná množství BA byla zjištěna v alkoholických i nealkoholických pivech, což znamená, že proces výroby nealkoholických piv není prevencí výskytu BA v pivech. Naproti tomu byl zjištěn vyšší výskyt biogenních aminů v pivech s nižším pH, což ukazuje na aktivitu bakterií mléčného kvašení. Zvýšené množství BA lze očekávat u piva kontaminovaného mléčnými bakteriemi během výroby, při nedostatečné eliminaci bakterií při filtraci a jejich nedostatečné inaktivaci při pasteraci [51- 53, 55 - 57].

Obsah biogenních aminů v pivech analyzovaných v České republice a v ostatních zemích, včetně několika evropských států, Kuby, Brazílie nebo Číny, je shrnut v následující tabulce.

Tabulka 1: Obsah biogenních aminů (mg/l) v pivech, upraveno podle [52, 58, 59]

<b>Biogenní amin</b>	<b>Česká piva</b>	<b>Piva mimo ČR</b>
Tyramin	<0,5 - 12,7	<0,3 - 67,5
Histamin	<0,5 - 1,2	<0,3 - 21,6
Putrescin	<0,5 - 11,5	<0,2 - 30,7
Kadaverin	<0,5 - 14,7	<0,2 - 49,1
Tryptamin	<0,5 - 2,8	<0,3 - 10,1
Fenyletylamin	-	<0,2 - 8,3
Agmatin	-	0,5 - 46,8
Spermidin	-	<0,2 - 6,8
Spermin	-	<0,2 - 4,0

- stanovení přítomnosti BA neprovedeno

Vyšší množství tyraminu a histaminu bylo zjištěno v belgických pivech vyrobených spontánní fermentací nebo svrchním kvašením. Tato piva lze považovat za nejrizikovější pro pacienty užívající farmaka inhibující MAO [53, 60]. Vyšší obsah aminů se může vyskytovat také u některých piv, při jejichž výrobě byla použita pšenice, neboť mléčné bakterie jsou součástí jejich fermentační mikroflóry [53, 61, 62]. Naproti tomu v nigerijských zázvorových pivech a pivech vyrobených z čiroku, kukuřice nebo banánů byly zjištěny velmi nízké hodnoty BA nepřekračující hodnotu 0,5 mg/l [63].

#### 2.4.1 Biogenní aminy v surovinách používaných pro výrobu piva

V pitné vodě používané pro výrobu piva nebyl dosud popsán výskyt biogenních aminů [54]. V chmelu nebo chmelovém granulátu byla zjištěna přítomnost histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, agmatinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu v množství do 24 mg/kg [58, 64]. V chmelovém extraktu byly tyto hodnoty několikanásobně vyšší (histamin 53 mg/kg a tyramin cca 230 mg/kg) [58]. V ječmeni používaném pro přípravu sladu byly detekovány následující biogenní aminy: tyramin, putrescin, agmatin, spermin a spermidin, a to v množství do 16 mg/kg, přičemž putrescin a spermidin se vyskytovaly ve vyšších množstvích než ostatní BA [64]. Kromě biogenních aminů se v ječmeni mohou vyskytovat také protoalkaloidy, což jsou deriváty nebo prekurzory některých aminokyselin, biogenních aminů a hormonů. Jako příklad lze uvést např. hordein jako derivát tyraminu a derivát tryptofanu gramin, jehož neúplným rozkladem může vznikat dimetylamin [23].

Při výrobě sladu dochází k aktivaci enzymů ječmenného zrna a také se mění poměr jednotlivých složek zrna. V případě sledování výskytu biogenních aminů hraje významnou roli zejména štěpení bílkovin na látky s nižší molekulovou hmotností, případně až na volné aminokyseliny, které mohou sloužit jako prekurzory biogenních aminů [1, 6, 23]. Tomuto faktu

lze přičíst i vyšší výskyt biogenních aminů ve sladu než v ječmeni, v některých případech až o jeden řád. Ve sladu byly detekovány následující biogenní aminy: histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, agmatin, fenyletylamin, tryptamin, spermin a spermidin v množství od 1,5 do 270 mg/kg [58, 61, 64]. Izquierdo-Pulido a kol. [64] zjistili postupný nárůst obsahu biogenních aminů během 5 denního procesu výroby sladu, oproti výskytu BA v ječmenném zru byl tento nárůst u některých BA až trojnásobný. Obsah biogenních aminů se také odlišoval u sladů vyrobených z různých odrůd ječmene a sladů plzeňského (světlého) a bavorského (tmavého) [61]. Kromě již zmíněných faktorů mohou mít na konečnou úroveň výskytu BA ve sladu vliv také technologické podmínky, např. intenzita klíčení, teplota sušení nebo typ hvozdu [53, 61, 65]. V pozdějších fázích výroby sladu mohou se vzniklými biogenními aminy tvořit konjugáty volné mastné kyseliny [23]. Množství aminů klesá během rmutování a část je posléze odstraněna spolu s mlátem [52, 65].

Výsledky studií týkající se obsahu a schopnosti produkce biogenních aminů pivovarskými kvasinkami se do určité míry rozcházejí. Izquierdo-Pulido a kol. [66] uvádějí, že spodní pivovarské kvasinky nemají schopnost produkce histaminu a tyraminu a opakované používání kvasinek nemá vliv na tvorbu těchto BA. Naproti tomu podle Kalače a kol. [58] a Halász a kol. [61] mohou pivovarské kvasinky obsahovat nebo dokonce produkovat biogenní aminy (putrescin, kadaverin, agmatin, histamin, tyramin, spermin a spermidin) a opakované použití kvasinek může množství některých BA zvyšovat. Toto zvýšení tyto autoři vysvětlují autolýzou kvasinkových buněk. Nicméně kvasinky mají schopnost produkovat určité množství putrescinu, sperminu a spermidinu jako běžných produktů a meziproduktů jejich metabolismu [52].

Výskyt biogenních aminů v surovinách používaných pro výrobu piva shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Výskyt biogenních aminů (mg/kg) v surovinách používaných pro výrobu piva (upraveno podle [58, 61, 64]).

Biogenní amin	Surovina					
	Chmel	Ch. granul.	Ch. extrakt	Ječmen	Slad	Kvasinky
Histamin	5,5-6,9	3,5-8,2	53	-	2,7-66	2,1-12
Tyramin	12-15	9,5-13	228,0	81-189	15-208	17-24
Putrescin	14-24	20-21	5,4	76-210	38-846	2,1-69
Kadaverin	2,4-7,8	0,7-7,3	7,5	5,0-11	2,6-77	12-81
Agmatin	5	-	-	-	23-310	48
Spermidin	18	-	-	105-274	45-618	189
Spermin	15	-	-	63-195	22-192	56
Fenyletylamin	12	-	-	-	1,8-2,2	-
Tryptamin	ND	ND	ND	-	ND-3,5	4,3-17

ND - biogenní amin nedetekován; - stanovení přítomnosti BA neprovedeno.



Pokud se srovná množství biogenních aminů v surovinách používaných pro výrobu piva tak lze konstatovat, že se sice BA mohou vyskytovat v kvasinkách a ve chmelu (popř. chmelovém extraktu) ve vyšší míře, nicméně z důvodu jejich malého obsahu v pivu lze za hlavní surovinový zdroj BA v pivu považovat slad [52, 53].

#### 2.4.2 Vývoj obsahu biogenních aminů v pivu během výrobního procesu a skladování

Aminy, které bývají přítomny v pivu v nejvyšších koncentracích a které jsou zároveň nejvýznamnější z toxikologického hlediska (tyramin, histamin a kadaverin), se vytvářejí zpravidla během hlavní fermentace [52, 54, 65]. Biogenní aminy v pivu mohou během fermentace vznikat působením dekarboxyláz nebo dalšími biochemickými reakcemi, které probíhají při kvašení a dokvašování. Během těchto dějů se mění obsah CO<sub>2</sub>, pH a vznikají další látky, se kterými mohou BA vstupovat do dalších reakcí. Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces pastorianus* (viz kapitola 1.1.4) pravděpodobně nemají během fermentace piva schopnost produkovat tyramin a histamin a podobné vlastnosti lze očekávat i u divokých kmenů kvasinek [52, 53].

Zvýšené množství biogenních aminů v pivu lze dát do souvislosti s metabolickou aktivitou kontaminující mikroflóry a nižší úrovní hygieny. Grampozitivní bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou zodpovědné především za produkci tyraminu a histaminu, zatímco gramnegativní bakterie (např. *Enterobacter* sp. nebo *Escherichia coli*) mají schopnost produkce kadaverinu a putrescinu [52, 65]. Pro rychlé posouzení schopnosti kontaminujících BMK (zejména laktobacilů a pediokoků) růst v pivu (a potenciálně i produkovat BA) lze využít kultivační médium obsahující chmelový extrakt, protože některé komponenty extraktu mohou potlačovat růst těchto nežádoucích bakterií [67].

Za jedny z hlavních producentů tyraminu v pivu byly označeny bakterie rodu *Pediococcus* (*Pediococcus* spp. a *P. damnosus*). Počet bakterií může mít vliv na výsledné množství tyraminu v pivu. Jestliže byl počet pediokoků v pivu nižší než  $4 \cdot 10^3$  CFU/ml, tak množství BA bylo zanedbatelné, zatímco při počtu bakterií vyšším než  $10^5$  CFU/ml bylo vyprodukováno 15-25 mg tyraminu/l [66]. Množství tyraminu bylo v korelaci s intenzitou kontaminace pediokoky, a tak Izquierdo-Pulido a kol. [69] navrhli, že obsah tyraminu v pivu může být vhodným indikátorem velikosti kontaminace *Pediococcus* spp. během kvašení piva. Halász a kol. [61] dospěli k jiným výsledkům a zjistili, že koncentrace histaminu ve fermentované mladině nesouvisí s počtem zaočkovaných laktobacilů. Různé kmeny BMK se liší schopností produkovat BA [32, 33, 42, 43] a rovněž schopností produkovat BA za různých podmínek. Těmito

vlastnostmi lze vysvětlit rozdíly v obsahu tyraminu a histaminu mezi jednotlivými pivovary a také mezi jednotlivými várkami piva v témže pivovaru [52, 53].

Prekurzorem tyraminu je aminokyselina tyrozin. Nebyl však pozorován vztah mezi obsahem volného tyrozinu v mladině a množstvím tyraminu vzniklého během fermentace 54 piv. Obsah této aminokyseliny pravděpodobně není kritickým faktorem pro tvorbu tyraminu v pivu, protože tyrozin je pravděpodobně využíván i pivovarskými kvasinkami [69].

Jako vhodná metoda pro eliminaci kontaminujících pediokoků a zároveň pro redukci tyraminu ve finálním produktu se jeví promytí pivovarských kvasnic kyselinou fosforečnou [68].

Biogenní aminy se mohou díky dekarboxylázové aktivitě BMK tvořit rovněž během skladování pasterovaných, nedostatečně pasterovaných nebo kontaminovaných piv v lahvích, plechovkách nebo sudech [52, 68]. Na výskyt biogenních aminů během skladování piva má vliv pasterační zákrok nebo jiné způsoby ošetření a dále také teplota a doba skladování [58, 70, 76].

Během skladování piva jsou laktobacily schopny produkovat větší množství BA než pediokoky [76]. Mezi laktobacily kontaminující pivo se schopností produkovat biogenní aminy lze zařadit např. *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum* aj. [52, 53, 71]. Pasterace zpravidla devitalizuje BMK kontaminující pivo, protože během 8 denního skladování piv (temno, 21 °C) od 3 výrobců nedošlo k výraznějšímu nárůstu BA [76]. Podobně i u filtrovaného piva nebyl zjištěn výraznější nárůst obsahu BA během skladování [72, 73]. V jiné studii byl zjištěn nárůst tyraminu a histaminu u piv skladovaných po dobu 6 týdnů, ke zvýšení těchto BA došlo pravděpodobně v důsledku nedostatečné pasterace [58]. V průběhu 8 týdenního skladování piv v temnu při teplotách mezi 6 a 23 °C postupně došlo k nárůstu celkového množství BA, množství BA se zvyšovalo se zvyšující se teplotou. Obsah tyraminu a kadaverinu se zvyšoval až do konce doby skladování (8 týdnů), zatímco u histaminu a putrescinu bylo maxima dosaženo po 6 týdnech skladování a poté došlo ke snížení jejich obsahu [70]. U speciálních typů lahvových piv skladovaných za běžných podmínek může dojít k nárůstu BA také vlivem sekundární fermentace [60].

Obsah tyraminu v pivu může být vhodným indikátorem kontaminace pediokoky během kvašení [69, 74] a obsah histaminu, který se prakticky nevyskytuje ve sladu, dobrým indikátorem hygieny procesu výroby [61]. Loret a kol. [60] navrhuje index biogenních aminů v pivu (BAI) jako poměr 6 aminů mikrobiálního původu (kadaverinu, histaminu, tyraminu, putrescinu, fenyletylaminu a tryptaminu) k agmatinu, který se vyskytuje ve sladu:

$$\frac{[\text{CAD}] + [\text{HIS}] + [\text{TYR}] + [\text{PUT}] + [\text{PHE}] + [\text{TRY}]}{1 + [\text{AGM}]}$$

Koncentrace každého biogenního aminu je vyjádřena v mg/l. Jestliže je BAI < 1, tak se jedná o velmi dobré hygienické podmínky a fermentace proběhla bez kontaminace. V případě, že BAI = 1 – 10, tak pravděpodobně došlo k mírné kontaminaci bakteriemi s dekarboxylázovou aktivitou a jestliže je BAI > 10, tak během výroby došlo k velké kontaminaci bakteriemi produkujícími BA v důsledku špatných hygienických podmínek [60].

## 2.5 Biogenní aminy v ostatních nápojích a potravinách

Nefermentované potraviny vykazují významnější nárůst obsahu aminů v souvislosti s nežádoucími procesy rozkladu bílkovinné matrice. Aminy zde především hrají roli potenciálního kritéria jakosti. Přítomnost BA však nemusí být v korelaci s růstem nežádoucích mikroorganismů, protože mnohé z nich postrádají dekarboxylázovou aktivitu [28, 51]. Pokud však tyto potraviny byly řádně zpracovány, obsahují biogenní aminy v koncentracích, které nepředstavují pro člověka zdravotní rizika [24].

Z nefermentovaných potravin živočišného původu bývá přítomnost biogenních aminů (zejména putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu) často detekována v mase a masných produktech, včetně drůbeže [37, 51, 75, 88]. Koncentrace histaminu, putrescinu a kadaverinu se většinou zvyšuje během procesu kažení masa a drůbeže, zatímco koncentrace sperminu a spermidinu se snižuje [50, 88]. Biogenní aminy, zejména histamin, bývají často detekovány také v rybách. Nebezpečí tvorby biogenních aminů se vyskytuje zejména při nedodržení chladírenského řetězce, protože pokud nejsou mořské ryby po výlovu ihned zchlazeny, pomnoží se mikroflóra dekarboxylující volný histidin na histamin [25]. V syrovém mléce bylo zjištěno malé množství polyaminů sperminu, spermidinu a putrescinu [28, 29].

Biogenní aminy se mohou vyskytovat také v potravinách rostlinného původu. V ovoci a zelenině bývá z biogenních aminů nejčastěji detekován tyramin, v menší míře pak další biogenní aminy [76, 77]. V potravinách rostlinného původu bývá obecně detekováno více spermidinu než sperminu, na rozdíl od živočišných potravin, kde je více sperminu [29].

Procesu výroby fermentovaných potravin se účastní řada mikroorganismů, a proto lze také ve fermentovaných potravinách očekávat vyšší výskyt biogenních aminů než v potravinách nefermentovaných. Na vzniku biogenních aminů se mohou podílet jak mikroorganismy pou-

žité ve starterových kulturách, tak i mikroorganismy zpracovávané suroviny [25, 51, 52]. Obsah biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích závisí na obsahu dostupných peptidů a aminokyselin v mléce a na přítomnosti dekarboxylujících mikroorganismů. Rovněž je důležitým faktorem doba zrání, koncentrace solí, pH, popř. technologický proces výroby (např. zařazení tepelného ošetření mléka) [51, 52]. Obsah BA vzrůstá také při výrobě fermentovaných salámů a masných výrobků. Tento nárůst je patrný hlavně v počátečních fázích fermentace výrobků a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů [78, 79]. Biogenní aminy bývají také často detekovány ve spontánně fermentovaných rostlinných produktech, jako je např. kysané zelí [52].

Z biogenních aminů vyskytujících se ve víně je velmi rozšířen putrescin a fenyletylamin. Mezi aminy, které se často nacházejí ve víně, patří také histamin, tyramin, kadaverin, agmatin, spermin, spermidin a sporadicky lze detekovat také tryptamin a serotonin. Aminy se tvoří ve víně během různých stádií vinifikace a jejich produkce je determinována řadou faktorů. Ke zvýšení koncentrace aminů dochází také činností mléčných bakterií [26, 51, 52].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu biogenních aminů ve vybraných lahvových pivech a zjištění změny jejich obsahu po uplynutí doby trvanlivosti.

Cílem teoretické části práce bylo:

- definovat pivo a popsat jeho výrobu,
- charakterizovat biogenní aminy a jejich výskyt v pivech,
- popsat faktory, které ovlivňují výskyt biogenních aminů v pivech.

Cílem praktické části diplomové práce bylo:

- založit skladovací pokus s cca 90 vzorky lahvovaných piv zakoupených v obchodní síti v ČR,
- stanovit obsah biogenních aminů ve vzorcích bezprostředně po nákupu a poté po uplynutí doby použitelnosti,
- na základě výsledků formulovat závěry.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Charakteristika vzorků

V diplomové práci byl stanoven obsah osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu, histaminu, sperminu a spermidinu) u 99 vzorků piv s obsahem alkoholu 3,2 – 10,5 % vyrobených ve 24 různých pivovarech (tabulka 3). Piva byla zakoupena v běžné obchodní síti a byla skladována po celou dobu experimentu (od zakoupení do konce doby použitelnosti, resp. doby minimální trvanlivosti) při teplotě  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Tabulka 3: Charakteristika analyzovaných vzorků piv.

Pivovar	Číslo vzorku	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Počet dnů skladování	Pasterace	Poznámka
A	1	světlé	výčepní	4,1	74	ano	
	2	světlé	ležák	4,6	74	ano	
	3	světlé	ležák	5,0	74	ano	
	31	polotmavé	ležák	4,6	70	ano	
B	4	světlé	výčepní	4,0	130	ano	
	5	světlé	ležák	4,7	205	ano	
	89	světlé	ležák	5,0	145	ano	
C	6	světlé	výčepní	4,2	130	ano	
	7	světlé	ležák	5,0	130	ano	
	8	světlé	výčepní	4,5	180	ano	
	9	tmavé	výčepní	3,8	180	ano	
D	10	světlé	výčepní	4,0	80	ano	
	11	světlé	ležák	4,7	244	ano	
	12	polotmavé	ležák	4,8	130	ano	
	13	tmavé	ležák	4,4	244	ano	
	86	světlé	lehké	3,2	80	ano	
	88	světlé	speciální	4,0	80	ano	snížený obsah cukru
	91	světlé	výčepní	4,1	49	ano	
92	světlé	ležák	4,8	20	ano		
E	14	světlé	ležák	5,2	195	ano	
	15	polotmavé	ležák	4,5	122	ano	
	16	světlé	lehké	3,3	100	ano	
	17	světlé	výčepní	4,2	172	ano	
	18	světlé	ležák	4,7	172	ano	
	19	světlé	ležák	6,0	73	ano	
	20	světlé	speciální	7,0	172	ano	
21	tmavé	ležák	4,5	122	ano		

Tabulka 3: Pokračování – charakteristika analyzovaných vzorků pív.

Pivovar	Číslo vzorku	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Počet dnů skladování	Pasterace	Poznámka
F	22	světlé	výčepní	4,0	170	ano	
	23	světlé	ležák	5,0	120	ano	
	26	světlé	ležák	4,5	170	ano	
	27	světlé	ležák	4,5	120	ano	
G	28	tmavé	speciální	10,5	234	ano	
	29	tmavé	ležák	4,7	193	ano	
	30	světlé	ležák	5,0	234	ano	pšeničné, kvasnicové
	52	světlé	speciální	7,5	231	ano	
H	33	světlé	speciální	6,0	117	ano	
	34	světlé	výčepní	4,1	68	ano	
	35	světlé	ležák	4,8	96	ano	
	36	světlé	výčepní	4,1	167	ano	
	37	světlé	speciální	8,0	68	ano	
I	40	světlé	výčepní	4,1	60	ano	
	41	světlé	ležák	4,8	68	ano	
	42	světlé	výčepní	3,9	35	ano	
	93	světlé	speciální	5,9	49	ano	
J	43	tmavé	ležák	5,1	190	ne	nefiltrované
	44	řezané	ležák	4,7	190	ne	nefiltrované
	45	světlé	ležák	5,0	190	ne	nefiltrované
	46	světlé	výčepní	3,8	35	ne	
	47	světlé	ležák	4,7	60	ne	
K	25	světlé	výčepní	4,6	70	ano	
	49	světlé	ležák	5,0	96	ano	
	90	světlé	speciální	6,0	120	ano	
L	51	tmavé	speciální	8,0	167	ano	
	94	světlé	ležák	4,8	49	ano	
	95	světlé	ležák	5,0	120	ano	
M	53	světlé	výčepní	4,1	60	ne	
	54	světlé	ležák	5,1	60	ne	
	55	karamelové	speciální	6,0	35	ne	
N	56	světlé	ležák	4,8	68	ano	
	57	světlé	speciální	5,7	68	ano	ochucené
	58	světlé	výčepní	4,0	60	ano	
	59	polotmavé	výčepní	4,0	60	ano	
	60	tmavé	ležák	4,5	68	ano	
	61	světlé	ležák	4,8	190	ano	
	62	světlé	ležák	4,4	68	ano	
	63	světlé	výčepní	4,0	68	ano	
	64	polotmavé	ležák	4,4	68	ano	ochucené
	65	řezané	ležák	5,5	167	ano	ochucené
66	světlé	ležák	6,3	96	ano	speciální	



Tabulka 3: Pokračování – charakteristika analyzovaných vzorků pív.

Pivovar	Číslo vzorku	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Počet dnů skladování	Pasterace	Poznámka
O	68	světlé	výčepní	4,0	46	ne	
	69	světlé	ležák	4,8	80	ne	
	96	světlé	ležák	5,2	70	ne	
	97	tmavé	speciální	5,2	49	ne	
	98	světlé	speciální	5,6	70	ne	
	99	světlé	speciální	6,5	185	ne	
P	24	světlé	výčepní	4,2	193	ano	
	70	světlé	výčepní	4,0	175	ano	
	71	světlé	výčepní	4,1	175	ano	
	72	světlé	ležák	4,7	175	ano	
	73	světlé	ležák	5,0	152	ano	
	87	světlé	ležák	4,4	152	ano	
R	74	světlé	výčepní	4,0	216	ano	
	75	světlé	ležák	4,6	216	ano	
	76	světlé	ležák	4,8	175	ano	
	77	tmavé	výčepní	3,8	152	ano	
S	78	světlé	výčepní	4,0	104	ano	
	79	světlé	ležák	5,0	104	ano	
	80	světlé	ležák	6,5	152	ano	speciální
	81	polotmavé	ležák	5,5	152	ano	speciální s bylinami
	82	tmavé	ležák	4,5	152	ano	
T	83	světlé	výčepní	4,0	152	ano	
	84	světlé	ležák	5,0	152	ano	
	85	světlé	výčepní	3,8	175	ano	
U	38	světlé	ležák	5,0	231	ano	
	39	světlé	výčepní	4,0	96	ano	
X*	32	světlé	ležák	4,7	64	ano	
	48	světlé	ležák	4,5	231	ano	bezlepkové
	50	světlé	výčepní	3,5	60	ano	
	67	světlé	výčepní	3,5	60	ano	

\* Vzorky z různých pivovarů (každý vzorek z jiného pivovaru).

Aby mohl být sledován výskyt biogenních aminů v pivech během skladování, byly vždy od každého vzorku vždy zakoupeny 2 kusy stejné šarže. Jeden kus každého piva byl analyzován ihned po zakoupení a druhý po uplynutí doby použitelnosti.

## 4.2 Příprava vzorků piv pro stanovení biogenních aminů

Pivo bylo otevřeno a opatrně nalito do kádinky. Poté byla nakalibrovaným pH-metrem (pHSpear, Eutech Instrument, USA) změřena hodnota pH. Promíchaný vzorek piva byl nalit do Erlenmeyerovy baňky a na třepače míchán do odpěnění. Takto připravené vzorky byly použity pro derivatizaci.

Byly odebrány 2 ml vzorku, v poměru 1:1 zředěny 0,6 M kyselinou chloristou (Sigma-Aldrich, USA) a dobře promíchány na vortexu. 1 ml takto zředěného vzorku byl nalit do derivatizační nádobky (každý vzorek byl připraven ve 3 paralelních stanoveních). Okyselená směs byla podrobena derivatizaci podle Dadáková a kol. [80]. Do každého vzorku bylo přidáno 100  $\mu$ l 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l a 1,5 ml uhličitanového pufru. Pufir o pH 9,2 byl přichystán smícháním 50 ml roztoku A (0,5 M  $\text{NaHCO}_3$ ; Merck, SRN) a 12 ml roztoku B (0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Merck). Následně bylo v pufru rozpuštěno 16,65 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (Merck) a výsledné pH upraveno na 11,00-11,10. Dále byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Sigma-Aldrich). Takto připravené vzorky byly dobře uzavřeny a míchány na třepače v temnu 20 hodin.

Následně bylo do každého vzorku přidáno 200  $\mu$ l roztoku prolínu (200 mg v 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich) a znovu byly uzavřeny a míchány na třepače další hodinu. Poté byly přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich), uzavřeny a tři minuty dobře třepány ručně. Z každého vzorku byl do připravené vialky odpipetován 1 ml heptanové vrstvy, který se následně nechal odpařit do sucha při teplotě 60  $^\circ\text{C}$  pod proudem dusíku a tento suchý odparek byl zředěn v 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Takto připravený vzorek byl uchováván do doby analýzy v mrazícím zařízení při teplotě -18  $^\circ\text{C}$ .

Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu\text{m}$  a poté dávkovány do chromatografického systému.

## 4.3 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Derivatizované vzorky byly filtrovány (porozita 0,22  $\mu\text{m}$ ) a nanášeny na kolonu (kolona Cogent HPS C18 s rozměry 150 x 4,6 mm a velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ , Cogent USA; termostat kolon Agilent 1260 Infinity, UV/VIS DAD detektor Agilent 1200, Agilent Technologies, USA; binární pumpa a autosampler LabAlliance, USA) s UV detekcí ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) po předkolonové derivatizaci danzylchloridem. Podmínky separace a detekce sledovaných BA byly nastaveny

podle Smělá a kol. [81]. Separace byla provedena gradientovou elucí, kdy v 0 – 1. minutě byl poměr H<sub>2</sub>O : acetonitril 35:65, do 10. minuty se gradient acetonitrilu plynule zvyšoval až na poměr H<sub>2</sub>O : acetonitril 20:80. Mezi 10. a 12. minutou byl poměr H<sub>2</sub>O : acetonitril 20-10:80-90, poté se do 16. minuty zvyšoval ve prospěch acetonitrilu až na poměr H<sub>2</sub>O : acetonitril 10-0 :90-100. Mezi 16. až 23. minutou probíhala eluce v mobilní fázi tvořené pouze acetonitrilem.

Každý ze vzorků piv byl derivatizován třikrát a každá derivatizovaná směs nanesena na kolonu ve dvojím opakování (n = 6). Výsledné chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu Clarity a kalibračních křivek získaných analýzou směsí standardů.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V diplomové práci byl sledován výskyt osmi biogenních aminů u 99 vzorků pív, které byly zakoupeny v České republice. Obsah jednotlivých biogenních aminů byl pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie zjišťován ihned po zakoupení piva a po uplynutí doby použitelnosti piva. V tomto období (20 – 244 dnů) byla piva skladována při teplotě  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ . Před každou analýzou bylo rovněž provedeno měření pH piva.

### 5.1 Obsah biogenních aminů v lehkých a výčepních pivech

Obsah biogenních aminů byl zjišťován ve 33 různých lehkých a výčepních pivech. V každém z analyzovaných pív této skupiny byla zjištěna přítomnost biogenních aminů (tabulka 4), přičemž celkové množství BA kolísalo od 4,8 mg/l až po 224,3 mg/l. U všech vzorků pív této skupiny byl zjištěn vyšší obsah biogenních aminů na konci skladování (po uplynutí doby použitelnosti).

Po zakoupení pív se celkový obsah BA pohyboval v rozmezí 4,8 – 139,8 mg/l (tabulka 4). Pouze u 1 lehkého piva byl na počátku experimentu zjištěn celkový obsah BA nižší než 10 mg/l (vzorek 86), u 27 pív bylo na počátku detekováno celkové množství BA 10 – 50 mg/l. U zbývajících 5 vzorků byl obsah vyšší než 50 mg/l (vzorky 1, 17, 34, 58 a 63), přičemž u vzorku 17 bylo dokonce zjištěno celkové množství BA  $> 100$  mg/l.

Tabulka 4: Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) v lehkých a výčepních pivech.

Číslo vzorku	Σ biogenní aminy		Číslo vzorku	Σ biogenní aminy		Číslo vzorku	Σ biogenní aminy	
	Počátek	Konec		Počátek	Konec		Počátek	Konec
<b>1</b>	98,3	108,3	<b>34</b>	95,4	115,1	<b>67</b>	43,5	67,4
<b>4</b>	11,6	20,2	<b>36</b>	38,9	92,6	<b>68</b>	34,2	51,1
<b>6</b>	16,0	30,0	<b>39</b>	29,9	49,7	<b>70</b>	13,3	27,2
<b>8</b>	18,4	52,5	<b>40</b>	20,2	35,6	<b>71</b>	15,1	27,5
<b>9</b>	12,7	51,1	<b>42</b>	24,2	35,0	<b>74</b>	18,0	98,4
<b>10</b>	17,3	33,3	<b>46</b>	23,0	48,7	<b>77</b>	10,5	47,9
<b>16</b>	48,6	93,2	<b>50</b>	14,9	20,7	<b>78</b>	24,4	40,7
<b>17</b>	139,8	224,3	<b>53</b>	15,4	30,1	<b>83</b>	15,5	54,0
<b>22</b>	14,0	84,3	<b>58</b>	50,3	74,7	<b>85</b>	14,2	19,6
<b>24</b>	13,8	32,6	<b>59</b>	42,7	74,0	<b>86</b>	4,8	5,0
<b>25</b>	15,7	33,5	<b>63</b>	52,6	70,3	<b>91</b>	10,5	33,3

Po uplynutí doby použitelnosti bylo u lehkých a výčepních piv detekováno celkové množství biogenních aminů v rozmezí 5,0 – 224,3 mg/l. Po této době byl celkový obsah BA < 10 mg/l zjištěn pouze u vzorku 86, obsah biogenních aminů v rozmezí 10 – 50 mg/l u 17 piv, BA v rozmezí 50 – 100 mg/l u 12 piv, 100 – 200 mg/l u 2 piv (vzorky 1 a 34). U vzorku 17 bylo toto množství překročeno (224,3 mg/l). Během skladování piv se u některých vzorků celkové množství BA zvýšilo jen mírně (např. vzorky 8, 22 a 86), u mnohých se však téměř zdvojnásobilo (vzorky 4, 6, 10, 17, 46, 70, 71) nebo ztrojnásobilo (vzorky 8, 83). K největšímu nárůstu obsahu biogenních aminů během skladování došlo u vzorků 9, 74 (více než 4 násobné zvýšení) a u vzorku 22 (více než 5ti násobné zvýšení ze 14 mg/l na 84,3 mg/l)

U žádného ze 33 vzorků lehkých a výčepních piv nebyl detekován histamin a fenyletylamin. Podobně i tryptamin se u této skupiny piv prakticky nevyskytoval, byl zjištěn pouze u 1 vzorku piva (59 – polotmavé výčepní pivo) po skladování v množství cca 5 mg/l (tabulka 5).

Kadaverin byl detekován u 13 lehkých a výčepních piv (vzorky 1, 17, 25, 34, 36, 39, 40, 42, 58, 59, 63, 67 a 68). U 4 piv (25, 39, 40, 42) bylo v době zakoupení množství kadaverinu nižší než 10 mg/l, u 7 piv se pohybovalo v rozmezí 10 – 50 mg/l a pouze u 2 piv (vzorky 17 a 34) bylo na počátku skladování lahvových výčepních a lehkých piv množství kadaverinu vyšší než 50 mg/l. U většiny piv došlo během skladování pouze k mírnému nárůstu obsahu kadaverinu (tabulka 5), výjimkou byly 3 vzorky piv (17, 36 a 39), kde se množství kadaverinu zvýšilo téměř o polovinu a pivo č. 67 s téměř dvojnásobným zvýšením kadaverinu během skladování. Po uplynutí doby použitelnosti se množství kadaverinu u těchto piv pohybovalo v rozmezí 1,2 – 83,6 mg/l, přičemž více než 50 mg/l kadaverinu bylo zjištěno u 3 piv (vzorky 1, 17 a 34).

S výjimkou vzorků 86 a 91 byl putrescin detekován u všech vzorků lehkých a výčepních piv. Na počátku pokusu bylo u většiny těchto piv detekováno < 10 mg/l putrescinu (celkem 22 vzorků; tabulka 5), u zbývajících 9 piv bylo toto množství v rozmezí 10 – 20 mg/l, přičemž nejvyšší detekované množství putrescinu bylo u vzorku 17 ( $18,4 \pm 1,6$  mg/l). Během skladování došlo u většiny těchto piv k nárůstu obsahu putrescinu, po uplynutí doby použitelnosti bylo u této skupiny piv zjištěno 7,7 – 74,6 mg/l putrescinu. Pouze u 13 vzorků (1, 25, 34, 40, 50, 53, 58, 63, 67, 68, 70, 71 a 85) došlo během skladování k mírnému nárůstu (nebo poklesu vzorky 67 a 85) obsahu putrescinu. U ostatních vzorků piv se toto množství zvýšilo i několikanásobně, např. u vzorku 9 byl zjištěn nárůst z 5,4 mg/l na 29,0 mg/l, u vzorku 17 z 18,4 mg/l na 74,6 mg/l a u vzorku 22 z 8,5 mg/l na 52,6 mg/l. Největší nárůst putrescinu byl zjištěn u vzorku 70, kde se jeho množství během skladování zvýšilo cca 7x.

Tabulka 5: Obsah biogenních aminů (mg/l) v lehkých a výčepních pivech.

Číslo vzorku	Tryptamin*		Putrescin*		Kadaverin*		Tyramin*		Spermidin*		Spermin*	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
1	ND**	ND	9,3±0,5	9,8±0,9	47,5±1,8	50,7±2,3	37,0±2,4	38,5±5,6	3,1±0,1	3,1±0,4	1,4±0,2	6,2±0,4
4	ND	ND	7,2±0,6	15,7±0,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,4±0,3	4,5±0,6
6	ND	ND	8,5±0,7	19,8±1,7	ND	ND	3,1±0,2	4,3±0,4	2,2±0,2	ND	2,2±0,2	5,9±0,7
8	ND	ND	10,1±0,8	29,1±3,5	ND	ND	1,1±0,1	ND	3,3±0,2	6,4±0,3	3,9±0,3	17,0±1,6
9	ND	ND	5,4±0,6	29,0±2,2	ND	ND	4,4±0,2	4,2±0,4	1,9±0,1	3,5±0,3	1,0±0,1	14,4±0,4
10	ND	ND	3,9±0,2	8,6±0,9	ND	ND	5,8±0,6	5,1±0,5	3,8±0,2	7,1±0,5	3,8±0,2	12,5±0,8
16	ND	ND	13,7±1,2	17,4±1,8	ND	ND	31,8±2,5	73,0±3,4	2,6±0,2	2,4±0,2	0,4±0,0	0,5±0,0
17	ND	ND	18,4±1,6	74,6±5,0	50,3±2,9	83,6±4,0	66,4±1,7	56,3±4,7	4,2±0,1	9,3±0,6	0,6±0,0	0,5±0,0
22	ND	ND	8,5±0,8	52,6±4,0	ND	ND	1,3±0,1	16,9±0,9	4,3±0,1	7,8±0,7	ND	6,9±0,8
24	ND	ND	5,7±0,6	13,7±0,8	ND	ND	0,9±0,1	7,5±0,8	2,1±0,2	4,0±0,4	5,0±0,3	7,5±0,7
25	ND	ND	6,5±0,7	8,2±0,9	1,4±0,1	2,1±0,2	1,6±0,2	15,4±1,1	6,2±0,8	7,9±0,8	ND	ND
34	ND	ND	12,8±1,3	12,4±0,7	55,7±3,9	61,1±3,5	20,4±0,9	31,5±2,1	1,5±0,2	1,7±0,1	5,0±0,2	8,5±0,5
36	ND	ND	6,1±0,7	34,1±2,2	24,5±2,1	34,5±1,6	2,4±0,1	4,3±0,2	ND	5,6±0,3	5,9±0,5	14,2±0,7
39	ND	ND	7,5±0,8	20,5±0,8	8,3±1,0	12,8±1,7	1,1±0,1	3,7±0,3	1,5±0,1	1,5±0,1	11,5±1,0	11,1±1,2
40	ND	ND	8,5±0,7	11,1±1,5	1,7±0,1	3,1±0,1	1,1±0,1	7,8±0,6	ND	0,7±0,1	8,9±0,7	12,9±1,4
42	ND	ND	11,0±1,3	18,7±1,9	1,2±0,1	1,2±0,1	2,9±0,2	2,9±0,1	ND	0,8±0,1	9,1±0,7	11,3±0,9
46	ND	ND	9,3±0,8	38,2±3,8	ND	ND	2,9±0,2	0,5±0,0	1,6±0,1	0,9±0,1	9,2±0,7	9,0±1,0
50	ND	ND	8,4±1,4	12,9±1,4	ND	ND	1,9±0,1	2,8±0,2	1,3±0,1	0,5±0,1	3,3±0,3	4,4±0,2
53	ND	ND	6,3±0,6	8,6±0,9	ND	ND	2,3±0,1	7,2±0,1	0,7±0,0	0,7±0,1	6,1±0,5	13,6±1,1
58	ND	ND	11,4±0,1	12,2±0,4	27,0±2,4	32,3±1,2	1,9±0,0	13,2±1,4	1,5±0,2	1,1±0,1	8,5±0,7	16,0±0,9
59	ND	5,0±0,1	12,1±0,8	35,4±2,2	15,0±1,8	17,6±1,3	2,1±0,0	0,8±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	6,9±0,4	14,0±1,5
63	ND	ND	10,6±0,7	12,7±1,3	28,4±2,5	33,4±2,1	2,4±0,2	7,5±0,5	1,8±0,2	1,2±0,1	9,4±1,0	15,4±1,1
67	ND	ND	9,6±0,7	5,7±0,6	24,8±1,8	45,2±3,6	5,1±0,2	10,4±0,5	1,8±0,1	1,7±0,1	2,3±0,2	4,5±0,3
68	ND	ND	7,6±0,6	8,2±0,5	15,1±1,7	20,9±1,4	8,3±0,6	12,7±0,7	1,0±0,1	3,7±0,3	2,3±0,2	5,7±0,8
70	ND	ND	7,0±0,7	9,9±0,9	ND	ND	2,2±0,2	5,8±0,8	1,1±0,1	3,9±0,4	3,1±0,2	7,6±0,6
71	ND	ND	9,3±0,4	13,4±0,6	ND	ND	1,2±0,1	0,8±0,1	1,3±0,1	4,9±0,2	3,4±0,3	8,4±0,3
74	ND	ND	9,8±0,7	70,3±3,0	ND	ND	1,6±0,1	18,4±1,8	1,4±0,0	4,8±0,5	5,3±0,5	4,9±0,3

Tabulka 5: Pokračování – obsah biogenních aminů (mg/l) v lehkých a výčepních pivech.

Číslo vzorku	Tryptamin*		Putrescin*		Kadaverin*		Tyramin*		Spermidin*		Spermin*	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
77	ND**	ND	6,7±0,3	36,6±2,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,8±0,4	11,4±1,1
78	ND	ND	12,4±1,4	19,9±1,7	ND	ND	2,1±0,1	9,5±0,4	0,6±0,0	ND	9,2±0,7	11,2±1,1
83	ND	ND	7,3±0,4	29,6±2,7	ND	ND	0,5±0,0	1,9±0,2	0,9±0,1	6,8±0,5	6,8±0,6	15,8±1,2
85	ND	ND	9,1±0,9	7,7±1,0	ND	ND	0,4±0,0	0,8±0,1	0,5±0,1	3,7±0,3	4,2±0,3	7,4±0,9
86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,4±0,0	0,6±0,0	4,4±0,4	4,3±0,6
91	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,1±0,3	32,3±2,8	0,8±0,1	0,5±0,0	4,6±0,4	0,5±0,0

\* Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6). \*\* ND – biogenní amin nedetekován.

Biogenní amin tyramin byl na počátku zjištěn u 30 lehkých a výčepních piv (tabulka 5). Kromě 4 vzorků (1, 16, 17 a 34), kdy byl tyramin detekován v množství 20,4 – 66,4 mg/l, se jeho obsah pohyboval na počátku do 10 mg/l, u většiny piv zpravidla do 5 mg/l. Během skladování došlo u některých z těchto piv k poklesu obsahu tyraminu, u většiny z nich se však množství zvýšilo. Navýšení obsahu tyraminu během skladování této skupiny piv bylo u některých vzorků výrazné, u vzorku 22 se množství tyraminu zvýšilo 13x, u mnohých dalších vzorků došlo k více než pětinásobnému zvýšení obsahu tyraminu během skladování (vzorky 24, 25, 40, 58, 74 a 91). Na konci skladování byl zjištěn obsah tyraminu < 10 mg/l u 18 vzorků (tabulka 5), v rozmezí 10 – 20 mg/l u 6 vzorků. U 5 piv byl zjištěn obsah tyraminu v rozmezí 20 – 100 mg/l, přičemž nejvyšší množství bylo zjištěno u vzorku 16 (18,4±1,6 mg/l).

U většiny piv byly rovněž detekovány polyaminy spermin a spermidin. Přítomnost spermidinu nebyla zjištěna u piv 4 a 77, přítomnost sperminu u piva 25 (tabulka 5). Navíc tyto aminy nebyly zjištěny po zakoupení u vzorků piv 36, 40 a 42 (spermidin) a 22 (spermin). Na počátku skladování byly spermidin a spermin v pivech obsaženy v množství v množství do 10 mg/l (výjimkou byl vzorek 39 s 11,5±1,0 mg/l sperminu). Po skončení doby použitelnosti nebylo množství spermidinu v pivech vyšší než 10 mg/l, s výjimkou vzorku 83 došlo během skladování piv zpravidla jen k jeho mírnému nárůstu nebo poklesu. Po ukončení skladování bylo u 14 vzorků piv zjištěno množství sperminu v rozmezí 10 – 20 mg/l, u ostatních bylo toto množství do 10 mg/l.

Ve vzorcích lehkých a výčepních piv byla zjištěna přítomnost 2 a více biogenních aminů (tabulka 5). Pouze 2 BA byly zjištěny u vzorků 4, 77 (putrescin a spermin) a 86 (spermin a spermidin), 3 BA potom u vzorku 91 (tyramin, spermin a spermidin). Čtyři biogenní aminy (putrescin, tyramin, spermin a spermidin) byly zjištěny u 16 piv (6, 8, 9, 10, 16, 22, 24, 46, 50, 53, 70, 71, 74, 78, 83 a 85), u vzorku 25 byl detekován putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. U 11 vzorků (1, 17, 34, 36, 39, 40, 42, 58, 63, 67, 68) bylo zjištěno 5 BA (putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin). U vzorku 59 bylo zjištěno 6 biogenních aminů – tryptamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin.

Kromě zjišťování obsahu biogenních aminů bylo při každé analýze měřeno pH piva. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Z výsledků je patrné, že v průběhu skladování došlo k mírnému navýšení pH u lehkých a výčepních piv. Po zakoupení piv se pH pohybovalo v rozmezí 4,03 – 4,61, po uplynutí doby použitelnosti v rozmezí pH 4,14 – 4,85. U většiny vzorků (23 piv) této skupiny došlo ke změnám pH do jedné desetiny (tabulka 6), u 5 piv (25, 39, 50, 58, 59) se rozmezí změny pH pohybovalo mezi 0,1 – 0,2. U zbývajících 6 piv (vzorky 8, 9, 17, 36, 77 a 83) byla změna



pH větší než dvě desetiny, přičemž k největšímu zvýšení pH během skladování došlo u vzorku piva 83, kdy bylo zjištěno po 152 dnech skladování zvýšení z pH 4,29 na pH 4,75.

Tabulka 6: Změna pH lehkých a výčepních piv během skladování.

Číslo vzorku	pH		Číslo vzorku	pH		Číslo vzorku	pH	
	Počátek	Konec		Počátek	Konec		Počátek	Konec
<b>1</b>	4,34	4,39	<b>34</b>	4,37	4,42	<b>67</b>	4,60	4,58
<b>4</b>	4,33	4,39	<b>36</b>	4,19	4,61	<b>68</b>	4,61	4,61
<b>6</b>	4,24	4,32	<b>39</b>	4,31	4,46	<b>70</b>	4,25	4,25
<b>8</b>	4,23	4,65	<b>40</b>	4,42	4,46	<b>71</b>	4,31	4,35
<b>9</b>	4,25	4,62	<b>42</b>	4,34	4,43	<b>74</b>	4,37	4,41
<b>10</b>	4,19	4,23	<b>46</b>	4,15	4,14	<b>77</b>	4,29	4,54
<b>16</b>	4,24	4,33	<b>50</b>	4,22	4,36	<b>78</b>	4,34	4,36
<b>17</b>	4,50	4,85	<b>53</b>	4,61	4,59	<b>83</b>	4,29	4,75
<b>22</b>	4,25	4,30	<b>58</b>	4,16	4,29	<b>85</b>	4,23	4,26
<b>24</b>	4,19	4,26	<b>59</b>	4,10	4,25	<b>86</b>	4,23	4,32
<b>25</b>	4,03	4,18	<b>63</b>	4,31	4,35	<b>91</b>	4,21	4,20

## 5.2 Obsah biogenních aminů v ležácích

Obsah biogenních aminů byl zjišťován ve 47 různých ležácích. V každém z analyzovaných piv této skupiny byla zjištěna přítomnost biogenních aminů (tabulka 7), přičemž celkové množství BA kolísalo od 11,9 mg/l až po 316,8 mg/l. U všech vzorků piv této skupiny byl zjištěn vyšší obsah biogenních aminů na konci skladování (po uplynutí doby použitelnosti).

Po zakoupení piv se celkový obsah BA pohyboval v rozmezí 11,9 – 209,0 mg/l (tabulka 7). U žádného z ležáků nebyl na počátku experimentu zjištěn celkový obsah BA nižší než 10 mg/l. U 27 piv bylo na počátku detekováno celkové množství BA 10 – 50 mg/l, u 16 vzorků byl obsah vyšší než 50 mg/l a u čtyř zbývajících vzorků byl obsah vyšší než 100 mg/l, přičemž nejvíce BA bylo na počátku zjištěno u vzorku 19 (209,0 mg/l).

Po uplynutí doby použitelnosti bylo u ležáků detekováno celkové množství biogenních aminů v rozmezí 23,1 – 316,8 mg/l. Po této době nebyl u žádného vzorku zjištěn celkový obsah BA < 10 mg/l. Obsah biogenních aminů v rozmezí 10 – 50 mg/l byl zjištěn u 12 piv, BA v rozmezí 50 – 100 mg/l u 22 piv, 100 – 200 mg/l u 10 piv, BA více jak 200 mg/l bylo zjištěno u 3 vzorků (vzorek 14, 18, 19), přičemž u vzorku 18 bylo množství BA vyšší než 300 mg/l (316,8 mg/l). Během skladování piv se u některých vzorků celkové množství BA zvýšilo jen

mírně (např. vzorky 30, 35, 38, 49, 92), přičemž u vzorku 29 se celkové množství BA dokonce mírně snížilo, u mnohých se však více jak zdvojnásobilo (vzorky 12, 18, 41, 44, 45, 62, 72, 76, 82) nebo ztrojnásobilo (vzorky 5, 26, 27, 73, 84, 87). K největšímu nárůstu obsahu biogenních aminů během skladování došlo u vzorku 75 (více jak pětinasobné zvýšení biogenních aminů) a dále u vzorku 11 (více jak čtyřnásobné zvýšení).

Tabulka 7: Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) v ležácích.

Číslo vzorku	Σ biogenní aminy		Číslo vzorku	Σ biogenní aminy		Číslo vzorku	Σ biogenní aminy	
	Počátek	Konec		Počátek	Konec		Počátek	Konec
2	79,6	127,7	30	33,0	40,5	66	89,0	110,6
3	125,9	197,6	31	89,0	122,6	69	49,0	64,4
5	13,7	51,3	32	74,4	110,8	72	17,3	39,0
7	37,7	61,8	35	85,0	101,2	73	21,6	85,3
11	11,9	55,1	38	74,5	99,8	75	15,8	88,9
12	19,2	43,0	41	21,1	53,6	76	20,6	46,9
13	39,9	61,3	43	65,0	91,7	79	24,4	42,1
14	165,8	212,1	44	22,3	53,6	82	21,3	55,7
15	86,2	104,7	45	22,2	59,1	84	16,2	54,4
18	143,0	316,8	47	28,6	48,6	87	19,6	74,3
19	209,0	252,4	49	15,8	23,1	89	19,5	29,3
21	75,7	104,3	54	16,4	25,7	92	33,8	36,3
23	21,0	33,1	56	67,9	90,6	94	92,2	131,5
26	15,7	53,2	60	66,3	113,8	95	54,2	97,2
27	13,1	47,2	61	61,9	82,8	96	73,7	94,2
29	93,7	92,8	62	40,3	82,4			

U žádného ze 47 vzorků ležáků nebyl detekován histamin a fenyletylamin. Tryptamin se u této skupiny piv vyskytoval také málo, byl zjištěn u 5 vzorků piv (13, 19, 29, 43, 60) při zakoupení od cca 5,7 – 26,4 mg/l a po uplynutí doby použitelnosti v množství od cca 9,1 – 39,3 mg/l.

Ve vzorcích piv typu ležáků byla zjištěna přítomnost 3 a více biogenních aminů (tabulka 8). Pouze 3 BA byly zjištěny u 7 vzorků (11, 21, 27, 79, 84, 87, 89) v kombinaci putrescin, tyramin, spermin nebo putrescin spermidin, spermin. Čtyři biogenní aminy (putrescin, tyramin, spermin a spermidin) byly zjištěny u 16 piv. U 19 vzorků bylo zjištěno 5 biogenních aminů v kombinaci tryptamin, putrescin, tyramin, spermin a spermidin nebo putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin. U 3 vzorků (19, 29, 60) bylo zjištěno 6 biogenních aminů – tryptamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin.

Kadaverin byl detekován u 22 ležáků (vzorky 2, 3, 5, 14, 15, 18, 19, 21, 29, 30, 31, 35, 41, 49, 56, 60, 61, 62, 66, 69, 94, 96). U 5 piv (5, 29, 41, 49, 94) bylo v době zakoupení množství kadaverinu nižší než 10 mg/l, u 10 piv se pohybovalo v rozmezí 10 – 50 mg/l a u 7 piv bylo na počátku skladování ležáků množství kadaverinu vyšší než 50 mg/l. U většiny piv došlo během skladování k nárůstu kadaverinu téměř o polovinu (tabulka 8), u dvou vzorků (18, 62) se množství kadaverinu zvýšilo během skladování téměř dvojnásobně. Po uplynutí doby použitelnosti se množství kadaverinu u ležáků pohybovalo v rozmezí 1,5 – 94,4 mg/l, přičemž více než 50 mg/l kadaverinu bylo zjištěno u 9 piv (vzorky 2, 3, 14, 18, 19, 31, 35, 61, 66).

Putrescin byl detekován u všech 47 vzorků piv typu ležáků. Na počátku pokusu bylo u 18 piv detekováno < 10 mg/l putrescinu (tabulka 8), u 26 piv bylo toto množství v rozmezí 10 – 20 mg/l a u zbývajících 3 vzorků bylo toto množství vyšší než 20 mg/l, přičemž nejvyšší množství putrescinu bylo u vzorku 38 ( $56,4 \pm 5,8$ ). Během skladování došlo u všech těchto piv k nárůstu obsahu putrescinu, po uplynutí doby použitelnosti bylo u této skupiny piv zjištěno 6,8 – 81,3 mg/l putrescinu. Pouze u 6 vzorků (2, 3, 41, 49, 56, 92) došlo během skladování k mírnému nárůstu obsahu putrescinu. U ostatních vzorků piv se toto množství zvýšilo i několikanásobně, např. u vzorku 11 byl zjištěn nárůst z 8,1 mg/l na 36,5 mg/l, u vzorku 13 ze 7,4 mg/l na 34,6 mg/l. Největší nárůst putrescinu byl zjištěn u vzorku 75, kde se jeho množství během skladování zvýšilo cca 8x.

Biogenní amin tyramin byl na počátku zjištěn u 44 piv typu ležáků (tabulka 8), nebyl zjištěn pouze u 3 vzorků a to ani po skončení doby použitelnosti (vzorek 84, 87, 89). Celkově byl tyramin při zakoupení detekován v množství od 0,6 – 79,7 mg/l. U 28 vzorků byl na počátku v množství do 10 mg/l, u 12 vzorků v množství 10 – 50 mg/l a u zbývajících 4 vzorků v množství nad 50 mg/l. Během skladování došlo u 4 vzorků z těchto piv k mírnému poklesu obsahu tyraminu, u většiny z nich se však množství zvýšilo. Navýšení obsahu tyraminu během skladování této skupiny piv bylo u některých vzorků výrazné, u vzorku 11 se množství tyraminu zvýšilo 16x, u vzorku 73 se zvýšilo téměř 14x, u mnohých dalších vzorků došlo k více než pětinasobnému zvýšení obsahu tyraminu během skladování (vzorky 5, 12, 26, 30, 43, 49, 56, 62). Na konci skladování byl zjištěn obsah tyraminu < 10 mg/l u 18 vzorků (tabulka 8), v rozmezí 10 – 20 mg/l u 10 vzorků. U 14 piv byl zjištěn obsah tyraminu v rozmezí 20 – 100 mg/l, u 2 vzorků to bylo více než 100 mg/l, přičemž nejvyšší množství bylo zjištěno u vzorku 18 ( $164,7 \pm 13$  mg/l).

Tabulka 8: Obsah biogenních aminů (mg/l) v ležácích.

Číslo vzorku	Tryptamin*		Putrescin*		Kadaverin*		Tyramin*		Spermidin*		Spermin*	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
2	ND**	ND	8,8±0,4	10,9±1,6	51,8±2,2	70,8±1,9	10,5±1,0	20,0±1,7	4,1±0,5	10,2±0,9	4,4±0,4	15,8±2,1
3	ND	ND	9,7±0,2	11,5±0,7	59,5±3,5	77,4±5,8	49,8±5,0	89,2±7,3	4,6±0,2	11,6±1,0	2,3±0,1	7,9±0,6
5	ND	ND	8,5±0,8	27,9±2,1	0,9±0,1	ND	1,1±0,1	8,2±0,4	3,0±0,3	6,3±0,6	0,3±0,0	8,9±0,8
7	ND	ND	10,6±0,4	25,6±1,3	ND	ND	21,5±0,9	25,0±1,9	3,5±0,3	5,5±0,5	2,2±0,2	5,7±0,4
11	ND	ND	8,1±0,9	36,5±2,1	ND	ND	0,8±0,0	13,3±1,0	3,0±0,4	5,3±0,5	ND	ND
12	ND	ND	6,5±0,5	19,7±0,9	ND	ND	1,0±0,1	9,4±0,7	4,8±0,1	6,7±0,6	6,8±0,5	7,2±0,4
13	5,7±0,7	9,1±0,8	7,4±0,7	34,6±3,5	ND	ND	13,5±1,4	14,1±0,6	1,4±0,1	2,2±0,2	1,2±0,1	1,3±0,1
14	ND	ND	18,5±1,4	24,7±1,5	55,4±3,8	76,4±3,1	85,4±8,7	97,0±6,1	5,6±0,5	12,7±0,7	0,9±0,1	1,2±0,1
15	ND	ND	11,2±1,1	21,6±2,8	32,1±0,6	33,5±4,9	39,7±3,4	45,1±5,2	2,7±0,3	2,8±0,3	0,6±0,1	1,8±0,1
18	ND	ND	15,7±1,4	44,2±3,5	49,2±4,5	94,4±9,3	71,6±7,8	164,7±13	5,0±0,5	9,8±0,5	1,5±0,1	3,7±0,2
19	26,2±0,8	34,8±1,8	23,0±0,3	47,5±1,1	50,3±5,2	79,8±7,6	67,3±7,9	87,4±6,7	3,6±0,3	1,8±0,2	1,1±0,1	1,1±0,1
21	ND	ND	13,5±0,5	22,9±1,9	13,4±1,1	19,9±1,5	48,8±4,3	61,5±4,5	ND	ND	ND	ND
23	ND	ND	9,1±1,1	19,0±1,8	ND	ND	1,2±0,1	3,1±0,3	4,1±0,4	4,5±0,5	6,6±0,4	6,5±0,4
26	ND	ND	6,9±0,6	22,0±0,2	ND	ND	0,8±0,1	5,9±0,5	3,2±0,1	7,7±0,3	4,8±0,4	17,6±1,8
27	ND	ND	8,7±0,7	36,3±2,1	ND	ND	0,9±0,1	3,5±0,4	ND	ND	3,5±0,4	7,4±0,7
29	26,4±2,2	39,3±3,4	10,2±1,1	17,0±1,2	3,7±0,2	3,0±0,3	6,2±0,4	29,0±2,4	1,5±0,1	2,3±0,2	0,8±0,1	2,3±0,2
30	ND	ND	10,9±0,8	15,5±0,6	13,6±1,9	13,8±1,2	1,3±0,1	7,0±0,5	2,0±0,2	4,1±0,2	5,1±0,5	ND
31	ND	ND	13,5±1,1	20,0±0,5	55,3±3,8	71,9±6,2	13,1±0,7	20,0±1,6	1,5±0,1	1,1±0,0	5,7±0,4	9,6±1,6
32	ND	ND	25,7±1,9	40,8±3,3	ND	ND	42,5±4,2	59,5±2,8	1,4±0,1	1,6±0,3	4,8±0,3	8,9±0,4
35	ND	ND	9,3±0,6	13,0±1,1	61,0±6,9	71,7±5,7	4,0±0,2	4,9±0,5	1,5±0,2	1,8±0,2	9,1±1,0	9,8±0,8
38	ND	ND	56,4±5,8	74,4±8,5	ND	ND	4,3±0,4	12,1±1,2	2,2±0,3	13,4±1,9	11,6±0,9	ND
41	ND	ND	11±1,0	13,9±1,2	2,3±0,1	2,6±0,2	2,1±0,3	24,7±1,3	ND	1,3±0,0	5,7±0,6	11,1±0,8
43	15,2±1,4	18,6±1,5	15,3±1,5	26,8±2,1	ND	ND	3,0±0,3	22,5±1,7	ND	9,9±1,1	10,1±0,7	13,9±0,6
44	ND	ND	12,3±1,0	25,3±1,5	ND	ND	2,9±0,4	4,8±0,7	1,4±0,2	11,0±0,9	5,8±0,6	12,5±1,4
45	ND	ND	13,5±0,7	28,4±0,6	ND	ND	2,1±0,2	1,6±0,1	2,2±0,2	14,7±1,7	4,4±0,4	14,4±1,0
47	ND	ND	11,2±0,7	19,4±1,9	ND	ND	4,5±0,3	12,9±0,7	2,1±0,1	1,7±0,1	10,7±0,8	14,7±1,3
49	ND	ND	6,4±0,5	8,3±0,9	1,6±0,1	1,5±0,1	0,8±0,1	7,3±0,6	ND	ND	7,1±0,5	6,0±0,4

Tabulka 8: Pokračování – obsah biogenních aminů (mg/l) v ležácích.

Číslo vzorku	Tryptamin*		Putrescin*		Kadaverin*		Tyramin*		Spermidin*		Spermin*	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
54	ND**	ND	6,2±0,6	10,4±0,4	ND	ND	1,5±0,1	1,3±0,0	1,6±0,1	0,9±0,1	7,1±0,5	13,1±0,3
56	ND	ND	13,8±0,9	13,3±1,6	43,9±2,2	45,9±2,4	2,5±0,1	13,4±1,4	ND	1,2±0,2	7,6±0,5	16,9±0,2
60	ND	11,9±1,3	12,0±1,0	36,7±1,4	29,5±1,6	46,0±3,1	2,1±0,3	3,7±0,4	2,3±0,2	2,0±0,1	7,2±0,3	13,5±2,1
61	ND	ND	14,4±1,7	18,5±1,1	40,1±3,0	51,8±1,9	1,2±0,1	1,1±0,1	1,3±0,1	4,2±0,3	4,9±0,4	7,2±0,7
62	ND	ND	11,3±0,5	14,5±1,0	18,2±1,8	35,2±3,8	2,2±0,1	15,7±1,6	1,6±0,1	1,1±0,0	7,0±0,6	16,0±1,3
66	ND	ND	15,5±1,1	27,6±2,9	58,7±6,0	68,5±0,4	2,7±0,3	2,8±0,3	2,5±0,2	1,4±0,1	9,6±0,9	10,4±0,9
69	ND	ND	9,3±0,7	15,1±2,3	23,4±1,0	26,7±1,7	14,2±0,8	19,9±1,9	ND	1,1±0,1	2,1±0,2	1,6±0,1
72	ND	ND	9,7±1,0	15,2±1,3	ND	ND	0,9±0,0	1,3±0,1	1,3±0,2	10,3±0,7	5,4±0,5	12,2±1,2
73	ND	ND	11,4±0,3	38,9±3,1	ND	ND	1,9±0,2	26,4±2,5	1,7±0,1	8,9±0,6	6,6±0,7	11,2±0,1
75	ND	ND	10,1±1,3	81,3±6,2	ND	ND	0,9±0,1	2,0±0,2	ND	ND	4,8±0,5	5,5±0,4
76	ND	ND	11,8±0,6	22,6±1,9	ND	ND	1,4±0,1	1,1±0,1	1,5±0,0	10,6±1,0	5,8±0,4	12,7±0,4
79	ND	ND	13,1±1,1	22,9±2,9	ND	ND	2,5±0,2	6,8±0,4	ND	ND	8,8±0,4	12,5±0,7
82	ND	ND	10,1±0,9	18,3±1,0	ND	ND	0,6±0,1	3,7±0,2	1,2±0,1	11,5±0,4	9,4±0,6	22,2±2,8
84	ND	ND	7,3±0,5	28,4±2,0	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	7,7±0,5	7,9±0,7	18,3±1,0
87	ND	ND	10,9±0,6	39,8±3,5	ND	ND	ND	ND	0,6±0,1	12,2±1,1	8,1±0,6	22,3±2,2
89	ND	ND	7,3±0,0	12,5±0,7	ND	ND	ND	ND	1,4±0,1	6,5±0,4	10,8±0,6	10,3±1,0
92	ND	ND	5,8±0,5	6,8±0,6	ND	ND	13,6±1,0	14,8±1,4	1,1±0,1	0,8±0,1	13,3±1,4	13,9±0,8
94	ND	ND	8,9±0,7	18,2±1,3	1,2±0,1	ND	79,7±5,5	111,2±3,6	1,3±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	0,7±0,1
95	ND	ND	10,6±0,8	36,4±2,9	ND	ND	33,5±3,1	43,0±2,4	2,0±0,2	10,0±0,6	8,2±0,5	7,9±0,8
96	ND	ND	10,3±1,2	20,6±1,4	26,1±2,3	37,5±0,5	27,5±2,0	32,5±2,9	1,1±0,0	ND	8,7±1,1	3,6±0,3

\* Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6). \*\* ND – biogenní amin nedetekován.

U většiny piv byly rovněž detekovány polyaminy spermin a spermidin. Přítomnost spermidinu nebyla zjištěna u 5 vzorků piv (21, 27, 49, 75, 79), přítomnost sperminu u piva 11 a 21 (tabulka 8). Navíc tyto aminy nebyly zjištěny po zakoupení u vzorků piv 41, 43, 56, 69 (spermidin) a po uplynutí doby použitelnosti u vzorku 96 (spermidin) a 30, 38 (spermin). Na počátku skladování byly spermidin a spermin v téměř všech pivech obsaženy v množství do 10 mg/l, pouze u vzorků 38, 43, 47, 89, 92 byla tato hodnota při zakoupení piva mírně vyšší než 10 mg/l. Po skončení doby použitelnosti bylo u 10 vzorků množství spermidinu v pivech vyšší než 10 mg/l, přičemž u mnohých došlo až k několikanásobnému navýšení. Množství sperminu vyšší než 10 mg/l bylo po skončení doby použitelnosti zjištěno u 21 vzorků (nejvyšší u vzorku 87 s hodnotou  $22,3 \pm 2,2$  mg/l), přičemž i zde došlo u mnohých až k několikanásobnému zvýšení. U ostatních vzorků bylo toto množství do 10 mg/l.

Tabulka 9: Změna pH ležáků během skladování.

Číslo vzorku	pH		Číslo vzorku	pH		Číslo vzorku	pH	
	Počátek	Konec		Počátek	Konec		Počátek	Konec
2	4,45	4,44	30	4,35	4,34	66	4,49	4,50
3	4,30	4,37	31	4,27	4,36	69	4,60	4,40
5	4,36	4,41	32	4,35	4,37	72	4,38	4,40
7	4,33	4,41	35	4,32	4,42	73	4,40	4,70
11	4,15	4,17	38	4,35	4,52	75	4,32	4,39
12	4,27	4,31	41	4,39	4,44	76	4,37	4,42
13	4,10	4,18	43	4,08	4,10	79	4,34	4,35
14	4,49	4,51	44	4,12	4,18	82	4,28	4,69
15	4,40	4,42	45	4,27	4,28	84	4,26	4,69
18	4,54	4,91	47	4,14	4,28	87	4,35	4,81
19	4,43	4,42	49	4,14	4,22	89	4,23	4,31
21	4,15	4,21	54	4,51	4,47	92	4,18	4,26
23	4,26	4,28	56	4,32	4,34	94	4,47	4,44
26	4,44	4,88	60	4,28	4,39	95	4,53	4,75
27	4,31	4,37	61	4,31	4,39	96	4,73	4,55
29	4,21	4,27	62	4,20	4,29			

Výsledky pH ležáků na začátku a na konci skladování jsou shrnuty v tabulce 9. Z výsledků je patrné, že v průběhu skladování došlo u většiny vzorků k mírnému navýšení pH u piv typu ležáků. U 7 vzorků (2, 19, 30, 54, 69, 94, 96) došlo během skladování ke snížení pH. Po zakoupení piv se pH pohybovalo v rozmezí 4,08 – 4,73, po uplynutí doby použitelnosti v rozmezí pH 4,10 – 4,91. U většiny vzorků (30 piv) této skupiny došlo ke změnám pH do jedné desetiny (ta-

bulka 9), u 4 piv (38, 47, 60, 95) se rozmezí změny pH pohybovalo mezi 0,1 – 0,2. U zbývajících 6 piv (vzorky 18, 26, 73, 82, 84, 87) byla změna pH větší než dvě desetiny, přičemž k největšímu zvýšení pH během skladování došlo u vzorku piva 87, kdy bylo zjištěno po 152 dnech skladování zvýšení z pH 4,35 na pH 4,81.

### 5.3 Obsah biogenních aminů ve speciálních a ochucených pivech

Obsah biogenních aminů byl zjišťován v 19 různých speciálních pivech. V každém z analyzovaných piv této skupiny byla zjištěna přítomnost biogenních aminů (tabulka 10), výjimkou byl pouze vzorek 19, kde nebyla detekována přítomnost žádného BA a to při zakoupení ani po uplynutí doby použitelnosti. Celkové množství BA v této skupině, u vzorků, kde byl zjištěn obsah některého z biogenních aminů, kolísalo v rozmezí od 4,4 mg/l až do 250,5 mg/l. U všech vzorků piv této skupiny byl zjištěn vyšší obsah biogenních aminů na konci skladování (po uplynutí doby použitelnosti).

Tabulka 10: Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) ve speciálních pivech.

Číslo vzorku	Σ biogenní aminy		Číslo vzorku	Σ biogenní aminy		Číslo vzorku	Σ biogenní aminy	
	Počátek	Konec		Počátek	Konec		Počátek	Konec
20	40,6	90,4	55	27,6	28,2	90	28,2	63,5
28	213,3	266,7	57	81,2	96,3	93	27,3	40,1
33	128,5	150,7	64	69,3	90,4	97	ND*	ND
37	133,4	139,7	65	82,0	138,7	98	118,7	133,7
48	107,6	250,5	80	25,1	111,6	99	30,2	83,8
51	58,4	132,3	81	24,1	45,5			
52	139,8	162,1	88	4,4	6,9			

\*ND – biogenní aminy nedetekovány

Po zakoupení piv se celkový obsah BA pohyboval v rozmezí 4,4 – 24,1 mg/l (tabulka 10). Pouze u dvou speciálních piv byl na počátku experimentu zjištěn celkový obsah BA nižší než 10 mg/l (vzorky 88, 97), u 7 piv bylo na počátku detekováno celkové množství BA 10 – 50 mg/l. U 4 vzorků byl obsah vyšší než 50 mg/l (vzorky 51, 57, 64, 65). U zbývajících 6 vzorků byl obsah BA vyšší než 100 mg/l, přičemž u vzorku 28 přesáhl hranici 200 mg/l (213,3 mg/l).

Po uplynutí doby použitelnosti bylo u speciálních piv detekováno celkové množství biogenních aminů v rozmezí 6,9 – 266,7 mg/l). Po této době byl celkový obsah BA < 10 mg/l zjištěn pouze

u vzorků 88, 97, obsah biogenních aminů v rozmezí 10 – 50 mg/l u 3 piv, BA v rozmezí 50 – 100 mg/l u 5 piv, 100 – 200 mg/l u 7 piv. U 2 vzorků (28, 48) bylo překročeno množství BA 200 mg/l (u vzorku 28 to bylo 266,7 mg/l, u vzorku 48 to bylo 250,5 mg/l). Během skladování piv se u některých vzorků celkové množství BA zvýšilo jen mírně (např. vzorky 37, 55, 88), u mnohých se však více jak zdvojnásobilo (vzorky 20, 48, 51, 90, 99). K největšímu nárůstu obsahu biogenních aminů během skladování došlo u vzorku 80 (více než čtyřnásobné zvýšení).

U žádného z 19 vzorků speciálních piv nebyl detekován histamin. Fenyletylamin byl zjištěn u 2 vzorků (28, 51) a to při zakoupení v množství do 3 mg/l a po uplynutí doby použitelnosti v množství do 6 mg/l (tabulka 11). Ve vzorcích speciálních piv byla zjištěna přítomnost 2 a více biogenních aminů (tabulka 11). Pouze 2 BA byly zjištěny u vzorku 88 (spermin a spermidin), 3 BA potom u vzorku 90 (putrescin, spermin a spermidin). Čtyři biogenní aminy (putrescin, tyramin, spermin a spermidin) byly zjištěny u 4 piv (20, 80, 81, 93). U 8 vzorků speciálních piv (33, 48, 51, 57, 64, 65, 98, 99) bylo zjištěno 5 BA. U 3 vzorků (37, 52, 55) bylo zjištěno 6 biogenních aminů – tryptamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin.

Tryptamin byl u této skupiny speciálních piv zjištěn u 4 vzorků (28, 37, 52, 55), přičemž u vzorku 52 se jeho obsah po uplynutí doby použitelnosti zvýšil více než 20x (z 2,7 mg/l na 58,7 mg/l), u ostatních vzorků se obsah tryptaminu zvýšil jen mírně.

Kadaverin byl detekován u 11 speciálních piv. U 2 piv (vzorky 55, 99) bylo v době zakoupení množství kadaverinu nižší než 10 mg/l, u 3 piv se pohybovalo v rozmezí 10 – 50 mg/l a u 6 piv (33, 37, 48, 57, 65, 98) bylo na počátku skladování speciálních piv množství kadaverinu vyšší než 50 mg/l. U většiny piv došlo během skladování pouze k mírnému nárůstu obsahu kadaverinu (tabulka 11). Po uplynutí doby použitelnosti se množství kadaverinu u těchto piv pohybovalo v rozmezí 1,5 – 90,7 mg/l, přičemž více než 50 mg/l kadaverinu bylo zjištěno u 7 piv (33, 37, 48, 57, 64, 65, 98).

U většiny speciálních piv byly rovněž detekovány biogenní aminy spermin a spermidin. Přítomnost těchto dvou BA nebyla zjištěna pouze u vzorku 97. Navíc tyto aminy nebyly zjištěny po uplynutí doby použitelnosti u vzorků piv 20 (spermin) a 98 (spermidin). Na počátku skladování byly spermidin a spermin v pivech obsaženy v množství do 10 mg/l, výjimkou byly 4 vzorky piv (37, 57, 64, 90), kde byl spermin obsažen do 20 mg/l. Po skončení doby použitelnosti došlo u 5 vzorků ke snížení obsahu spermidinu, u ostatních se množství spermidinu pohybovalo do 15 mg/l. Po ukončení skladování bylo u 3 vzorků piv (65, 80, 90) zjištěno množství sperminu v rozmezí 20 – 30 mg/l, u ostatních bylo toto množství do 20 mg/l.



Tabulka 11: Obsah biogenních aminů (mg/l) ve speciálních a ochucených pivech.

Číslo vzorku	Tryptamin*		Fenyletylamin*		Putrescin*		Kadaverin*		Tyramin*		Spermidin*		Spermin*	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
20	ND**	ND	ND	ND	10,9±1,1	11,6±0,4	ND	ND	23,2±3,3	67,0±6,0	5,5±0,7	11,8±0,3	1,1±0,1	ND
28	21,2±1,6	21,3±1,1	3,0±0,2	5,8±0,5	27,7±1,6	39,8±3,1	24,3±3,0	30,3±1,7	105,6±6	142,7±5,5	5,6±0,6	7,7±0,6	1,9±0,2	19,0±2,2
33	ND	ND	ND	ND	16,7±0,9	18,7±1,7	63,7±5,4	74,6±2,6	40,2±3,3	51,2±3,2	1,9±0,2	1,8±0,3	6,1±0,6	4,4±0,3
37	5,7±0,1	7,7±0,5	ND	ND	17,6±0,7	17,7±1,8	82,4±9,7	86,5±5,5	5,2±0,3	6,3±0,6	2,3±0,2	2,6±0,1	12,0±1,2	19,0±2,5
48	ND	ND	ND	ND	17,6±1,8	70,3±4,2	66,7±6,1	90,7±8,9	20,8±1,3	75,2±7,3	1,6±0,2	11,4±0,8	0,9±0,1	2,9±0,1
51	ND	ND	1,9±0,1	2,3±0,1	8,9±0,3	45,2±2,3	ND	ND	45,7±3,4	69,7±4,3	1,3±0,1	9,6±1,0	0,7±0,1	5,5±0,5
52	2,7±0,1	58,7±6	ND	ND	12,6±1,0	16,9±1,0	19,7±1,5	21,5±1,6	34,2±2,5	53,2±6,6	1,2±0,1	7,5±0,8	4,6±0,4	4,3±0,4
55	ND	3,0±0,2	ND	ND	11,5±0,5	14,8±1,2	1,3±0,1	1,5±0,1	1,9±0,0	1,6±0,2	1,2±0,0	0,8±0,1	8,4±0,5	6,5±0,5
57	ND	ND	ND	ND	16,2±0,9	18,6±1,6	50,3±5,2	56,1±5,5	2,7±0,2	1,1±0,1	1,7±0,1	1,4±0,1	10,3±1,2	19,2±1,9
64	ND	ND	ND	ND	13,1±1,8	16,5±0,8	42,6±3,2	57,1±3,4	2,2±0,1	1,6±0,2	1,3±0,1	1,1±0,1	10,2±0,6	13,9±0,7
65	ND	ND	ND	ND	15,1±1,1	38,1±3,3	54,2±5,5	62,6±1,9	1,2±0,1	1,5±0,1	1,7±0,1	11,2±0,4	9,8±0,9	25,3±2,4
80	ND	ND	ND	ND	12,4±1,3	44,2±5,5	ND	ND	1,5±0,2	22,7±1,5	1,4±0,1	15,1±1,8	9,8±0,6	29,6±2,0
81	ND	ND	ND	ND	12,0±0,6	13,7±0,5	ND	ND	0,9±0,1	26,3±1,2	1,2±0,1	1,3±0,1	10,0±0,7	4,4±0,2
88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,4±0,0	1,1±0,1	4,0±0,2	5,9±0,3
90	ND	ND	ND	ND	7,2±0,8	25,3±3,3	ND	ND	ND	ND	1,4±0,2	12,5±0,5	19,6±2,1	25,8±2,1
93	ND	ND	ND	ND	12,2±0,1	4,8±0,4	ND	ND	2,1±0,3	22,2±2,4	1,6±0,2	1,7±0,2	11,4±0,7	11,5±1,0
97	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
98	ND	ND	ND	ND	10,4±1,4	23,3±1,5	60,7±6,8	60,8±3,2	41,8±2,2	47,1±4,0	1,1±0,1	ND	4,8±0,3	2,5±0,1
99	ND	ND	ND	ND	11,0±0,5	50,2±4,3	4,9±0,4	7,0±0,5	7,6±0,5	8,4±0,7	1,1±0,1	4,5±0,5	5,7±0,5	13,7±0,5

\* Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6). \*\* ND – biogenní amin nedetekován.

S výjimkou vzorků 88 a 97 byl putrescin detekován u všech vzorků speciálních piv. Na počátku pokusu bylo pouze u 2 těchto piv detekováno < 10 mg/l putrescinu, u většiny vzorků (14 vzorků, tabulka 11) bylo toto množství v rozmezí 10 – 20 mg/l, přičemž nejvyšší detekované množství putrescinu bylo u vzorku 28 ( $27,7 \pm 1,6$  mg/l). Během skladování došlo u většiny těchto piv k nárůstu obsahu putrescinu, po uplynutí doby použitelnosti bylo u této skupiny piv zjištěno 4,8 – 70,3 mg/l putrescinu. Pouze u 8 vzorků (20, 33, 37, 52, 55, 57, 64, 81) došlo během skladování k mírnému nárůstu (nebo poklesu vzorek 93) obsahu putrescinu. U ostatních vzorků piv se toto množství zvýšilo i několikanásobně, např. u vzorku 48 byl zjištěn nárůst z 17,6 mg/l na 70,3 mg/l, u vzorku 99 z 11,0 mg/l na 50,2 mg/l. Největší nárůst putrescinu byl zjištěn u vzorku 51, kde se jeho množství během skladování zvýšilo cca 5x.

Biogenní amin tyramin byl na počátku zjištěn u 16 speciálních piv (tabulka 11). U 7 vzorků byl na počátku detekován v množství do 5 mg/l. U dalších 8 vzorků byl tyramin zjištěn v množství do 50 mg/l, výjimkou byl vzorek 28, u něhož byl na počátku tyramin detekován v množství >100 mg/l (105,6 mg/l). Během skladování došlo u 3 vzorků (55, 57, 64) k poklesu obsahu tyraminu, u většiny z nich se však množství zvýšilo. Navýšení obsahu tyraminu během skladování této skupiny piv bylo u některých vzorků výrazné, u vzorku 81 se množství tyraminu zvýšilo 29x, u vzorku 80 to bylo 15x a u vzorku 93 se obsah tyraminu zvýšil 10x. Na konci skladování byl zjištěn obsah tyraminu < 10 mg/l u 6 vzorků (tabulka 11), v rozmezí 10 – 50 mg/l u 4 vzorků. U 5 piv byl zjištěn obsah tyraminu v rozmezí 50 – 100 mg/l, přičemž nejvyšší množství bylo zjištěno u vzorku 28 ( $142,7 \pm 5,5$  mg/l).

Tabulka 12: Změna pH speciálních a ochucených piv během skladování.

Číslo vzorku	pH		Číslo vzorku	pH		Číslo vzorku	pH	
	Počátek	Konec		Počátek	Konec		Počátek	Konec
20	4,30	4,80	55	4,52	4,45	90	4,18	4,68
28	4,27	4,31	57	4,25	4,33	93	4,58	4,52
33	4,36	4,39	64	4,23	4,29	97	4,32	4,37
37	4,49	4,51	65	4,31	4,55	98	4,93	4,64
48	4,53	4,58	80	4,37	4,73	99	4,27	4,30
51	4,31	4,76	81	4,40	4,82			
52	4,28	4,38	88	4,04	4,12			

Kromě zjišťování obsahu biogenních aminů bylo při každé analýze rovněž měřeno pH piva. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12. Z výsledků je patrné že v průběhu skladování došlo u většiny vzorků k navýšení pH. Po zakoupení piv se pH pohybovalo v rozmezí 4,04 – 4,93, po uplynutí

doby použitelnosti v rozmezí pH 4,12 – 4,82. U 10 vzorků této skupiny došlo ke změnám pH do jedné desetiny (tabulka 12), u ostatních piv bylo zvýšení pH o 3 až 4 desetiny, přičemž k největšímu zvýšení pH během skladování došlo u vzorku piva 90, kdy bylo zjištěno po 120 dnech skladování zvýšení z pH 4,18 na 4,68.

## 5.4 Diskuze

Monitorování výskytu biogenních aminů v různých potravinách a nápojích (zejména alkoholických) je v poslední době věnována značná pozornost [61, 82 - 90] a to i přes to, že legislativně je tato problematika ošetřena pouze u obsahu histaminu v rybách a výrobcích z ryb. Povolený limit histaminu je 200 – 200 mg/kg ryb (rybích výrobků) [91]. Sledování biogenních aminů v alkoholických nápojích není v současné době legislativně nařízeno, avšak mnozí autoři uvádějí, že i nižší koncentrace BA mohou být pro některé jedince nebezpečné a navrhují pro histamin v alkoholických nápojích limit do 2 mg/l a součet dalších BA (zejména fenyletylaminu a tyraminu) do 100 mg/l [28]. Nižší limity pro alkoholické nápoje jsou navrhovány z toho důvodu, že alkohol, který je ve střevech člověka odbouráván přednostně, působí jako inhibitor detoxikačních enzymů pro BA [27, 28]. U některých jedinců jsou rovněž popisovány alergické a astmatické reakce na alkoholické nápoje včetně piva a vína, které jsou připisovány farmakologické intoleranci na specifické komponenty těchto nápojů, kam se řadí i biogenní aminy [92].

Práce, které se věnují výskytu biogenních aminů v pivech, jsou mnohdy starší než 10 let. V 90. letech minulého století byly publikovány studie o výskytu BA v evropských pivech včetně českých [55, 56, 58], v rozmezí let 2000 – 2010 o výskytu BA v pivech nigerijských [63], polských [57], španělských [65], belgických [60], tureckých [70] nebo čínských [59]. Tato práce je zaměřena na monitoring výskytu biogenních aminů v českých pivech také z toho důvodu, že poslední podobné výsledky týkající se výskytu BA v českých pivech byly publikovány před 15 lety [58].

V diplomové práci bylo analyzováno 99 různých alkoholických piv vyrobených ve 24 pivovarech na území České Republiky (10 moravských a 14 českých pivovarů). Všechna piva byla zakoupena v obchodní síti v ČR, a to v hypermarketech, supermarketech nebo ve firemních prodejnách při pivovarech. Testované vzorky obsahovaly 3,2 – 10,5 % alkoholu. Největší zastoupení mezi analyzovanými pivy měly ležáky, celkem bylo testováno 47 ležáků (47,5 % ze všech vzorků), dále potom 31 výčepních piv (31,3 %), 16 speciálních piv (16,2 %), 3 ochucená piva

(3 %) a 2 lehká piva (2 %). Mezi ležáky bylo zařazeno i 1 pivo pšeničné kvasnicové (vzorek 30). Pokud srovnáme analyzovaná piva podle typu sladu, tak bylo testováno 79 světlých piv (79,8 %), 18 tmavých a polotmavých piv (18,2 %; z toho 6 piv polotmavých a 1 karamelové) a 2 piva řezaná (2 %).

Protože jedním z cílů práce bylo sledovat změny v obsahu biogenních aminů během skladování piva, byly vždy zakoupeny 2 kusy téhož výrobku stejné šarže. Jeden kus každého piva byl analyzován ihned po zakoupení a druhý po uplynutí doby použitelnosti. Než uplynula doba použitelnosti (20 – 244 dnů), byla piva skladována v temnu ve sklepě při teplotě  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ . Většina piv byla za těchto podmínek skladována po dobu delší 3 měsíců.

Z 99 analyzovaných lahvových piv byla přítomnost alespoň 1 biogenního aminu zjištěna v 98 vzorcích. Žádný z biogenních aminů nebyl zjištěn v pivu označeném 97. Jednalo se o tmavé speciální pivo s obsahem alkoholu 5,2 %, které bylo skladováno 49 dnů (od 23. 8. do 10. 10. 2011), a které, dle údajů výrobce, nebylo pasterováno.

Z hlediska možných negativních dopadů na lidské zdraví lze mezi nejvýznamnější biogenní aminy v potravinách a nápojích zařadit histamin [27, 28]. V žádném z testovaných piv nebyl tento amin detekován. K podobným výsledkům dospěli i Buiatti a kol. [55] a Halász a kol. [61], kteří rovněž nezjistili přítomnost histaminu ve 12 alkoholických a 4 nealkoholických pivech. Mnozí další autoři však histamin v pivech detekovali, i když mnohdy v množství do 2 mg/l [56 - 59, 63, 70, 72, 93, 94]. Vyšší množství histaminu v pivech (v množství 2 – 10 mg/l) zjistili u 6 piv (z 18 testovaných) Tang a kol. [59], u lahvových ležáků a speciálních piv Romero a kol. [65] a u spontánně kvašeného piva Izquierdo-Pulido a kol. [56]. Poměrně značné rozdíly v obsahu histaminu zaznamenali u belgických piv Loret a kol. [60], kteří ve spontánně kvašených pivech detekovali histamin v množství 0 – 40 mg/l, ve svrchně kvašených pivech pak do 20 mg/l.

Fenyletylamin byl detekován pouze ve 2 vzorcích piv (28 a 51). V obou případech se jednalo o tmavé speciální pivo s obsahem alkoholu 10,5 %, respektive 8 % a obě piva byla skladována po dobu delší než 150 dnů (tabulka 3). V obou pivech bylo množství fenyletylaminu po zakoupení i do skončení doby použitelnosti do 6 mg/l. Shalaby [27] uvádí doporučený limit pro fenyletylamin v alkoholických nápojích do 3 mg/l, takže i námi detekovaná množství mohou být pro některé jedince riziková, zvláště po konzumaci většího množství piva. Podobně i další autoři uvádějí přítomnost fenyletylaminu v malém počtu vzorků piv a v poměrně nízké koncentraci do 8 mg/l [57, 59, 60, 63, 70, 72, 93].

Poměrně významné nežádoucí účinky na lidský organizmus má i tyramin, který působí vazomotoricky a zároveň může způsobovat hypertenzi [25, 27, 60]. Přítomnost tohoto biogenního aminu bývá poměrně často zjišťována v pivech [52]. V případě námi testovaných piv byl tyramin detekován v 90 pivech, přičemž ve 14 vzorcích bylo detekované množství tyraminu do 1 mg/l. Na konci skladování piv však byl u 39 vzorků zjištěn tyramin v koncentracích 1 – 10 mg/l, v množství 10 – 50 mg/l u 31 piv. U 12 piv bylo detekováno 50 – 100 mg/l a u 3 dokonce více než 100 mg/l (nejvíce 167 mg/l u vzorku 18). Kalač a Glória [52] uvádějí rozmezí detekovaného množství tyraminu v pivech 0,3 – 67,5 mg/l. Maximální hodnoty množství tyraminu zjištěné v českých pivech byly 22,5 mg/l [58], v našem případě bylo  $\leq 25$  mg/l tyraminu zjištěno u většiny (cca 75 %) piv. Poměrně nízký obsah tyraminu ve většině testovaných piv (do cca 6 mg/l) uvádějí mnozí autoři [55 - 57, 59, 63, 72, 93, 94]. Vyšší množství tyraminu detekovali Izquierdo-Pulido a kol. [56] zejména ve svrchně kvašených a spontánně kvašených pivech, Romero a kol. [65] v lahvových speciálních pivech a ležácích a také Loret a kol. [60], kteří uvádějí hodnoty tyraminu pro belgická piva  $> 90$  mg/l. V našem případě byl tyramin zjištěn u 91 % testovaných piv. Většina výše zmíněných autorů rovněž uvádí podobné poměry, Tang a kol. [59] dokonce zjistili přítomnost tyraminu ve všech 18 vzorcích testovaných čínských piv. Na druhou stranu Anli a kol. [70] nedetekovali tyramin ani v jednom ze 17 testovaných piv vyrobených v Turecku. Tyto poměrně značné rozdíly v množství tyraminu přítomného v pivech mohou být způsobeny činností mikroorganismů, protože tyramin je, podobně jako histamin, biogenním aminem, který se podle Kalače a Křížka [53] tvoří díky metabolické aktivitě kontaminující mikroflóry, zejména bakterií mléčného kvašení. Všechny tři vzorky piv (18, 28 a 94), u kterých byl v naší studii tyramin detekován v množství  $> 100$  mg/l, byly ošetřeny pasterací. I přes tento tepelný zákrok mohly být mikroorganismy s disponující tyrozindekarboxylázou přítomny, protože pasteraci mohou přežívat sporulující a termorezistentní bakterie, kam se řadí i mnohé BMK [95, 96].

Na počátku experimentu (po zakoupení piv) byl tryptamin zjištěn u 7 piv (2,7 - 26,4 mg/l), po skončení experimentu potom u 10 piv, přičemž u všech piv, kde byl tryptamin detekován, došlo během jejich skladování k jeho navýšení (3,0 – 58,7 mg/l). Většina ostatních autorů zjistila nižší koncentrace tryptaminu (zpravidla do 10 mg/l) v pivech, avšak zpravidla ve větším množství testovaných vzorků [55 - 59, 62, 65, 70]. Tryptamin podobně jako fenyletylamin může zvyšovat krevní tlak [27]. Oba tyto biogenní aminy byly detekovány pouze u vzorku 28, na konci skladování v množství cca 27 mg/l.

Biogenní aminy putrescin a kadaverin samy o sobě nepůsobí toxicky, mohou však zvyšovat nežádoucí toxické účinky dalších BA (zejména histaminu, tyraminu a fenyletylaminu). Proto je obtížné stanovit limitní dávky těchto aminů v potravinách [25, 27, 28]. U piv analyzovaných v rámci této studie byl putrescin stanoven v největším množství testovaných vzorků (96 %). Kadaverin byl detekován u zhruba poloviny vzorků (46,5 %). Během skladování piv se množství těchto dvou BA u většiny vzorků zvyšovalo. K jiným výsledkům dospěli Kalač a kol. [58], podle kterých došlo během skladování tmavých i světlých piv během 6 týdnů při 6 °C k poklesu obsahu putrescinu a kadaverinu.

Po uplynutí doby použitelnosti byl putrescin v množství 1 – 10 mg/l zjištěn u 11 piv, v množství 10 – 50 mg/l u 77 piv a v množství 50 – 100 mg/l u 7 piv. Kalač a kol. [58] detekovali v 78 českých pivech putrescin v koncentraci 3,2 – 11,9 mg/l. V obdobných koncentracích (0,9 – 11,9 mg/l) zaznamenali putrescin u tureckých piv a piv importovaných do Turecka (celkem 30 vzorků) také Anli a kol. [70], Romero a kol. [65] u piv španělských (1,4 – 8,4 mg/l) nebo Tang a kol. [59] u piv čínských (2,1 – 8,2 mg/l). Izquierdo-Pulido a kol. [56] ve studii zahrnující 195 piv pocházejících z evropských zemí detekovali 1,5 – 15,2 mg/l putrescinu. Nízký obsah putrescinu (do 3 mg/l) v pivech různého původu i typu zaznamenali Slomkowska a Ambroziak [57] nebo Buiatti a kol. [55]. Naopak vyšší koncentrace putrescinu v pivech popisují Cortacero-Ramírez a kol. [72] nebo Loret a kol. [60]. Tyto rozdíly mohou být pravděpodobně způsobeny použitou surovinou, protože podle Kalače a Křížka [53] je putrescin aminem, který se do piva dostává ze sladu nebo dalších surovin využívaných při výrobě piva, kde může tvořit přirozenou složku.

Dalším biogenním aminem, který byl detekován v pivech zakoupených v obchodní síti v ČR, byl kadaverin. Tento biogenní amin byl na konci skladování u 8 piv detekován v množství 1 – 10 mg/l, u 17 piv v rozmezí 10 – 50 mg/l a u 19 piv v koncentracích 50 – 100 mg/l, přičemž maximální detekovaná koncentrace byla 94,4 mg/l. V nízkých koncentracích (do 3 mg/l) byl kadaverin detekován v pivech různého geografického původu [55, 57, 70, 93]. Ve vyšších koncentracích (3 – 40 mg/l) byl kadaverin detekován u jiných piv, včetně českých [56, 58, 60, 65, 72]. Tento biogenní amin vzniká velmi často metabolickou činností mikroorganismů, zejména kontaminující mikroflóry [25, 28, 30], a tím lze vysvětlit i rozdílný obsah kadaverinu v testovaných pivech i u piv analyzovaných v jiných laboratořích.

Ve většině analyzovaných piv byla rovněž zjištěna i přítomnost polyaminů sperminu (95 % vzorků) a spermidinu (89 % vzorků). V případě spermidinu byl u většiny vzorků zjištěn obsah do 10 mg/l, u 15 % vzorků potom do 16 mg/l (nejvyšší zaznamenaná hodnota byla 15,1 mg/l), spermin

byl v množství do 10 mg/l zjištěn u 50 vzorků, v koncentraci 10 – 30 mg/l u 44 testovaných vzorků. Obdobná množství sperminu a spermidinu popisují i další autoři [56, 57, 59, 93]. Buiatti a kol. [55] nedetekovali v pivech spermin, podobně Anli a kol. [70] zjistili přítomnost sperminu a spermidinu jen v malém počtu testovaných piv z oblasti Turecka. Tyto biogenní aminy jsou přirozenou složkou buněk [27] a jsou považovány za běžnou složku piva pocházející primárně ze sladu nebo dalších surovin využívaných při výrobě piva [53], takže rozdíly v detekovaném množství těchto aminů v pivech lze přičíst kvalitě výchozí suroviny. Biogenní aminy spermin a spermidin mohou navíc obsahovat nebo dokonce také produkovat i pivovarské kvasinky [52, 58, 61], což rovněž může být dalším důvodem rozdílného zastoupení těchto BA v pivech.

Jestliže srovnáme celkový obsah biogenních aminů u analyzovaných piv (u kterých byla zjištěna přítomnost BA - 98 piv) podle typu sladu, tak na konci skladování byly biogenní aminy detekovány ve světlých pivech (celkem 79 vzorků) v množství 5,0 až 316,8 mg/l, v polotmavých pivech a řezaných pivech (9 vzorků) v množství 28,2 – 122,6 mg/l a u tmavých piv (10 vzorků) v množství 47,9 – 266,7 mg/l. Nejvyšší množství bylo zaznamenáno u světlého piva, u tmavých piv byly rovněž zaznamenány hodnoty, které lze považovat za poměrně vysoké. U ochucených piv se celkové množství BA pohybovalo v rozmezí 24 – 138 mg/l, takže lze říci, že ochucovací složky nemají významnější vliv na celkový obsah BA v pivech.

Srovnání celkového množství BA v testovaných pivech v závislosti na obsahu alkoholu je poměrně zajímavé. Nejnižší množství BA bylo zaznamenáno u piv s obsahem alkoholu  $\leq 4$  % (22 vzorků). Po ukončení skladování byly u těchto piv BA detekovány v množství 5 – 98 mg/l. U piv s obsahem alkoholu 4 – 5 % (55 piv) byly biogenní aminy detekovány v rozmezí 23 – 316 mg/l. V obdobných koncentracích byly BA zaznamenány i u piv s obsahem alkoholu vyšším než 5 % (22 piv). Tyto výsledky poukazují na to, že vyšší koncentrace etanolu nebrání možným kontaminujícím mikroorganismům v růstu a produkci biogenních aminů. Naopak, u piv s vyšším obsahem alkoholu byly dokonce zjištěny vyšší koncentrace BA. Tento fakt lze přičíst technologii výroby těchto piv, protože u nich zpravidla dochází k delšímu zrání, což může na druhou stranu napomáhat rozvoji mikroflóry disponující dekarboxylačními enzymy.

U nepasterovaných piv lze očekávat vyšší koncentrace BA vzhledem k tomu, že tato piva nebyla tepelně ošetřena. Tato domněnka se však nepotvrdila, u nepasterovaných piv (11 vzorků) byly biogenní aminy zjištěny v koncentraci 25 – 133 mg/l (z toho u nepasterovaných a nefiltrovaných v množství 54 – 92 mg/l), u pasterovaných pak v rozmezí koncentrací 5 – 316 mg/l. V tomto případě lze usuzovat na to, že nepasterovaná piva byla pravděpodobně ošetřena filtrací nebo ji-

ným konzervačním zákrokem (např. přidavkem konzervačních látek). Tyto údaje však nebylo možné z obalu (etikety) mnohých piv zjistit.

Obsah biogenních aminů v analyzovaných vzorcích piv lze srovnat i z hlediska doby skladování. Po dobu 22 – 60 dnů bylo skladováno celkem 17 testovaných piv, u kterých byl zjištěn celkový obsah BA v rozmezí 21 – 132 mg/l, u piv skladovaných po dobu 61 – 100 dnů (27 piv) obsah BA 5 – 252,4 mg/l a u piv skladovaných 101 – 244 dnů celkové množství BA 20 – 316 mg/l. Pivo, u kterého byla zaznamenána nejvyšší koncentrace BA (vzorek 18), bylo skladováno 172 dnů. Z výsledků je patrné, že jestliže byla piva skladována delší dobu, bylo u nich zaznamenáno vyšší množství biogenních aminů. Toto zjištění lze pravděpodobně přičíst tomu, že i když byla piva skladována v chladu, tak u nich zřejmě došlo k postupnému rozvoji mikroorganismů schopných produkovat biogenní aminy.

Na konci skladování (doby použitelnosti) piv bylo nejvyšší celkové množství BA zjištěno u vzorku 18, což byl světlý ležák s obsahem alkoholu 4,7 %, který byl ošetřen pasterací a v rámci tohoto experimentu byl skladován 172 dnů.

Řada konzumentů piv, kteří užívají léky (zejména inhibitory aminooxidáz nebo antidepresiva), může z hlediska příjmu BA patřit k rizikové skupině. Pro tuto skupinu konzumentů může být podle Silla Santos [28] a Shalaby [27] toxická dávka již 6 mg/l (mg/kg). Tento limit byl překročen téměř ve všech analyzovaných vzorcích piv již po jejich zakoupení. Toto zjištění je o to závažnější, že alkohol může nežádoucí účinky biogenních aminů ještě zesilovat. Navíc může být pivo některými občany konzumováno ve větším množství a tím jsou i ve větších dávkách lidským organismem přijímány také biogenní aminy.



## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na monitoring obsahu osmi biogenních aminů v alkoholických lahvových pivech zakoupených v běžné obchodní síti v ČR. Cílem této práce bylo pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie sledovat změny obsahu biogenních aminů v 99 vzorcích českých piv během chladírenského skladování.

Výsledky tohoto experimentu lze shrnout následovně:

- přítomnost biogenních aminů byla zjištěna u všech testovaných českých lahvových piv, s výjimkou jednoho vzorku,
- celkové množství biogenních aminů v analyzovaných pivech dosáhlo maximální hodnoty 316,8 mg/l,
- histamin nebyl detekován v žádném z testovaných piv,
- nejčastěji detekovanými aminy byly putrescin (95 vzorků), spermin (94 vzorků), tyramin (90 vzorků), spermidin (88 vzorků) a kadaverin (46 vzorků). V ojedinělých případech byly detekovány aminy tryptamin (10 vzorků) a fenyletylamin (2 vzorky),
- tyramin byl detekován v nejvyšším množství 165 mg/l, putrescin 81,3 mg/l, kadaverin 94,4 mg/l, tryptamin 58,7 mg/l, spermin 29,6 mg/l, spermidin 15,1 mg/l a fenyletylamin v koncentraci 5,8 mg/l,
- u většiny vzorků došlo během chladírenského skladování ke zvýšení celkového množství biogenních aminů,
- u piv s vyšší koncentrací alkoholu bylo detekováno větší množství biogenních aminů,
- typ sladu (světlý, polotmavý, tmavý) neměl výraznější vliv na množství detekovaných biogenních aminů,
- obsah biogenních aminů může u piv na konci doby minimální trvanlivosti, resp. použitelnosti, dosahovat hodnot, které již mohou u některých osob způsobit zdravotní komplikace.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BASAŘOVÁ, G., ŠAVEL, J., BASAŘ, P., LEJSEK, T. *Pivovarství, teorie a praxe výroby piva*, VŠCHT, Praha 2010. 904 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [2] BRIGGS, D., BOULTON, C., BROOKES, P., STEVENS, R. *Brewing: Science and practice*. 1st ed. Cambridge: Woodhead Pub. Ltd. 2004, 881 s. ISBN 0-8493-2547-1.
- [3] TAMANG, J. P., KAILASAPATHY, K. *Fermented Foods and Beverages of the World*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. 445 s. ISBN 978-1-4200-9495-4.
- [4] HORNSEY, I. *Brewing*. 1st ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, 231 s. ISBN 08-540-4568-6.
- [5] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. 207 s. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [6] KOSAŘ, K.; PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby piva a sladu*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [7] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [8] ZIMOLKA, J., CERKAL, R., DVOŘÁK, J., EDLER, S., EHRENBERGEROVÁ, J., HŘIVNA, L., KAMLER, J., KLEM, K., MILOTOVÁ, J., MÍŠA, P., PROCHÁZKOVÁ, B., PSOTA, V., RICHTER, R., RYANT, P., TICHÝ, F., VACULOVÁ, K., VÁŇOVÁ, M., VEJRAŤKA, K. *Ječmen – formy a užitkové směry v ČR*. Praha: Profi Press, s. r. o., 2006. 200 s. ISBN Z80-86726-18-5.
- [9] ČÍŽKOVÁ, H., DOSTÁLEK, P., FIALA, J., KOLOUCHOVÁ, I. Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva. *Chemické listy*, 100, 478-485.
- [10] RYBÁČEK, V. *Chmelařství*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980. 426 s. ISBN neuvedeno.
- [11] VENT, L. *Zelené zlato*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [12] KARABÍN, M., BRÁNYIK, T., KRULIŠ, R., DVOŘÁKOVÁ, M., DOSTÁLEK, P. Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarství. *Chemické listy*, 103, 721-728. 2009.
- [13] BASAŘOVÁ, G., ČEPIČKA, J. *Sladařství a pivovarství*. SNTL, Praha 1986. 256 s. ISBN 05-080-86.
- [14] MATOULKOVÁ, D., ŠAVEL, J. Pivovarství a taxonomie pivovarských kvasinek. *Kvasný průmysl*, 53, 206-214. 2007.
- [15] MATOULKOVÁ, D. Klasifikace a význam kvasinek využívaných v pivovarské technologii. Rigorózní práce. MU Brno, 2010.
- [16] ROP, O., HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.

- [17] JIRKŮ, V., PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V. *Speciální kvasné výroby*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1986. 274 s. ISBN neuvedeno.
- [18] ALBL, V. *Výroba sladu a piva*. 1. vyd. Plzeň: Institut výchovy a vzdělání MZVŽ ČR ve spolupráci s Plzeňskými pivovary, 1990. 368 s. ISBN 80-7105-003-2.
- [19] PELIKÁN, M., DUDÁŠ, F., MÍŠA, D. *Technologie kvasného průmyslu*. 2. vyd. Brno: MZLU, 2004. 135 s. ISBN 80-7157-578-X.
- [20] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [21] HUTKINS, R. W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Ames: Blackwell Pub., 2006, 473 s. ISBN 978-081-3800-189.
- [22] ZÁKON č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. *Vyhláška č. 335/1997 Sb., pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí*.
- [23] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., DAVÍDEK, D., MÍKOVÁ, K., PÁNEK, J., POKORNÝ, J. *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 str. ISBN 80-86659-02-3.
- [24] KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*, 2, 40-42. 2005.
- [25] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 42-49. 1994.
- [26] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 257-275. 2008.
- [27] SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675-69. 1996.
- [28] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231. 1996.
- [29] KALAČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-230. 2005.
- [30] SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P., 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., de PALENCIA, P. F., CORBI, A., TRIP, H., LOLKEMA, J. S. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S95-S100. 2010.

- [31] McCABE-SELLERS, B. J., STAGGS, C. G., BOGLE, M. L. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S58–S65. 2006.
- [32] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 229, 533–538. 2009.
- [33] AYMERICH, T., MARTÍN, B., GARRIGA, M., VIDAL-CAROU, M. C., BOVER-CID, S., HUGAS, M. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 40–49. 2006.
- [34] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1400–1406. 2007.
- [35] BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25, 269–277. 2008.
- [36] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 21–29. 2006.
- [37] PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226, 225–231. 2007.
- [38] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., KLČOVSKÁ, P., MRKVIČKA, V., DOLEŽALOVÁ, M., KRÁČMAR, S. Formation of biogenic amines by gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*, 121, 203–206. 2010.
- [39] BAIXAS-NOGUERAS, S., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage. *European Food Research and Technology*, 217, 164–167. 2003.
- [40] TORREA, D., ANCÍN, C. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4895–4899. 2002.
- [41] CARUSO, M., FIORE, C., CONTURSI, M., SALZANO, G., PAPPARELLA, A., ROMANO, P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 159–163. 2002.
- [42] BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 185–189. 2001.

- [43] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 112-119. 2011.
- [44] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DVORAN, J., KAROVIČOVÁ, J., BUCHTOVÁ, V. Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov nektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Science*, 17, 15-21. 1998.
- [45] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých baktérií za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Science*, 16, 53-56. 1997.
- [46] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 105-117. 2010.
- [47] GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETTI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*, 16, 609-616. 2005.
- [48] EMBORG, J., DALGAARD, P. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 226-233. 2008.
- [49] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486. 2007.
- [50] TEN BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J., HUIS IN'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84. 1990.
- [51] ROIG-SAGUÉS, A.X., RUIZ-CAPILLAS, C., ESPINOSA, D., HERNÁNDEZ, M. The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. 2009.
- [52] KALÁČ, P., GLÓRIA, M.B.A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. 267-309. 2009.
- [53] KALÁČ, P., KRŮŽEK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 123-128. 2003.
- [54] ERZETTI, M., MARCONI, O., BRAVI, E., PERRETTI, G., MONTANARI, L., FANTOZZI, P. HAACP in the malting and brewing production chain: Mycotoxin, nitrosamine and biogenic amines risks. *Italian Journal of Food Science*, 21, 211-230. 2009.

- [55] BUIATTI, S., BOSCHELLE, O., MOZZON, M., BATTISTUTTA, F. Determination of biogenic amines in alcoholic and non-alcoholic beers by HPLC. *Food Chemistry*, 52, 199-202. 1995.
- [56] IZQUIERDO-PULIDO M., HERNÁNDEZ-JOVER, T., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3159-3163. 1996.
- [57] SLOMKOWSKA, A., AMBROZIAK, W. Biogenic amine profile of the most popular Polish beers. *European Food Research and Technology*, 215, 380-383. 2002
- [58] KALAČ, P., HLAVATÁ, V., KŘÍŽEK, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry*, 58, 209-214. 1997.
- [59] TANG, T., SHI, T., QIAN, K., LI, P., LI, J., CAO, Y. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*, 877 (5-6), 507-512. 2009.
- [60] LORET, S., DELOYER, P., DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*, 89, 519-525. 2005.
- [61] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W. H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, 208, 418-423. 1999.
- [62] YEĞİN, S., ÜREN, A. Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. *Food Chemistry*, 111, 983-987. 2008
- [63] LASEKAN, O. O., LASEKAN, W. O., Biogenic amines on traditional alcoholic beverages produced in Nigeria. *Food Chemistry*, 69, 267-271. 2000.
- [64] IZQUIERDO-PULIDO M., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines formation during malting and brewing. *Journal of Food Science*, 59, 1104-1107. 1994.
- [65] ROMERO, R., BAGUR, M. G., SÁNCHEZ-VIÑAS, M., GÁZQUEZ, D. The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 162-167. 2003.
- [66] IZQUIERDO-PULIDO, M., FONT-FÁBREGAS, J., VIDAL-CAROU, C. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. *Food Chemistry*, 54, 51-54. 1995.
- [67] HAAKENSEN, M., SCHUBERT, A., ZIOLA, B. Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 56-60. 2009.
- [68] IZQUIERDO-PULIDO M., FONT-FÁBREGAS, J., CARCELLER-ROSA, J.-M., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, C. Biogenic amine changes related to lactic acid bacteria during brewing. *Journal of Food Protection*, 59, 175-180. 1996.

- [69] IZQUIERDO-PULIDO, M., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C. Effect of tyrosine on tyramine formation during beer formation. *Food Chemistry*, 70, 329-332. 2000.
- [70] ANLI, R. E., VURAL, N., DEMIRAY, S., MERT, B. Biogenic amine content consumed in Turkey and influence of storage conditions on biogenic amine formation. *Journal of the Institute of Brewing*, 112, 267-274. 2006
- [71] LORENCOVÁ E., BUŇKOVÁ L., PLEVA P., BUŇKA F., MATOULKOVÁ D., DRÁB V. *In vitro* produkce biogenních aminů technologicky významnými bakteriemi mléčného kvašení. In: *Sborník Konference Proteiny 2011*. 3.-4.5.2011. Zlín, s. 70-74. 2011.
- [72] CORTACERO-RAMÍREZ, S., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of biogenic amines in beers nad brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100, 383-389. 2007.
- [73] DUŠKOVÁ, M. *Změny obsahu biogenních aminů v průběhu výroby piva a jeho skladování*. Diplomová práce. UTB ve Zlíně. 2010.
- [74] IZQUIERDO-PULIDO, M., CARCELLER-ROSA, J.-M., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, C. Tyramine formation by *Pediococcus* spp. during beer fermentation. *Journal of Food Protection*, 60, 831-836. 1997
- [75] PATSIAS, A., CHOULIARA, I., PALEOLOGOS, E. K., SAVVAIDIS, I., KONTOMINAS, M. G. Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4 °C. *European Food Research and Technology*, 223, 683-689. 2006.
- [76] KALÁČ, P., ŠVECOVÁ, S., PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry*, 77, 349-351. 2002.
- [77] MORET, S., SMELA, D., POPULIN, T., CONTE, L. S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, 89, 355-361. 2005.
- [78] KOMPRDA, T., NEZNALOVÁ, J., STANDARA, S., BOVER-CID, S. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*, 59, 267-276. 2001.
- [79] SUZZI, G., GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54. 2003.
- [80] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, P., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116, 365-370. 2009.
- [81] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování, *Chemické listy*, 98, 432-437. 2004.

- [82] RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology*, 218, 237-241. 2006.
- [83] RUIZ-CAPILLAS, C., CARBALLO, J., COLMENERO, F. J. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*, 75, 397-405. 2007.
- [84] LANDETE, J. M., FERRER, S., POLO, L., PARDO, I. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1119-1124. 2005.
- [85] KOMPRDA, T., DOHNAL, V., ZÁVODNÍKOVÁ, R. Contents of some biologically active amines in a Czech blue-vein cheese. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 428-440. 2008.
- [86] VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 71, 259-266. 2000.
- [87] LATORRE-MORATALLA, M. L., VECIANA-NOGUÉS, T., BOVER-CID, S., GARRIGA, M., AYMERICH, T., ZANARDI, E., IANIERI, A., FRAQUEZA, M. J., PATARATA, L., DROSINOS, E. H., LAUKOVÁ, A., TALON, R., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, 107, 912-921. 2008.
- [88] KALÁČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science*, 73, 1-11. 2006.
- [89] FERREIRA, I. M. P. L. V. O., PINHO, O. Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *Journal of Food Protection*, 69, 2293-2303. 2006.
- [90] SUZZI, G., GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54. 2003.
- [91] EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26.
- [92] VALLY, H., THOMPSON, P. J. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addiction Biology*, 8, 3-11. 2003.
- [93] DI FUSCO, M., FEDERICO, R., BOFFI, A., MACONE, A., FAVERO, G., MAZZEI, F. Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 707-716. 2011.
- [94] DE BORBA, B. M., ROHRER, J. S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1155, 22-30. 2007.
- [95] ADAMS, M.R., MOSS, M.O. *Food Microbiology*. 3. ed. RSC Publishing, 2008. 463 p. ISBN 978-0-85404-284-5.



- [96] WILSON, C. L. *Microbial Food Contamination*. 2. ed. CRC Press Taylor & Francis Group, 2008, 607 p. ISBN 978-0-8493-9076-0.
- [97] LARQUÉ, E., SABATER-MOLINA, M., ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23, 87-95. 2007.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní aminy
MAO	Monoaminoxidáza
DAO	Diaminoxidáza
HMT	Histidinmetyltransferáza
BMK	Bakterie mléčného kvašení
BAI	Index biogenních aminů

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

- Obr. 1. Příklad  $\alpha$ -hořkých kyselin vyskytujících se v rostlině chmele str. 14
- Obr. 2. Některé taxonomické změny technologicky významných kvasinek str. 16
- Obr. 3. Tvorba biogenních aminů z aminokyselin str. 27

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Obsah biogenních aminů (mg/l) v pivech	str. 31
Tabulka 2. Výskyt biogenních aminů (mg/kg) v surovinách pro výrobu piva	str. 32
Tabulka 3. Charakteristika analyzovaných vzorků piv	str. 39
Tabulka 4. Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) v lehkých a výčepních pivech	str. 44
Tabulka 5. Obsah biogenních aminů (mg/l) v lehkých a výčepních pivech	str. 46
Tabulka 6. Změna pH lehkých a výčepních piv během skladování	str. 49
Tabulka 7. Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) v ležácích	str. 50
Tabulka 8. Obsah biogenních aminů (mg/l) v ležácích	str. 52
Tabulka 9. Změna pH ležáků během skladování	str. 54
Tabulka 10. Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) ve speciálních pivech	str. 55
Tabulka 11. Obsah biogenních aminů (mg/l) ve speciálních a ochucených pivech	str. 57
Tabulka 12. Změna pH speciálních a ochucených piv během skladování	str. 58