

Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií mléčného kvašení v procesu výroby piva

Kristýna Zapletalová, DiS.

Bakalářská práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Zapletalová, DiS.**
Osobní číslo: **T15939**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií mléčného kvašení v procesu výroby piva**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- 1. Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů, produkce biogenních aminů.**
 - 2. Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.**
 - 3. Pivo jako zdroj substrátů pro rozvoj dekarboxyláza-pozitivní mikroflóry.**
 - 4. Biogenní aminy v pivu.**
 - 5. Možnosti snižování obsahu biogenních aminů v pivu.**
-

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] **BASAŘOVÁ, Gabriela.** Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [2] **KALAC, Pavel a Martin KRÍŽEK.** A review of biogenic amines and polyamines in beer. Journal of the Institute of Brewing. 2003, roč. 109, s. 123-128. ISSN: 2050-0416.
- [3] **SILLA-SANTOS, Hortensia S.M.** Biogenic amines: their importance in food. International Journal of Food Microbiology. 1996, roč. 29, s. 213-231. ISSN: 0168-1605.
- [4] **SHALABY, Ali R.** Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International. 1996, roč. 29, s. 675-690. ISSN: 0963-9969.
- [5] **CAPLICE, Elizabeth a Gerald F. FITZGERALD.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 1999, roč. 50, s. 131-149. ISSN: 0168-1605.

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

Datum zadání bakalářské práce: **3. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **5. května 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



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



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

Příjmení a jméno: KAPLETALOVA KRISTÝNA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 5. 5. 2014

Kapletalova

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá faktory, které mohou ovlivnit dekarboxylázovou aktivitu bakterií mléčného kvašení během procesu výroby piva. Působením těchto bakterií vznikají z aminokyselin biogenní aminy, které jsou považovány za kontaminanty a mohou negativně ovlivnit zdraví konzumenta. Bakterie mléčného kvašení jsou důležitou složkou mikroflóry fermentovaných potravin, ovšem v procesu výroby piva mohou, coby kontaminanty, ovlivnit kvalitu hotového výrobku a jeho senzorické vlastnosti. Nejčastějšími kontaminanty v pivovarské výrobě jsou zástupci rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus*.

Tvorbu biogenních aminů ovlivňuje dostupnost aminokyselin v substrátu, přítomnost bakterií schopných dekarboxylace, hodnota pH, teplota, přítomnost kyslíku a etanolu, obsah hořkých chmelových látek a doba zrání a skladování. Z biogenních aminů jsou nejčastěji zastoupeny tyramin, histamin, kadaverin, putrescin a agmatin.

Klíčová slova: biogenní aminy, bakterie mléčného kvašení, dekarboxylace, pivo, *Lactobacillus*

ABSTRACT

This thesis deals with factors that can influence the decarboxylase activity of lactic acid bacteria in beer production. By acting of these bacteria, are generated biogenic amines from amino acids, which are considered to be contaminants and can have an adverse effect on the health of consumers. Lactic acid bacteria are an important part of the microflora of fermented foods, but in the beer production process they can, as a contaminant, affect the quality of the finished product and its sensory properties. The most common contaminants in brewing production are representatives of the genus *Lactobacillus* and *Pediococcus*.

The availability of amino acids in the substrate, the presence of decarboxylase positive bacteria, pH, temperature, presence of oxygen and ethanol, number of bitter hop substances and aging and storage affect the formation of biogenic amines. The most common biogenic amines are tyramine, histamine, cadaverine, putrescin and agmatine.

Keywords: biogenic amines, lactic acid bacteria, decarboxylation, beer, *Lactobacillus*

Mé poděkování patří paní Ing. Evě Lorencové, PhD. za její pomoc, poskytnutí materiálů k bakalářské práci a velkou trpělivost. Dále děkuji panu Ing. Aleši Přinosilovi z Pivovaru Záhlinice za jeho čas a rady a v neposlední řadě patří můj velký dík rodině, za jejich podporu a trpělivost během mého psaní bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ, PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.1 AMINOKYSELINY	12
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ DEKARBOXYLACÍ.....	12
1.3 BIOGENNÍ AMINY.....	13
1.3.1 Produkce biogenních aminů v potravinách	14
1.3.2 Vliv biogenních aminů na zdraví člověka.....	14
1.4 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	17
1.4.1 Rozdělení bakterií mléčného kvašení dle typu fermentace	18
1.4.2 Použití bakterií mléčného kvašení v potravinářství	19
2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU	21
2.1 TEPLOTA	21
2.2 PŘÍTOMNOST MIKROORGANISMŮ SCHOPNÝCH DEKARBOXYLACE	22
2.3 HODNOTA PH	23
2.4 AKTIVITA VODY.....	23
2.5 KONCENTRACE SOLÍ	24
2.6 PŘÍTOMNOST KYSLÍKU A CO ₂	25
2.7 PŘÍTOMNOST ETANOLU	26
2.8 OBSAH HOŘKÝCH CHMELOVÝCH LÁTEK	26
2.9 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ SUROVINY	27
2.10 DOBA ZRÁNÍ A SKLADOVÁNÍ PIVA	27
3 PIVO JAKO ZDROJ SUBSTRÁTŮ PRO ROZVOJ DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍ MIKROFLÓRY	28
3.1 PIVO JAKO ZDROJ NUTRIENTŮ	28
3.1.1 Zdroj dusíku	28
3.1.2 Zdroje uhlíku	29
3.1.3 Vitaminy důležité pro růst a enzymovou aktivitu	30
3.1.4 Dostupnost kyslíku v souvislosti s čerpáním substrátů.....	32
4 BIOGENNÍ AMINY V PIVU	33
4.1 BIOGENNÍ AMINY V SUROVINÁCH PRO VÝROBU PIVA.....	34
4.1.1 Slad.....	34
4.1.2 Chmel	35
4.1.3 Voda	35
4.2 VÝVOJ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU BĚHEM VÝROBY A SKLADOVÁNÍ	35

5	MOŽNOSTI SNIŽOVÁNÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU	37
5.1	OVLIVNĚNÍ MNOŽSTVÍ MIKROORGANIZMŮ PRODUKUJÍCÍCH BIOGENNÍ AMINY	37
5.1.1	Kulturní kvasinky	37
5.1.2	Slad	38
5.1.3	Mikrobiologická stabilizace piva	40
5.1.4	Vliv délky skladování balených piv	41
	ZÁVĚR	42
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43
	SEZNAM OBRÁZKŮ	55
	SEZNAM TABULEK.....	56

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou organické sloučeniny, vyskytující se převážně v potravinách, které obsahují bílkoviny a volné aminokyseliny. Množství BA, které se vyskytuje převážně ve fermentovaných potravinách a alkoholických nápojích, je sledováno hlavně z toxikologického hlediska. Vysoká koncentrace BA totiž může vést ke zdravotním problémům spotřebitele (Kalač a Křížek, 2003, s. 123).

BA vznikají dekarboxylázovou aktivitou některých mikroorganismů. Mezi ty patří gram-pozitivní a gramnegativní bakterie různých rodů a druhů a dále pak kvasinky, které mohou produkovat alifatické polyaminy (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin). Mezi mikroorganismy s významnou dekarboxylázovou aktivitou se řadí laktobacily, pediokoky, enterokoky a bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* (Linares et al., 2011, s. 693).

V pivovarském průmyslu jsou obávané kontaminanty z řad mikroorganismů laktobacily a pediokoky. Pivo jako takové vykazuje nepříznivé podmínky pro rozvoj většiny mikroorganismů. Důvodem jen nízké pH, nízký obsah kyslíku, přítomnost CO₂, hořkých látek a etanolu. Ovšem mléčné bakterie, mezi které patří i výše zmíněné laktobacily a pediokoky, dokážou těmto vlivům odolávat. Některé kmeny laktobacilů vykazují toleranci vůči hořkým chmelovým látkám a mohou tedy v pivu růst a množit se. Jejich činností vznikají nejen BA, ale také způsobují nežádoucí sensorické změny. Bakterie mléčného kvašení (BMK) nejsou považovány za kontaminanty jen ve speciálních kyselých belgických pivech, při jejichž výrobě se přítomnost laktobacilů považuje za žádoucí (Basařová et al., 2010, s. 323–332; Spitaels et al., 2014, s. e95384).

Kromě výše zmíněných faktorů ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů také dostupnost aminokyselin v substrátu, teplota a doba zrání a skladování (Linares et al., 2012, s. 2–6).

Nejčastěji zastoupené BA v pivu jsou tyramin, histamin, kadaverin, putrescin a agmatin. Pro zdravé jedince nepředstavuje běžné množství BA v potravinách riziko, ovšem jejich nadměrný příjem může způsobit zdravotní komplikace. Proto je důležité, aby bylo jejich množství v potravinách co nejnižší (Linares et al., 2012, s. 1).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ, PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ

1.1 Aminokyseliny

V potravinách jsou aminokyseliny, prekurzory biogenních aminů (BA), součástí proteinů, ze kterých mohou být uvolňovány autolytickou nebo bakteriální proteolýzou (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Jsou základní složkou všech živých buněk a tudíž základní stavební jednotkou. Mezi jejich další funkce patří např. syntéza mnoha biologicky významných látek, účast na regulaci translace a transkripce, ovlivňování sekrece hormonů či zajišťování transportu přes buněčnou membránu (Holeček, 2006, s. 181).

Reakce, které se uplatňují při metabolismu většiny aminokyselin, jsou:

- deaminace (odstranění aminoskupiny; $-NH_2$)
- dekarboxylace (odstranění karboxylové skupiny; $-COOH$)
- transaminace (reverzibilní přenos aminoskupiny z 2-aminokyseliny na 2-oxokyselinu)
- přenos jednovuhlíkatých zbytků pomocí tetrahydrofolátu (Holeček, 2006, s. 181 a 182).

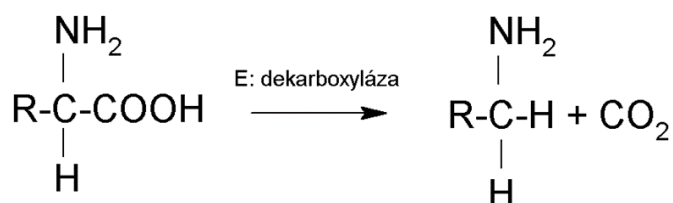
1.2 Vznik biogenních aminů dekarboxylací

Dekarboxylace je reakce, při které dochází k odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny v molekule aminokyseliny za vzniku aminu (Obr. 1). Jedná se o katalyzovaný proces za přítomnosti enzymů oxidoreduktáz a lyáz (dekarboxylázy). K nejznámějším dekarboxylázám se řadí pyruvátdekarboxyláza a dekarboxylázy aminokyselin. Pyruvátdekarboxyláza produkuje při alkoholové fermentaci acetaldehyd a dekarboxylázou aminokyselin vznikají BA (Kodíček, 2004, s. 171).

K bakteriím, které jsou schopny dekarboxylázové aktivity, se řadí zástupci rodů *Bacillus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Photobacterium*, *Escherichia coli* a některé bakterie mléčného kvašení, např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*,

Tetragenococcus, *Vagococcus* a *Weisella* (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Todar [online], 2008).

Mezi nejrizikovější mikrobiální kontaminanty piva patří rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Druhy *Lb. brevis*, *Lb. lindneri* a *P. damnosus* jsou uváděny jako nejvíce rizikové a jako nejčastější kontaminanty hotového piva. Ovšem i mezi těmito druhy bakterií jsou značné rozdíly v jejich schopnosti kazit pivo. Zatímco např. některé kmeny *Lb. brevis* jsou schopny v pivu růst a pomnožovat se, jiné kmeny takovou schopnost nemají (Sakamoto a Konings, 2003, s. 107-109). Dekarboxyláza-pozitivní kmeny, které jsou schopné tvořit BA, najdeme kromě zmiňovaného *Lb. brevis* také mezi zástupci druhů *Lb. buchneri*, *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Pediococcus damnosus* či *P. parvulus* (Ancín, González, Jiménez, 2008, s. 257–275).



Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin (Velíšek, 2002)

1.3 Biogenní aminy

BA jsou nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny tvořené především dekarboxylací aminokyselin nebo aminací či transaminací aldehydů a ketonů (Zorníková [online], 2012). Jsou to organické sloučeniny, které se běžně podílí na metabolických procesech v živých tkáních a vykazují různé biologické účinky. Vlivem nežádoucího rozkladu bílkovin mohou být indikátorem kažení potravin (Křížek a Kalač, 1998, s. 151).

BA mohou být:

- alifatické (polyaminy) – putrescin, kadaverin, spermin, spermidin
- aromatické – tyramin, fenylethylamin
- heterocyklické – histamin, tryptamin (Buňka et al., 2012, s. 213)

1.3.1 Produkce biogenních aminů v potravinách

V nízkých koncentracích jsou BA přirozenou složkou řady potravin. Ve vyšších množstvích se vyskytují např. ve fermentovaných potravinách, kde vznikají činností mikroorganismů. Jsou především v kysaném zelí, zrajících uzeninách, sýrech, vínu a pivu. BA mohou vznikat díky působení enzymů nebo vysokých teplot (anonym1, MZ [online]).

V potravinářských provozech je sledování BA zdrojem cenných informací. Ve fermentovaných potravinách sice tvoří jejich přirozenou složku, nicméně mohou být i indikátorem nežádoucí mikrobiální činnosti. U nefermentovaných výrobků je výskyt aminů známkou nežádoucích rozkladných procesů dané poživatiny (např. masa či mořských ryb). Obsah aminů je také ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování (Kolářová [online], 2012).

Hlavními předpoklady pro vznik BA jsou dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů produkujících dekarboxylační enzymy (dekarboxylázy) a vhodné podmínky pro růst bakterií a produkci enzymů. Mezi faktory, které ovlivňují tvorbu BA, patří teplota, hodnota pH, aktivita vody, koncentrace solí, technologie zpracování suroviny, druh kontaminující mikroflóry, doba zrání a skladování atd. Optimální teplota pro vznik aminů je 5 – 38 °C (Komprda, 2004, s. 145; Suková [online], 2006).

1.3.2 Vliv biogenních aminů na zdraví člověka

BA a polyaminy jsou látky, které jsou pro organismus nepostradatelné a v běžných množstvích nepředstavují pro zdravé osoby žádný problém. Jsou nezbytnými součástmi živých buněk, kde plní biologické funkce (Tab. 1). Jsou důležitým zdrojem dusíku pro syntézu hormonů (fenyletylamin), alkaloidů (halucinogenní účinky), nukleových kyselin a proteinů. Ovšem jejich nadměrný příjem vede k různým reakcím v organismu včetně nebezpečí alimentární intoxikace (Silla-Santos, 1996 s. 213-231; Shalaby, 1996, s. 675-690).

Např. histamin se v lidském těle vyskytuje přirozeně jako součást živých buněk a bazofilních granulocytů. Odtud je uvolňován do krevního oběhu v případě, že je tělo vystaveno alergické reakci. Ve zdravém lidském organismu zastává histamin několik funkcí jako řízení sekrece žaludeční kyseliny, přenos nervového vzruchu, sekrece hlenu, hojení ran, imunomodulace a krvetvorby. Histamin je nejtoxičtějším BA v potravinách. Vyskytuje se v rybách, sýrech, víně a masných výrobcích. Často je otrava histaminem způsobená

konzumací makrelovitých ryb – skombrotoxikóza. Mezi odezvy organismu, které jsou vyvolány histaminem, patří vazodilatace, kontrakce hladké svaloviny, změny krevního tlaku, bolesti, tachykardie a arytmie (Zorníková [online], 2012).

Polyaminy mají alifatickou strukturu a řadí se mezi bazické sloučeniny. V živých organizmech mají funkci zejména při buněčném růstu. Zásoba (pool) PA vzniká biosyntézou nebo činností mikroflóry gastrointestinálního traktu, nebo jsou získávány potravou. Patří mezi ně putrescin, spermin, spermidin a agmatin. Jsou toxikologické z toho důvodu, že mají schopnost vytvářet karcinogenní N-nitroso sloučeniny (Larqué, Sabater-Molina, Zamora, 2007, s. 87-95).

Citlivost jedince na množství BA se může lišit v závislosti na mnoha faktorech, které ovlivňují činnost detoxikačního systému. Jedná se zvláště o věk, zdravotní stav, užívání farmakologických přípravků, konzumace alkoholu, celková přijatá množství BA, nebo jejich vzájemné spolupůsobení apod. (Silla-Santos, 1996; s. 223 a 224; Stadler a Linenback, 2009, s. 341).

Reakci mohou vyvolat zrající sýry, fermentované produkty, ryby, čokoláda, víno a některé druhy ovoce (Svačina, 2008, s. 279 a 280). Jejich nadměrný příjem může mít za následek zdravotní problémy jako je např. bolest hlavy, zvyšování či snižování krevního tlaku, zvracení a problémy s dýcháním. Jejich škodlivý vliv se může projevit i v kombinaci s určitými léčivy. Menší množství BA je metabolizováno bez negativních reakcí organismu (Buňka et al. 2012, 213; anonym1, MZ [online]).

Během skladování potravin (především ryb a masa) vzniká nejčastěji histamin, kadaverin, putrescin a tyramin (anonym1, MZ [online]).

Tabulka 1: Biogenní aminy a jejich fyziologický význam (Velíšek, 2002)

Aminokyselina	BA	Účinky
Histidin	Histamin	Lokální tkáňový hormon Vliv na krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy Účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
Lysin	Kadaverin	Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribosomy) Stimulace diferenciac buněk Rostlinný hormon
Arginin (ornitin/citrulin)	Putrescin	Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribosomy) Stimulace diferenciac buněk Rostlinný hormon
Arginin	Agmatin	Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribosomy) Stimulace diferenciac buněk Rostlinný hormon
Fenylalanin	Fenyletylamin	Prekurzor tyraminu
Tyrozín	Tyramin	Prekurzor dopaminu Lokální tkáňový hormon Vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
3,4 dihydroxyfenylalanin (DOPA)	Dopamin	Mediátory sympatických nervů
Tryptofan	Tryptamin	Lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy) Vliv na krevní tlak, peristaltiku střev a na psychické funkce

V pivu je z BA nejvíce zastoupen tyramin, který se spolu s histaminem většinou vyskytuje v pivech s vyšší kyselostí, kde jsou vhodné podmínky pro činnost BMK. Nejvyšší toxikologické riziko představují spontánně kvašená belgická piva a svrchně kvašená piva. Bezpečnostní limit pro příjem BA vyskytující se v pivu byl stanoven na 20 mg/l, a to pro součet: histamin+fenyletylamin+tyramin+kadaverin (Kalač a Křížek, 2003, s. 124 a 125).

1.4 Produkce biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení je skupina grampozitivních bakterií s charakteristickými morfolo- gickými, metabolickými a fyziologickými znaky. Jsou to nesportující, nepohyblivé, kataláza negativní tyčinky a koky, které produkují kyselinu mléčnou jako jeden z hlavních fermentačních produktů sacharidů. Řadí se mezi mikroaerofilní (tzn., že projevují slabý růst na vzduchu, ale lépe rostou při redukované koncentraci O₂) až fakultativně aerobní bakterie (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 2).

BMK se vyskytují převážně v místech s vysokou koncentrací sacharidů, aminokyselin, vitaminů a vyšší tenzí CO₂. Jsou součástí bakteriálního osídlení respiračního systému a tvoří dominantní část mikroflóry trávicího a urogenitálního traktu člověka i zvířat (Štegerová et al., 2007, s. 39-42).

K potravinářsky významným rodům BMK patří *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* (Das a Goyal, 2012, s. 758).

I když jsou BMK v některých potravinářských odvětvích žádoucí a nenahraditelné, v pivovarském průmyslu se řadí mezi kontaminanty, které znehodnocují hotový produkt. Jedná se zejména laktobacily a pediokoky. Netýká se to pouze některých speciálních belgických piv, do kterých jsou bakterie rodu *Lactobacillus* přidávány záměrně (Spitaels et al. [online], 2014). Z piva byly izolovány druhy *Lb. backii*, *Lb. brevis*, *Lb. brevisimilis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. lindneri*, *Lb. paucivorans*, *Lb. plantarum* z rodu *Pediococcus* pak *P. acidilactici*, *P. clausenii*, *P. damnosus* *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*

a *P. pentosaceus*. Ne všechny z těchto druhů jsou ale schopny kazit pivo, protože u mléčných bakterií je typický výskyt kmenů kazících pivo i kmenů nekazících (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 78 a 79). Například některé kmeny *Lactobacillus brevis* mohou v pivu růst a množit se díky rezistenci k hořkým látkám chmele, zatímco jiné kmeny nevykazují žádnou aktivitu a tím nenarušují mikrobiální jakost piva (Suzuki et al., 2006, 174).

Mléčným bakteriím je také prokázána produkce BA. Zejména některé kmeny laktobacilů, např. *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* a *Lb. buchneri*, se řadí mezi významné producenty tyraminu (Bover-Cid, 1999, s. 33).

V pracích Lorencové (2015) a Mahovské (2015) byly sledovány kmeny bakterií *Lb. brevis* a *Lb. plantarum* za odlišných podmínek kultivace (obsah etanolu, hořkých chmelových látek, vliv teploty a hodnoty pH). Lze konstatovat, že tyto faktory mají u některých kmenů laktobacilů vliv na jejich dekarboxylázovou aktivitu a dochází k potlačení produkce BA. Některé kmeny ale citlivost vůči těmto podmínkám nevykazují a k produkci BA u nich dále dochází. Mezi BA, které byly zkoumanými kmeny vyprodukovány, byly tyramin, spermin, spermidin a putrescin (Lorencová, 2015; Mahovská, 2015).

1.4.1 Rozdělení bakterií mléčného kvašení dle typu fermentace

BMK můžeme dělit podle jejich způsobu fermentace. Je sledováno kvašení při nelimitujícím množství glukózy a růstových faktorů (množství aminokyselin, vitamínů apod.) a při omezeném množství kyslíku. Dle typu fermentace tak rozlišujeme BMK homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 6).

Mezi zástupce obligátně homofermentativních patří bakterie rodu *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*) (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 6; (anonym2, [online])).

Tyto bakterie neumí metabolizovat pentózy, tudíž substrátem pro homofermentativní bakterie jsou pouze hexózy. Fermentace hexóz na pyruvát probíhá přes Embden-Meyerhofovu dráhu a produktem této fermentace je kyselina mléčná, jakožto hlavní a jediný produkt (Buňková, 2016; Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 12).

Zástupce fakultativně heterofermentativních najdeme mezi těmito bakteriálními druhy *Lactobacillus casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* (anonym2, [online]).

Fermentace hexóz heterofermentativními bakteriemi obvykle probíhá homofermentativní cestou a výsledkem je produkt kyselina mléčná. Některé kmeny ovšem přeměňují zkvasitelné cukry na kyselinu mléčnou a další produkty (CO₂, etanol) heterofermentativním kvašením (Černíková a Míšková, 2010, s. 81; Felis a Dellaglio, 2007, s. 48).

Pentózy jsou fosfoketolázovou dráhou zkvašovány na kyselinu mléčnou a octovou. V procesu se netvoří CO₂ a nejsou nutné dehydrogenační kroky k vytvoření xylulóza-5-

fosfátu. Acetylfosfát tedy není redukován na etanol, ale vzniká kyselina octová (Buňková, 2016).

Mezi zástupce obligátně heterofermentativních patří bakterie *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*) (Salminen, Wright a Ouwehand, 2004, s. 6; anonym2, [online]).

Tato skupina bakterií metabolizuje hexózy na kyselinu mléčnou a další produkty, jako např. etanol, CO₂ a H₂, a pentózy, ze kterých jsou výsledné produkty kyselina mléčná a octová (Sedláček, 2007, s. 245). Charakteristickým znakem tohoto druhu bakterií je tvorba plynu z glukózy (Stiles a Holzapfel, 1997, s. 15).

1.4.2 Použití bakterií mléčného kvašení v potravinářství

BMK jsou důležitou složkou mikroflóry fermentovaných potravin, do kterých se záměrně přidávají jako startovací kultury. Používají se při výrobě sýrů, jogurtů, fermentovaných masných výrobků a zeleniny, červeného vína (Bernardeau et al., 2008, s. 278-280).

Fermentace sacharidů na kyselinu mléčnou způsobuje pokles hodnoty pH až na hodnotu 4,0 a inhibuje tím růst většiny mikroorganismů. Absence těchto mikroorganismů (nezřídka i patogenních) má za následek prodloužení trvanlivosti a zdravotní nezávadnosti potravin. Produkty metabolismu BMK navíc dodávají fermentovaným potravinám sensorické vlastnosti, jako je chuť, vůně a vzhled (Reddy et al., 2008, s. 25).

I když v hotovém pivu není většina mikroorganismů schopna přežít, mohou významně ovlivnit jeho sensorické vlastnosti. V provozech sladoven a pivovarů mohou mikroorganismy kontaminovat zařízení a suroviny a svým působením tak značně ovlivnit kvalitu hotového piva (Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 139-155).

Mezi nejčastější a nejzávažnější kontaminanty v pivovarské výrobě patří právě BMK, a to hlavně zástupci rodů *Lactobacillus* a *Pediococcus* (Tab. 2) (Sakamoto a Konings, 2003, s. 105). Některé z kmenů mohou v pivu růst díky toleranci k chmelovým látkám, vůči kterým je většina BMK citlivá. Znehodnocení piva způsobuje hlavně tvorba zákalu a produkty metabolismu BMK. Na mikrobiálním kažení piva se více než 50 % podílí *Lactobacillus brevis* (Hollerová a Kubizniaková, 2002, s. 309; Sakamoto a Konings, 2003, s. 108 a 109).

Hotové pivo představuje nepříznivé prostředí pro rozvoj většiny mikroorganismů, a to z těchto důvodů:

- obsahuje velmi málo využitelných živin, protože většina jednoduchých cukrů byla spotřebována kulturními kvasinkami během hlavního kvašení
- obsahuje alkohol, hořké chmelové látky a oxid uhličitý
- má nízké pH (3,8 – 4,7) a nízký obsah kyslíku (Sakamoto a Konings, 2003, s. 109)

Laktobacily nemusí být v procesu výroby piva považovány pouze za nežádoucí kontaminanty, ale mohou být žádané v některých typech piv, konkrétně ve spontánně kvašených pivech typu lambik. Tato piva pochází z Belgie a kyselé a spontánní kvašení jim dodává žádoucí kyselou chuť, která je způsobena tvorbou kyseliny mléčné (Spitaels et al. [online], 2014).

Tabulka 2: Bakterie mléčného kvašení produkující biogenní aminy (Ancín, González, Jiménez, 2008)

BA	BMK	BA	BMK
Histamin	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus 30a</i> <i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i>	Putrescin	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus 30a</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus buchneri</i>
Tyramin	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Fenyletylamin	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU

Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou potřebují ke svému růstu a množení vhodné podmínky. Produkci BA výrazně ovlivňuje dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů a syntézu dekarboxyláz. Tvorba BA v potravinách je dále ovlivněna faktory jako je teplota, hodnota pH, doba skladování, aktivita vody atd. (Komprda, 2004, s. 145). Mezi produkty s vyšším množstvím BA se řadí fermentované potraviny a alkoholické nápoje, jako je pivo či víno (Kalač a Křížek, 2003, s. 123).

Dostupnost substrátů je jedním z významných faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů. Důležitá je jak přítomnost volných aminokyselin, tak i přítomnost využitelných cukrů v prostředí (Šavel, 2010, s. 8). Dostupnosti substrátů v pivu je věnována samostatná kapitola (viz kapitola 3 Pivo jako zdroj substrátů pro rozvoj dekarboxyláza-pozitivní mikroflóry).

2.1 Teplota

Tvorba BA bakteriemi je značným způsobem ovlivněna teplotou. Za optimální teplotu pro růst většiny bakterií produkujících dekarboxylázy se považuje 20 – 37 °C (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Z tohoto pohledu by byly pro tvorbu BA příhodnější podmínky produkce svrchně kvašených piv, než těch spodně kvašených. Dále následuje dozrávání.

Pokud při dokvašování vzroste teplota nad 5 °C, vzroste i počet kontaminujících mikroorganismů. Obzvláště pediokoky (zejména *P. damnosus*) jsou schopny růst a množit se i při velmi nízkých teplotách a při dokvašování mohou vytvořit značné množství diacetylu (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 80).

Skladování piva za nízkých teplot omezuje rozvoj dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů, jejich aktivitu a tím i produkci BA (Linares et al., 2012, s. 6). I když mohou některé aminy vznikat i při teplotách 0 – 10 °C, má se za to, že nízké teploty tvorbě BA nepřejí (Juneja a Sofos, 2010, s. 252).

K zamezení rozvoje kontaminující mikroflóry v pivu (divoké kvasinky, plísně a bakterie) se využívá pasterace. Vzhledem k tomu, že jednotlivé mikroorganismy vykazují různou

teplotní odolnost, je nutné vyvinout teplotu k pasteraci okolo 60 °C po dobu 20 minut (Šavel, 2010, s. 9).

2.2 Přítomnost mikroorganismů schopných dekarboxylace

Jak již bylo zmíněno, k bakteriím, které jsou schopny dekarboxylázové aktivity, se řadí rody *Bacillus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Photobacterium* a *Escherichia coli*. Z bakterií mléčného kvašení jsou to např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Pediococcus* (Károvičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Nejčastěji se dekarboxylázová aktivita projevuje u laktobacilů, pediokoků, enterokoků a čeledi *Enterobacteriaceae* (Halász et al., 1994, s. 42).

Dekarboxylázovou aktivitu ovlivňují faktory, které tvorbu BA v potravinách buď podpoří, nebo ji zamezují. Důležitá je např. teplota, hodnota pH, dostupnost substrátu atd. (viz další kapitoly). Svou roli hraje také přítomnost pyridoxalfosfátu. Je to fosforylovaná forma vitamínu B6 a je nezbytný pro funkci řady enzymů, které metabolizují aminokyseliny (Özogul a Özogul, 2007, s. 385; Buňková et al., 2011, s. 975, wikipedia [online], 2016).

K mikroorganismům kazícím pivo patří zástupci rodů *Lactobacillus* a v menší míře *Pediococcus*. Nejvíce rizikové jsou druhy *Lb. brevis*, *Lb. lindneri* a *P. damnosus* (Sakamoto a Konings, 2003, s. 107-109).

Kromě surovin využívaných k výrobě piva a BMK, které jsou považovány za kontaminanty, mohou za přítomnost BA v pivu i kvasinky, které se účastní fermentačního procesu (Kalač a Křížek, 2003, s. 125 a 126).

Pivovarské kvasinky jsou schopny produkovat BA putrescin, kadaverin, agmatin, histamin, tyramin, spermin a spermidin a obsah BA se může zvyšovat opakovaným používáním kvasinek. Jako důvod tvorby BA je udávána autolýza kvasinkových buněk. Putrescin, spermin a spermidin kvasinky produkují i jako běžné produkty metabolismu (Kalač, Křížek, Hlavatá, 1997, s. 209-214; Halász, Baráth, Holzapfel, 2008, 418-423). Zvýšená produkce BA kvasinkami je v procesu výroby piva nežádoucí (Landete, Ferrer, Polo, Pardo, 2005, s. 1119-1124).

Jen vysoce kvalitní kvasinky zaručují optimální kvašení a požadované senzorycké vlastnosti konečného produktu (chuť, barvu, vůni, obsah alkoholu) (Berlowska et al., 2014, s. 289).

2.3 Hodnota pH

Hodnota pH je považována za klíčový faktor ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu a tvorbu BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 1400). Vzhledem k tomu, že dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je nejvyšší při pH 4 – 5,5 (Gardini et al., 2001, s. 111), jsou fermentované výrobky, včetně piva, vhodným prostředím pro tvorbu BA (Lorencová et al., 2012, s. 2086).

Vzhledem k relativně nízkému pH (3,8 – 4,7) je pivo obecně považováno za mikrobiálně stabilní (Suzuki et al., 2006, s. 173). I přesto v něm k produkci BA dochází, a to z důvodu přítomnosti kmenů bakterií, kterým vyhovuje kyselější růstové prostředí. *Laktobacilum* nejvíce vyhovuje pH 6,4 až 5,4, ale některé acidofilní kmeny rostou i při pH 4,0 až 3,6 (Vos et al., 2009, s. 470). Při mírném snížení pH dochází u acidotolerantních BMK ke zvýšení produkce BA. Pokud ale dojde k výraznějšímu snížení pH, počet mikroorganismů se sníží, což ovšem neznamená i snížení vyprodukovaných BA (Linares et al., 2012, s. 6).

Obzvláště náchylná k rozvoji i méně odolné mikroflóry jsou piva s vyšším pH, málo prokvašená, s vyšším obsahem aminokyselin a zkvasitelných cukrů a s nižším obsahem CO₂ (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 80).

2.4 Aktivita vody

Mikroorganismy potřebují vodu pro svůj růst a rozmnožování. Mikrobiální buňka obsahuje 80 – 90 % vody, v níž probíhají všechny chemické reakce (anonym3, MZ [online]).

Dosažitelná (volná) voda není v potravinovém substrátu chemicky vázána a její hodnoty se pohybují od 0,00 po 1,0. Minimální hodnota pro bakterie působící kažení potravin je 0,90 – 0,91 a při a_w nižší než 0,60 není převážná část mikroorganismů schopna růstu (anonym3, MZ [online]).

V prostředí s nízkým obsahem vody dochází k omezenému růstu bakterií, a tím i ke snížení jejich dekarboxylázové aktivity a produkce BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 253; Křížek a Kalač, 1998, s. 157 a 158).

Vzhledem k tomu, že pivo je z více než 90 % tvořeno vodou, jeví se jako vhodné prostředí pro růst a množení bakterií. I přesto je to nápoj s poměrně vysokou mikrobiologickou stabilitou, protože hořké chmelové látky, množství etanolu, vyšší koncentrace CO₂, nízké pH,

nízký obsah živin a kyslíku jsou faktory, které výraznějšímu rozvoji kontaminující mikroflóry brání (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 78).

2.5 Koncentrace solí

Důležitý je i obsah minerálních látek a stopových prvků, kterých je v pivu přes třicet. Tyto látky pocházejí většinou ze sladu a jsou důležité mimo jiné pro správnou funkci kvasinek. Dělí se na makroelementy (Mg, K, Ca, P, S, Cl), mikroelementy (Co, B, Cd, Mo, Cu atd.), minoritní minerální látky (Fe, Zn, Mn) a kovy/polokovy (Ag, Hb, Se, Pd, As atd.). Kovy jsou důležité pro správné fungování enzymů a jejich spotřeba se zvyšuje s rostoucí koncentrací mladiny. Jako příklad lze uvést zinek, jehož nedostatek může způsobit zpomalení hlavního kvašení. Sírné sloučeniny mají pro změnu vliv na sensorické vlastnosti piva a jeho stabilitu. Důležitý je také fosfor, který je součástí nukleových kyselin či fosfolipidů (Olšovská, 2015, s. 2-3; Basařová et al. 2010, s. 263).

Minerální látky jsou obsaženy hlavně v klíčku a aleuronových vrstvách zrna ječmene. Při máčení ječmene jsou minerální látky uvolňovány do vody, ale znovu se v zrnu tvoří během sladování. Látky jsou extrahovány ze sladu do varní vody při rmutování (Briggs, 1998, s. 191).

Množství minerálů z chmele je zanedbatelné vzhledem k množství, která jsou k výrobě piva používána. Chmel obsahuje K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Na (Preedy, 2009, s. 364).

Soli mají na produkci BA významný vliv. Vyšší koncentrace solí má za následek zvýšení osmotického tlaku v buňkách a tím snížení produkce BA. Jako příklad lze uvést snížení produkce histaminu u *Lactobacillus buchneri* při koncentraci chloridu sodného 3,5 % (v/v) a zastavení jeho tvorby při koncentraci 5,0 % (v/v). Pivo ovšem neobsahuje takové množství solí, aby k produkci BA nedocházelo (Buňková et al., 2011, s. 117; Juneja a Sofos, 2010, s. 252).

Pivo také obsahuje množství vitaminů, z nichž jsou nejvíce zastoupeny vitaminy skupiny B. Pocházejí ze surovin používaných k výrobě piva (obzvláště ze sladu) a částečně jsou produktem pivovarských kvasinek, které vitaminy tvoří během fermentace. Mezi důležité vitaminy patří B6. Metabolicky aktivní formou tohoto vitamínu je pyridoxal-5-fosfát, jenž je považován za kofaktor mnoha reakcí, včetně dekarboxylace (Olšovská et al., 2014, s. 175; Velíšek, 1999, s. 15).

2.6 Přítomnost kyslíku a CO₂

Přítomnost kyslíku má také významný vliv na vznik BA (Silla-Santos, 1996, s. 221). Zatímco aerobní mikroorganismy potřebují kyslík ke svému růstu, pro anaerobní bakterie je vysoká koncentrace O₂ toxická (Stolp, 1988, s. 22). Mezi skupinu mikroorganismů, kterým nízké koncentrace kyslíku vyhovují, patří BMK. V pivu se jedná o zástupce rodů *Lactobacillus* (fakultativně anaerobní, často mikroaerofilní) a *Pediococcus* (anaerobní) (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 336; Basařová et al., 2010, 323-325). Všeobecně se má za to, že tyto bakterie ke svému růstu kyslík nepotřebují a jeho působení má na ně negativní vliv. Stále se ale objevují nové poznatky o vlivu kyslíku na BMK a je zřejmé, že množství kyslíku, které vyžadují některé bakterie, se liší, a to nejen v rámci druhu, ale i kmene (Siezen, 2002, s. 194).

Kromě kyslíku se v pivu vyskytuje i oxid uhličitý. Vzniká během hlavního kvašení a při dokvašování a je přirozenou součástí piva. Spolu s etanolem je produktem metabolismu kvasinek, které zkvašují jednoduché cukry vytvořené při rmutování. Na míru nasycení piva CO₂ má vliv chemické složení a fyzikální vlastnosti piva. Vázání CO₂ v pivu je složitý proces, jelikož zahrnuje celou řadu dílčích vlivů. Na jeho rozpustnost v pivu má vliv teplota a tlak (při nižší teplotě a vyšším tlaku schopnost piva absorbovat CO₂ vzrůstá). Obsah CO₂ má vliv na sensorické vlastnosti piva a jeho trvanlivost. Množství CO₂ ve stáčeném pivu je obvykle mezi 5 a 10 g/l. Kromě CO₂ vyprodukovaného kvasinkami se může jednat o CO₂ přidávaný do piva během stáčení, aby se vyrovnaly ztráty vzniklé při fermentačním procesu (Lee [online], 2013; Starec [online], 2007).

Kromě toho, že CO₂ je produktem metabolismu kvasinek, vzniká i heterofermentativním kvašením mléčných bakterií, kdy spolu s ním vzniká i kyselina mléčná, etanol či kyselina octová (Vaughan et al., 2005, s. 360-361).

Množství CO₂ v pivu má významný vliv na rozvoj kontaminujících mikroorganismů. Piva s nižším obsahem CO₂ jsou více náchylná k růstu mikroorganismů (např. cizích kvasinek), které by jinak v pivu nerostly (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 80; Basařová et al., 2010, s. 332).

2.7 Přítomnost etanolu

Pivo je s koncentrací etanolu 0,5 – 10 % (v/v) poměrně stabilní, protože etanol se řadí mezi silné inhibitory růstu mikroorganismů. Z toho důvodu jsou nealkoholická piva či piva s nízkým obsahem alkoholu poměrně náchylnější k mikrobiální kontaminaci (Briggs et al., 2004, s. 607). Inhibiční účinky etanolu může posílit či oslabit hodnota pH nebo teplota (Casadei et al., 2001, s. 133).

I přesto, že se mezi BMK vyskytují etanol-tolerantní kmeny, není prokázána jejich zvýšená schopnost kazit pivo. Navíc musí BMK překonávat různé stresy, aby mohly v pivu růst a rozmnožovat se (Ziola a Ziola, 2011, s. 57).

V diplomové práci Mahovské (2015) byl sledován vliv působení etanolu a hořkých látek na dekarboxylázovou aktivitu laktobacilů. Některé kombinace etanolu a hořkých látek výrazně ovlivňovaly růst bakterií a produkci tyraminu. Zvýšení produkce BA může být zapříčiněno tím, že došlo ke snížení etanolového stresu působením hořkých látek chmele a zároveň mohly produkty metabolismu bakterií reagovat s hořkými látkami (Sigler a Matoulková, 2011, s. 7 a 8).

2.8 Obsah hořkých chmelových látek

Nejdůležitějšími složkami chmele jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly. Nositelem hořkosti chmele jsou obecně chmelové pryskyřice složené z řady chemicky podobných sloučenin, z nichž nejvýrazněji ovlivňují hořkost finálního piva stabilní izomery α -hořkých kyselin (Basařová et al., 2010, s. 36).

Tyto hořké kyseliny mají antibakteriální účinky a jejich obsah je v pivu přibližně 17 – 55 ppm. Obzvláště působí na grampozitivní bakterie, a to včetně většiny BMK. Hořké kyseliny tvoří v produktu ochrannou vrstvu proti bakteriím a zabraňují tak kontaminaci. Některé BMK jsou však vůči hořkým kyselinám rezistentní, jsou adaptované a způsobují kažení piva (nejvíce již zmiňované laktobacily a pediokoky) (Sakamoto a Konings, 2003, s. 106; Suzuki et al., 2006, s. 173-175). Ostatní zástupci BMK, jako *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*, se běžně v pivu nevyskytují, jelikož nevykazují rezistenci k hořkým chmelovým látkám (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 79).

2.9 Technologie zpracování suroviny

Na množství BA v pivu mají vliv, kromě použitých surovin (různé odrůdy sladovnického ječmene, kvasnice) i pivovarské technologie (Kalač a Křížek, 2003, s. 125). BA se tvoří v mladině, během kvašení i během skladování, přičemž s délkou skladování se zvyšuje jejich obsah (Kalač, Křížek a Hlavatá, 1997, s. 214; Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 140). Také nedostatečná pasterace může mít za následek zvyšování množství BA, a to díky přeživším BMK. Zdrojem BMK mohou být také opakovaně používané pivovarské kvasnice (Kalač et al., 2002, s. 434).

2.10 Doba zrání a skladování piva

BA nemusí být v pivu produkovány jen v průběhu kvašení, ale také během skladování, přičemž s délkou skladování se obsah BA v pivu zvyšuje. V lahvovém pivu skladovaném několik týdnů bylo pozorováno navýšení množství histaminu, tyraminu a kadaverinu, a jako hlavním zdrojem BA byly označeny BMK. Ty se mohou do piva dostat během výroby hlavně díky opakovaně používaným kvasinkám. Na produkci BA se podílí především laktobacily, které přežily nedostatečnou pasteraci piva (Kalač a Křížek, 2003, s. 124; Ercan a Soysal, 2013, s. 401; Kalač et al., 2002, s. 434).

Kromě laktobacilů se mezi významné producenty BA při skladování piva řadí některé bakterie rodu *Pediococcus*. Jejich působením vzniká především tyramin a jeho množství záleží na počtu bakterií ve skladovaném pivu. Při vyšším počtu bakterií (5×10^4 CFU/ml) byla produkce tyraminu mezi 15 – 25 mg/l (Izquierdo-Pulido, Carceller-Rosa, Mariné-Font, Vidal-Carou, 1997, s. 831).

3 PIVO JAKO ZDROJ SUBSTRÁTŮ PRO ROZVOJ DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍ MIKROFLÓRY

Pivo, jakožto slabý alkoholický nápoj, je tvořeno z 92 – 93 % vodou, 4 % alkoholu, 0,5 % CO₂ a 2,5 – 3,5 % zbytkového extraktu. Zbytkový extrakt je pak tvořen látkami z použitých surovin (sladu a chmele) a produkty vzniklémi metabolickou činností kvasinek. Pivo obsahuje asi 3 tisíce chemických látek a zatím pouze cca 800 jich bylo identifikováno (Racek [online], 2009).

Složení piva ovlivňuje množství a kvalita použitých surovin a způsob jejich zpracování. Již zmíněný zbytkový extrakt obsahuje bílkoviny, nukleové kyseliny, lipidy, sacharidy (části nezkrvašených a nezkrvašitelných cukrů) a další látky, jako např. minerály (draslík, hořčík, fosfor, sodík), rozpustnou vlákninu, hořké a aromatické látky z chmele, antioxidanty a vitamíny (především vitamíny skupiny B) (Racek [online], 2009; Kellner [online], 2012).

V surovinách pro výrobu piva se také nachází BA, které primárně pocházejí ze sladu a řadí se mezi ně putrescin, spermin, spermidin a agmatin. Další skupina BA, do které patří histamin, tyramin a kadaverin, zpravidla ukazuje na aktivitu kontaminujících bakterií během výroby piva. Mezi významné producenty BA se řadí i BMK (Olšovská, 2015, s. 4). Mléčné bakterie mohou provázet celý proces výroby piva. Vzhledem k adaptaci některých kmenů na hořké chmelové látky je mladina ideálním prostředím pro jejich růst a množení. Vyhovuje jim klesající množství kyslíku v mladině, snižování pH a množství vitamínů, aminokyselin a dalších látek, které uvolňují kvasinky do prostředí během hlavního kvašení (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 80).

3.1 Pivo jako zdroj nutrientů

3.1.1 Zdroj dusíku

Dusíkaté látky tvoří 6 – 9 % zbytkového extraktu (Kellner [online], 2012). Ve výrobě piva představují rozmanitý komplex sloučenin od vysokomolekulárních složek až po jednoduché aminokyseliny a ve výrobě piva mohou mít jak pozitivní význam (plnost chuti piva, pěnivost pěny, barva piva), tak i negativní (stará chuť piva, zákaly, tvorba BA). Literatura uvádí velké rozdíly v zastoupení jednotlivých skupin proteinů (Basařová et al., 2010,

s. 19). Hulín et al. (2008, s. 328) uvádí zastoupení jednotlivých skupin bílkovin v ječmeni následovně: albuminy 12,1 %, globuliny 8,4 %, prolaminy 25 % a gluteliny 54,5 %. Při klíčení ječmene se tvoří makropeptidy, polypeptidy, nižší peptidy a aminokyseliny, které se poté v mladině výrazně redukují (Basařová et al., 2010, s. 20).

Asi 30 % dusíkatých látek tvoří volné aminokyseliny a nižší peptidy, přičemž aminokyseliny jsou hlavním zdrojem využitelného dusíku. Kvasinky využívají aminokyseliny v určitém pořadí a v rozdílné míře. Při vyšším počtu aminokyselin mohou vznikat nežádoucí metabolity kvasinek, které nepříznivě ovlivňují organoleptické vlastnosti piva. Vysokomolekulární látky jsou vylučovány během hlavního kvašení vlivem klesajícího pH adsorpcí na kvasinky a na bublinky CO₂ (Basařová et al., 2010, s. 260 a 359).

Dostupnost volných aminokyselin a přítomnost mikroorganismů pozitivních na dekarboxylázy jsou jedny z podmínek pro vznik BA. Volné aminokyseliny, ze kterých dekarboxyláza pozitivní organizmy mohou syntetizovat BA, jsou buď přímo součástí piva, nebo mohou být uvolněny z bílkovin v důsledku proteolytické aktivity mikroorganismů. BMK produkuje proteolytické enzymy, které uvolňují aminokyseliny do prostředí a následně je využívají pro svůj růst. Proteolytické enzymy jsou produkovány různými kmeny BMK. Je pravděpodobné, že kmeny s vysokou aktivitou proteolytických enzymů snižují až o polovinu produkci BA v potravinách (Halász et al., 1994, s. 44; Jedrychowski, 2010, s. 305).

3.1.2 Zdroje uhlíku

V procesu sladování jsou škrobová zrna, která se nachází v endospermu sladu, degradována jen částečně – asi z 15 až 18 %. Během rmutování pak amylolytické enzymy (α a β -amyláza) přemění škrob na zkvasitelné cukry, jichž je asi 64 – 77 % z celkového množství sacharidů (Preedy, 2009, s. 294 a 295; Basařová et al., 2010, s. 14).

Mezi sacharidy vyskytující se v pivu patří monosacharidy glukóza a fruktóza, maltóza a další oligosacharidy (sacharóza, laktóza, maltotrióza, maltotetróza), pak také dextriny a glukany. Zkvasitelné cukry glukóza a maltóza jsou kvasinkami spotřebovány jako první. Nejvíce zastoupeným sacharidem v mladině je maltóza, která se zde vyskytuje v množství 56 – 59 g/l. Během hlavního kvašení prokvasí asi 75 % přítomné maltózy (Preedy, 2009, s. 295 a 296; Šavel, 2010, s. 9).

Zkvasitelné sacharidy jsou kromě kvasinek spotřebovávány i mléčnými bakteriemi, což zlepšuje jejich růst a dekarboxylázovou aktivitu. Bylo zjištěno, že optimální koncentrace glukózy je v rozmezí 0,5 – 2,0% (w/v), zatímco hladiny nad 3% (w/v) inhibují tvorbu enzymů (Halász et al., 1994, s. 44).

Zkvasitelné cukry podporují růst i dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Při obsahu glukózy 3,0 % (w/v) dochází k inhibici BA, zatímco obsah 0,5 – 2,0 % (w/v) je pro tvorbu BA ideální (Silla-Santos, 1996, s. 219).

Dextriny a škrob je schopen fermentovat *Lb. brevis* a může tím docházet k hlubšímu prokvašení piva. Je to nejčastěji se vyskytující bakteriální kontaminant a zahrnuje kmeny kazící pivo, ale i ty, které na kvalitu produktu nemusí mít vliv. Z pediokoků dokáže fermentovat dextriny a škrob *Pediococcus dextrinicus* (Vaughan a kol., 2005, s. 359; Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 80).

Ačkoli se BMK používají k výrobě fermentovaných potravin a nápojů po tisíciletí, je jejich schopnost využívat škrob jako jediný zdroj uhlíku zkoumána teprve posledních 30 let. Byla izolována řada kmenů amylolytických BMK, u kterých byla zkoumána jejich schopnost hydrolyzovat škrob. Do skupiny bakterií produkující α -amylázu, patří zástupci rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* a *Weissella* (Petrova et al., 2013, s. 34-37).

3.1.3 Vitaminy důležité pro růst a enzymovou aktivitu

Pro činnost kvasnic jsou velmi důležité vitaminy, protože tvoří součást některých enzymů, podporují růst buněk a umožňují látkovou výměnu. Hladinu vitaminů ovlivňuje složení kvasného substrátu a také rozdílná schopnost jednotlivých kmenů kvasnic je syntetizovat (Bendová a Kahler, 1981, s. 55). Suroviny pro výrobu mladiny (slad a chmel) jsou bohatým zdrojem vitaminů skupiny B. Mladina jako substrát pro kultivaci kvasinek, vyrobený ze sladu a chmele, obsahuje také vitaminy skupiny B (Hucker et al., 2014, s. 164) a představuje z tohoto pohledu tedy vhodné prostředí pro jejich rozvoj.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.5, v pivu jsou zastoupeny všechny vitaminy skupiny B – thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantotenová, pyridoxin, kyselina folová (listová) a kobalamin (Kellner [online], 2012). V tabulce č. 3 jsou uvedeny hodnoty vitaminu B

v kvasnicích a průměrné hodnoty vitamínu B v pivu (Basařová et al., 2010, s. 374; Olšovská et al., 2014, s. 177).

Tabulka 3: Množství vitaminů v kvasnicích a pivu

(Basařová et al., 2010; Olšovská, 2014)

Vitamin	mg/kg (lisované kvasnice)	µg/0,5 l (český ležák)
Thiamin (B1)	25-160	35
Riboflavin (B2)	20-50	125
Niacin (B3)	300-600	2500
Kyselina panthotenová (B5)	100-200	600
Pyridoxin (B6)	40-100	250
Kyselina folová (listová) (B9)	1-3	100
Kobalamin (B12)	1	1

Vitaminy jsou obecně důležitým substrátem pro mikroflóru vyskytující se v pivu, včetně laktobacilů. Jako příklad lze uvést kyselinu listovou, která podporuje růst mnohých mikroorganismů, či kyselinu panthotenovou, která je důležitá pro růst kvasinek. Pyridoxin ve vazbě s kyselinou fosforečnou je součástí enzymových systémů, které působí při transaminaci či dekarboxylaci aminokyselin (Bendová a Kahler, 1981, s. 55; Buglass, 2011, s. 971).

Pro růst některých druhů BMK je potřebná přítomnost vitaminů skupiny B, protože si je samy nedokáží syntetizovat (Matoulková a Kubizniaková, 2015, s. 76). Zástupci *Pediococcus* sp. vyžadují v růstovém prostředí jako vitaminy skupiny B, kdy některé vyžadují jen přítomnost riboflavinu a kyseliny listové (Papagiani a Anastasiadou, 2009, s. 4). Naopak laktobacily si vitaminy skupiny B povětšinou dokáží, stejně jako kvasinky, produkovat samy (např. riboflavin, thiamin nebo kobalamin (Turková, 2007, s. 9-15; LeBlanc et al., 2011, s. 1297).

3.1.4 Dostupnost kyslíku v souvislosti s čerpáním substrátů

Nízká koncentrace kyslíku vytváří pro většinu mikroorganismů v pivu nehostinné prostředí (Suzuki et al., 2006, s. 175). To ale nemusí platit pro některé mléčné bakterie, které jsou fakultativně anaerobní či přesněji aerotolerantní (viz kapitola 1.4).

Kvasinky patří mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, a tudíž využívají sacharidy oxidačním i fermentačním metabolismem (Basařová et al., 2010, s. 261).

Kyslík je kvasinkami vyžadován v počátečních fázích fermentace mladiny pro biosyntézu membránových sterolů a mastných kyselin, takže zakvašenou mladinu je třeba provzdušnit. Po několika hodinách je kyslík rozpuštěný v mladině kvasinkami spotřebován a další kvašení probíhá anaerobně. V anaerobních podmínkách se mění glukóza na kyselinu pyrohroznovou a ta se poté přetváří na etanol. Jako další produkt metabolismu kvasinek vzniká CO₂ (Preedy, 2009, s. 295; Šavel, 2010, s. 9).

Vzhledem k tomu, že většina kvašení probíhá anaerobně, jsou i nepatrné stopy kyslíku na kvašení dobře patrné (Basařová et al., 2010, s. 261).

Během hlavního kvašení klesá kromě hladiny kyslíku i hodnota pH a kvasinky uvolňují do prostředí množství vitaminů, aminokyselin a dalších látek. Ty spolu s anaerobním prostředím dávají vhodné podmínky a zapříčiňují růst a množení BMK, které mohou způsobovat kažení piva (Vaughan et al., 2005, s. 356; Basařová et al., 2010, s. 261).

4 BIOGENNÍ AMINY V PIVU

Množství a výskyt BA v pivu závisí mimo jiné na surovinách, které byly k vaření použity, na způsobu vaření piva a jeho dalších úpravách. Ze sladu a chmele pochází putrescin, agmatin, spermin a spermidin, které se dají považovat za běžnou složku piva, zatímco histamin, tyramin a kadaverin vznikají během procesu výroby (Kalač a Křížek, 2003, s. 123).

Pivo patří do skupiny potravin a nápojů, která může způsobovat zdravotní problémy, a to především u konzumentů, kteří užívají léky inhibující detoxikační enzymy. U těchto jedinců může dojít k náhlému zvýšení krevního tlaku, a to i po konzumaci nealkoholického piva. Důvodem je tyramin, jehož příjem v koncentraci vyšší 6 mg během čtyř hodin se považuje pro jedince léčené psychofarmaky za nebezpečný. Alkohol a i další BA obsažené v pivu účinky tyraminu umocňují. U zdravých konzumentů nejsou toxické účinky BA v těchto nízkých koncentracích prokázány (Kalač et al., 2002, s. 431).

Značné množství tyraminu a histaminu se tvoří v lahvovém pivu působením mléčných bakterií, které přežily nedostatečnou pasteraci. Mezi tyto bakterie patří především laktobacily. BA se ale tvoří i v plechovkách a sudech. BMK mohou kontaminovat pivo buď během výroby, nebo jsou nedostatečně eliminovány při filtraci či nedostatečně inaktivovány při pasteraci. Koncentrace BA může sloužit jako indikátor mikrobiálního stavu při výrobě piva. U některých druhů piv se mohou vyskytnout vysoké koncentrace aminů kvůli použití pšenice, jelikož BMK jsou součástí fermentační mikroflóry. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.5, zdrojem bakterií, které produkují BA, mohou být i kontaminované pivní kvasinky (Kalač et al., 2002, s. 434).

Celkový obsah BA v evropských pivech se pohybuje v jednotkách až desítkách mg/kg (Tab. 3). Klinicky významné množství BA mohou obsahovat světlá lahvová piva i piva čepovaná. Hlavním BA obsaženým v pivu je tyramin (Kalač a Křížek, 2003, 123 a 124).

Tabulka 4: Množství biogenních aminů v pivu (Kalač a Křížek, 2003)

Biogenní amin	Obsah BA v mg/kg
Tyramin	0 – 68
Histamin	0 – 22
Kadaverin	0 – 40
Putrescin	2 – 15
Spermidin	0 – 7
Spermin	0 – 4
Agmatin	1 – 41
Fenyletylamin	0 – 8
Tryptamin	0 – 5

4.1 Biogenní aminy v surovinách pro výrobu piva

4.1.1 Slad

Jednou z hlavních surovin pro výrobu piva je obilný slad, což je za specifických podmínek naklíčená a usušená obilovina (Basařová, 2010, s. 3).

Dříve se pivo připravovalo ze sladů různých obilovin. V současné době je nejvyužívanější ječmen setý (*Hordenum sativum L.*). Je jednou z nejstarších kulturních plodin a zároveň slouží jako základní surovina pro výrobu sladu v tradičních pivovarských (Basařová, 2010, s. 3).

Kvalita a odrůda sladu má významný vliv i na hladinu BA, především putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu (Halász, Baráth a Holzapfel 1999, s. 423). Při klíčení ječného zrna, v rámci výroby sladu, se pak dále pomalu zvyšují hodnoty histaminu, tryptaminu, fenyletylaminu a kadaverinu a dále se zvyšuje obsah putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu (3-5,5 mg/kg/den) (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

Dle studie Kalače, Hlavatého a Křížka (1997, s. 212) slad obecně obsahuje poměrně vysoká množství histaminu (7-17 mg/kg) a tyraminu (20-24 mg/kg). Nicméně Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 423) tvrdí, že přítomnost histaminu ve sladu z ječmene je spíše výsledkem dekarboxylázové aktivity mikrobiální kontaminace sladu.

Podmínky sladování, jako je intenzita klíčení, teplota a odrůda ječmene značně ovlivňují konečnou hladinu BA (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

4.1.2 Chmel

V dusíkatých látkách chmele jsou BA přítomny jen ve velmi nízkých koncentracích. Vyskytuje se v něm histidin, tyramin, putrescin, spermidin, spermin a agmatin, které ale většinou vytékají během chmelovaru (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

Jak již bylo zmíněno výše, hořké látky v chmelu obsažené mohou působit proti vzniku BA (viz kapitola 2.8). Chmel tedy není významným zdrojem BA v pivu a ještě dokáže produkci BA díky obsahu α -hořkých kyselin potlačit.

Některé kmeny laktobacilů jsou ovšem k hořkým látkám rezistentní a i přes nepříznivé podmínky mohou v pivu růst a množit se (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 336-337). Mezi tyto bakterie patří např. *Lb. brevis* a *Lb. buchneri* (Basařová et al., 2010, s. 324).

4.1.3 Voda

Voda je při výrobě piva považována za surovinu, která neobsahuje žádné BA (Kalač a Křížek, 2003, s. 125)

Pivovarství patří mezi průmyslová odvětví s největší spotřebou vody. Voda v pivovarství se dělí do tří skupin podle účelu použití, a to na varní vodu; mycí a sterilační vodu; provozní vodu. Voda použitá pro extrakci sladu a chmele musí splňovat požadavky na vodu pitnou a nemůže být tedy ani významným zdrojem dekarboxyláza-pozitivní mikroflóry (Basařová et al. 2010, s. 84).

4.2 Vývoj obsahu biogenních aminů v pivu během výroby a skladování

Vzhledem k obsahu BA ve sladu a chmelu, lze očekávat jejich výskyt i v mladině. Množství BA je ovlivněno odrůdou sladovnického ječmene a způsobem sladování. Jsou termostabilní a nepodléhají degradaci ani za vysokých teplot. Jejich obsah se dále může měnit během procesu kvašení, kdy byla prokázána produkce především histaminu, tyrami-

nu a kadaverinu a zároveň je pozorován výrazný pokles putrescinu a agmatinu. Za hlavní producenty aminů lze pokládat BMK (Kalač a Křížek, 2003, s. 125; McHugh, 2003, s. 55).

O výskytu a pomnožování mikroorganismů v jednotlivých fázích výroby rozhodují kulturační podmínky, neboť složení růstového prostředí se postupně mění činností kulturních kvasinek. Po zakvašení rychle klesá obsah rozpuštěného kyslíku a hodnota pH, což potlačuje rozvoj mladinových bakterií a podporovány jsou bakterie mléčné. Mladinové bakterie jsou převážně fakultativně anaerobní a jsou většinou z čeledi Enterobacteriaceae (rody *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* atd.) a dále rody *Pectinatus*, *Bacillus* či *Micrococcus*. Případnou kontaminaci mladiny je možno částečně potlačit velkým zvýšením zákvasné dávky pivovarských kvasnic, což má ale negativní dopad na kvalitu piva (Basařová et al., 2010, s. 319 a 355). Nárůst BMK je podporován i proto, že kvasinky vylučují do mladiny růstové faktory (vitaminy, dusíkaté báze, aminokyseliny apod.) (Basařová et al., 2010, s. 329).

Bakterie, které se mohou účastnit fermentace piva, jsou zástupci rodů *Pediococcus* a *Lactobacillus* (např. *P. damnosus*, *Lb. frigidus*, *Lb. brevissimilis*, *Lb. brevis* (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

BA nejsou tvořeny BMK výhradně při hlavním kvašení, ale mohou se tvořit i v lahvovém pivu či sudech během skladování, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.10. Dle Kalače et al. (2002) se tyramin a histamin tvoří působením BMK (obzvláště laktobacilů), které přežily pasterací. Těmito bakteriemi může být pivo kontaminováno během procesu výroby a poté nejsou dostatečně odstraněny filtrací nebo pasterací (Kalač et al., 2002, s. 434).

5 MOŽNOSTI SNIŽOVÁNÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU

Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.1, množství BA v pivu závisí na použitých surovinách, na způsobu vaření piva, na délce skladování a dalších úpravách, kdy může být pivo kontaminováno dekarboxyláza-pozitivními bakteriemi.

Mezi způsoby, kterými lze zabránit kontaminaci piva mikroorganismy, patří vysoký stupeň hygieny v pivovarském provozu a dodržování správných technologických postupů (např. správná teplota v celém procesu výroby piva) (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

5.1 Ovlivnění množství mikroorganismů produkujících biogenní aminy

Jako největší potenciální zdroj kontaminující mikroflóry při výrobě piva je udáván slad, a to vzhledem k množství, které se pro výrobu piva používá. Může být zdrojem jak bakterií, tak i plísní, které mohou ve výsledku ovlivnit kvalitu piva. Dalším možným zdrojem kontaminace jsou pivovarské kvasnice. Ty mohou být buď zdrojem kontaminujících bakterií, nebo mohou být samy považovány za kontaminanty, pokud nejsou dostatečně odfiltrovány při stáčení piva (Basařová et al., 2010, s. 311; Hollerová a Kubizniaková, 2002, s. 309). Cílem mikrobiologické stabilizace piva je odstranění těchto kontaminantů, které mohou pivo sensoricky znehodnocovat, a také zamezení případné produkce BA.

5.1.1 Kulturní kvasinky

Vliv na kvalitu piva a průběh kvašení má kvasničný kmen a zákvasná dávka. Výšší dávky mohou ovlivnit rychlost a hloubku prokvašení, a částečně mohou také potlačit tvorbu aromatických metabolitů. Podle požadavků na vlastnosti vyráběného piva volíme kmen kvasinek (Basařová et al., 2010, s. 357). Je důležité správně posoudit kvalitu kmene, protože jen tak lze zajistit dobrý fermentační výkon kvasinek. Mezi požadavky na kvalitu kvasinek patří dobrý fyziologický stav, životaschopnost (schopnost kontinuální replikace) a vitalita (udržování efektivní metabolické aktivity). Pro jednotlivé kmeny pivovarských kvasinek jsou charakteristické různé genetické vlastnosti, fyziologie a fermentační kapacita (Berlowska et al., 2014, s. 289 a 290).

Definované vlastnosti pivovarských kvasnic by měly zůstat neměnné i po opakovaném použití (Basařová et al., 2010, s. 235).

I když se během hlavní fermentace zvyšuje hladina tyraminu, histidinu a kadaverinu, není jejich produkce připisována pivovarským kvasinkám. Jak již bylo v této bakalářské práci zmíněno několikrát, tvorba BA v pivu je ve velké míře přisuzována BMK. Tyramin a tryptamin jsou během hlavního kvašení produkovány pediokoky, zejména *P. damnosus*.

Redukovat množství pediokoků, a tím i obsah tyraminu v pivu, je možné promýváním kontaminovaných kvasinek kyselinou fosforečnou před jejich dalším použitím (Kalač a Křížek, 2003, s. 125 a 126). Praní kvasnic kyselinou fosforečnou patří do tzv. kyselého praní, jehož cílem je snížit bakteriální kontaminaci kvasinek. V silně kyselém prostředí bakterie hynou, zatímco kvasinky přežívají. I přesto se ale při tomto praní zvyšuje podíl mrtvých kvasinek a zhoršuje se jejich aktivita. Navíc je prokázána odolnost některých bakterií vůči okyselení. K praní se používají organické (vinná, citronová, mléčná) i anorganické kyseliny (sírová a již zmiňovaná fosforečná) (Basařová et al., 2010, s. 376).

Po získání kvasnic z mladiny je důležité jejich správné skladování do doby, než budou opět nasazeny. Cílem je zajistit co nejmenší fyziologické změny, zachovat jejich dobrou vitalitu, zabránit poškození a mutacím a také bakteriální kontaminaci. I přes tato opatření se ale kvalita kvasnic během jejich několikanásobného použití postupně snižuje (Basařová et al., 2010, s. 377). Kvasnice lze použít 4x – 5x v závislosti na jejich vitalitě a prodělaných změnách.

Při použití čerstvých kvasnic je omezena tvorba nežádoucích produktů vzhledem k tomu, že mikrobiologická čistota a kvalita jsou kontrolovány ve speciálních laboratořích. Sušené kvasnice se před použitím rehydratují ve sterilní vodě a poté se aplikují do mladiny. I když se v pivu mohou vyskytnout během procesu výroby nežádoucí kontaminanty, nemusí dojít k jejich výraznějšímu rozvoji. Mikrobiologicky čisté kvasinky s kontaminanty soutěží o substráty a tím brání jejich výraznějšímu rozvoji (anonym 5, 2016).

5.1.2 Slad

Pro výrobu piva se používají zejména slady z jarních ječmenů. Vlastnosti různých odrůd výrazně ovlivňují kvalitu sladu a vyrobeného piva. Tyto vlastnosti mohou být ovlivněny i úpravami technologie máčení a klíčení ječmene popř. jiné obiloviny. Ozimé ječmeny se

dnes používají jen jako alternativa a doplněk potřeby sladu při nedostatku jarního ječmene (Basařová et al., 2010, s. 4 a 5).

Odrůd jarního i ozimého ječmene se ve světě pěstuje velké množství. Odrůda musí být schválena a registrována a až poté se rozšiřuje její pěstování. Během několika let je pak tato odrůda vyřazena, protože dochází ke ztrátám jejích specifických vlastností (např. výnos, odolnost proti chorobám, klíčivost, specifické chemické složení, atd.) (Basařová et al. 2010, s. 4 a 5).

Slad je zdrojem BA putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu a vzhledem k malým množstvím chmele a kvasinek v pivu, je surovinou s nejvyššími hodnotami BA. Tyto hodnoty jsou ovlivněny i podmínkami sladování (klíčivost, teplota) a také odrůdou ječmene. Hodnoty histidinu, fenyletylaminu, tryptaminu a kadaverinu se zvyšují během pětidenního nakličování ječmene pomalu, zatímco u putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu je pozorováno zvýšení o 3 až 5,5 mg/kg/den (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

Slad může být napaden i různými druhy plísní, jako např. *Aspergillus*, *Fusarium* či *Rhizopus*. Největší hrozbu tedy nepředstavuje pouze z hlediska množství BA, ale i z mikrobiálního hlediska (Briggs et al., 2004, s. 608).

Jednotlivé odrůdy ječmene obsahují různá množství dusíkatých látek. Vzhledem k tomu, že aminokyseliny jsou prekurzory BA, může mít výběr vhodné odrůdy i vliv na množství aminů v pivu. Optimální hodnota obsahu bílkovin v ječmeni se pohybuje v rozmezí 10,5 – 11,7 %, přičemž za hraniční se považuje $\geq 12,5$ % a $\leq 9,5$ %. Z 18 odrůd ječmene testovaných na množství dusíkatých látek Sedláčkem a Psotou (2015) spadalo 14 do rozmezí 10,5 – 11,7 %. Vyšší nebo nižší obsah bílkovin vyžaduje úpravu technologie sladování (např. při vyšším množství bílkovin v ječmeni přijímá zrno hůře vodu, což znamená delší máčení a tím i zvýšenou produkci BA) (Prokeš, 2000, s. 279; Sedláček a Psota, 2015, s. 265 a 266). Z toho důvodu je třeba používat vhodné odrůdy sladovnického ječmene a klást důraz i na správný technologický postup při jeho zpracování na slad.

Snížení obsahu BA lze docílit i přidáním dalších obilovin jakožto doplňků sladu. Jako zdroj fermentovatelných sacharidů lze použít např. pšeničný slad, kukuřici, proso či rýži, ve které nebyla přítomnost BA prokázána (Stadler a Lineback, 2009, s. 331; Kalač a Křížek, 2003, 125).

5.1.3 Mikrobiologická stabilizace piva

I když je pivo mikrobiologicky poměrně stabilní, mohou se v něm vyskytovat nežádoucí mikroorganismy, které mohou mít za následek znehodnocení finálního produktu. Mezi kontaminující mikroorganismy lze zařadit bakterie (včetně mléčných), plísně, divoké kvasinky a kulturní kvasinky, které se v pivu vyskytnou po provedené filtraci. Do piva se tyto mikroorganismy mohou dostat z kontaminovaných surovin či během procesu výroby. Mohou způsobovat nežádoucí sensorické změny a při jejich masivním výskytu mohou úplně znehodnotit konečný produkt (Basařová et al., 2010, s. 310-328; Hollerová a Kubizniaková, 2002, s. 309).

I přesto, že pivovarský proces není aseptický a úplné odstranění škodlivých mikroorganismů ze všech pivovarských materiálů není technicky možné. Je možné minimalizovat rizika kontaminace přijetím řady strategií. Prvním krokem je získání nezávadných surovin, které jsou následně vhodně technologicky zpracovány. Je třeba dodržovat hygienická pravidla i při balení piva, kdy je třeba zajistit čistotu zařízení, jako jsou nádrže, potrubí, spoje a další příslušenství. Udržování veškerého zařízení, které přichází do styku s pivem nebo jeho prekurzory, by mělo být jeden z nejdůležitějších aspektů řízení výroby piva.

K běžným způsobům snížení počtu nežádoucích mikroorganismů z piva patří filtrace a pasterace. Mikroorganismy lze odstranit průchodem piva přes membrány s póry, které jsou menší než průměr mikroorganismů (filtrace), nebo můžeme pivo zahřát na teplotu 60 °C po dobu 20 minut, kdy dojde k inaktivaci mikroorganismů (pasterace) (Šavel, 2010, s. 11).

V pivovarství se využívá několik druhů filtrace, přičemž v současnosti nejrozšířenější je křemelinová filtrace. Křemelinové filtry jsou tvořeny nerezovou nádobou, uvnitř které jsou síta nebo filtrační svíčky opatřené jemnými štěrbinami. Částice křemeliny vytváří na filtrační přepážce účinnou filtrační vrstvu. Moderní filtrační systémy používají i membránové filtry nevyžadující dávkování filtračního materiálu (Basařová et al., 2010, s. 438; Šavel, 2010, s. 10). Poté následuje sekundární – koncová mikrobiologická filtrace. Je prováděna za studena a je posledním filtračním krokem před plněním piva do obalů. V prvním stupni jsou eliminovány kvasinky a ve druhém stupni jsou odfiltrovány ostatní mikroorganismy, a tím je v maximální míře zajištěna mikrobiologická stabilita a výrazné prodloužení trvan-

livosti piva. Důležitým faktorem ovšem je nulové či minimální infekční ovlivnění piva při procesu plnění (anonym4 [online], 2017).

Pasterace piva může být buď tunelová, nebo průtoková. Při tunelové pasteraci se pivo pasteruje přímo v naplněných lahvích, které prochází tunelovým pastérem. Lahve prochází zónami, kde se sprchují vodou o různé teplotě a celkově jsou v pastéru asi 1 hodinu, přičemž na teplotě 60 °C se teplota pohybuje asi 20 minut. Průtoková pasterace, při které se ohřáté pivo pohybuje v trubkovém výdržníku, je mnohem šetrnější, protože při teplotě 68 – 70 °C trvá 30 – 40 vteřin, a poté následuje ochlazení (Basařová et al., 2010, s. 490-494; Šavel, 2010, s. 11).

Pokud nežádoucí mikroorganismy (v tomto případě i kulturní kvasinky) přežijí pasteraci či filtraci, může po stočení piva nastat sekundární fermentace. Během ní dojde k pomnožení mikroorganismů a tvorbě masivní sedliny (v případě kvasinek) nebo zákalu (BMK). Při dlouhé době trvanlivosti může jejich výskyt ve finálním výrobku vést k závažným škodám. Z toho důvodu je důkladné sanitaci a biologické čistotě provozů považována velká pozornost (Hollerová a Kubizniaková, 2002, s. 309). Je třeba se vyvarovat pomnožení mikroorganismů např. v době přestávek ve stáčení, kdy se na zbytcích nedostatečně odstraněného piva mohou pomnožit bakterie, kvasinky a plísně. K prioritám by měla patřit i kvalita a mikrobiologická čistota vody používané k výrobě (Basařová et al., 2010, s. 329).

K mikrobiální stabilizaci piva přispívají také čistící a dezinfekční postupy pivovarů, obzvláště v těch, které produkují piva nepasterizovaná, piva s nízkým obsahem alkoholu nebo méně chmelená (Vaughan et al., 2005, s. 360).

5.1.4 Vliv délky skladování balených piv

BA mohou být také tvořeny působením BMK během skladování v lahvích, plechovkách nebo sudech, kdy zvýšení obsahu BA může nastat v důsledku sekundárního kvašení (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

Z výsledků práce Čechové (2012) je zřejmé, že déle skladovaná piva obsahovala vyšší množství BA. Ve sledovaných vzorcích postupně vzrůstal počet BA, a to tak, že po šedesáti dnech byl jejich obsah až 123 mg/l, po sto dnech až 252 mg/l a po 244 dnech dosahovala hodnota až 316 mg/l. K jejich produkci došlo i přes skladování hodnocených piv v chladu, a to pravděpodobně vlivem rozvoje nežádoucích mikroorganismů (Čechová, 2015).

ZÁVĚR

Vzhledem k tomu, že BA mohou i v nízkých koncentracích způsobit u citlivých jedinců zdravotní komplikace, je tato problematika v současné době intenzivně zkoumána. Zabývájí se jí české i zahraniční studie a také diplomové či dizertační práce. Tato práce se zabývala obsahem BA v pivu a faktory, které obsah BA přímo či nepřímo ovlivňují.

Ze zjištěných poznatků této bakalářské práce lze konstatovat následující:

- BA se v pivu mohou vyskytovat přirozeně (jsou součástí surovin používaných při výrobě piva), nebo mohou vznikat aktivitou kontaminující mikroflóry.
- Obsah BA v pivu ovlivňuje:
 - volba surovin – zvláště sladu, který může být zdrojem BA
 - aplikace čistých kvasničných kultur
 - minimalizace mikrobiální kontaminace procesu výroby (dodržováním správných technologických postupů, hygienických a sanitačních postupů, aplikace kyselého praní kvasnic při jejich opakovaném nasazení)
 - cílená stabilizace konečného produktu (pasterace, mikrofiltrace)
 - správné skladování výrobku
- Zástupci rodu *Lactobacillus* patří k nejobávanějším mikrobiálním kontaminantům v pivovarském provozu (vliv na produkci BA a sensorické vlastnosti finálního produktu).
- Faktory, které ovlivňují tvorbu BA mléčnými bakteriemi, jsou: teplota, hodnota pH, aktivita vody, koncentrace solí, technologie zpracování, přítomnost O₂ a CO₂, etanolu, hořkých látek a přítomnost čisté fermentující mikroflóry.

Množství BA v alkoholických nápojích není legislativně ošetřeno. I přesto, že jejich obsah v pivu a vínu je do 50 mg/l a zdravému jedinci by nemělo toto množství způsobit zdravotní komplikace, může dojít k problémům při odbourávání BA vlivem interference mezi etanolem a detoxikačním systémem. Z tohoto pohledu je více než důležité dbát na to, aby ve finálním pivu byl obsah BA co nejnižší.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen, Ana GONZÁLEZ-MARCO a Nerea JIMÉNEZ-MORENO. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2008, **48**(3), 257-275 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1080/10408390701289441. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701289441>

ANONYM, 1. Biogenní aminy. <Http://www.bezpecnostpotravin.cz> [online]. Praha: Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76472.aspx>

ANONYM, 2. Lactic Acid Bacteria – Homofermentative and Heterofermentative. <Https://foodsafety.foodscience.cornell.edu> [online]. Cornell University [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Dairy-Cultures-HomoHeteroferm-10-08.pdf>

ANONYM, 3. Aktivita vody. <Http://www.bezpecnostpotravin.cz> [online]. Praha: Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76457.aspx>

ANONYM, 4. Trvanlivost piva a jeho stabilizace – ve vztahu k filtraci. <Https://filtrace.com> [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <https://filtrace.com/clanky-a-odborne-texty/detail/58/zakladni-definice-trvanlivosti-piva/>

ANONYM, 5. *SafLager W-34/70*. Technical data sheet, 2016. Dostupné také z: <http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2016/12/SafLager-W-34703.pdf>

BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 9788070807347.

BENDOVIÁ, Olga a Miroslav KAHLER. *Pivovarské kvasinky*. 1. Praha: SNTL, 1981.

BERLOWSKA, Joanna, Dorota KREGIEL a Katarzyna RAJKOWSKA. Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast* [online]. Lodz: Institute of Fermentation Technology and Microbiology, **2014**(32), 289–300. Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3041/epdf>

BERNARDEAU, M, J VERNOUX, S HENRIDUBERNET a M GUEGUEN. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus☆. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, **126**(3), 278-285 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050700445X>

BOVER-CID, Sara a Heinrich HOLZAPFEL. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology* [online]. 1999, **53**, 33-41 [cit. 2017-05-04].

BOZKUR, Hüseyin a Çiğdem SOYSAL. Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *Journal of Food Science and Engineering* [online]. **2013**, 395-410 [cit. 2017-05-04].

BRIGGS, D. E. *Brewing: science and practice*. Cambridge, England: Woodhead Pub., 2004. ISBN 0849325471.

BRIGGS, D. E. *Malts and malting*. New York: Blackie Academic, 1998. ISBN 0412298007.

BUGLASS, Alan J. *Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley, 2011. ISBN 9780470512029.

BUŇKA, František, Pavel BUDINSKÝ, Markéta ČECHOVÁ, Viliam DRIENOVSKÝ, Vendula PACHLOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a Leona BUŇKOVÁ. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2012, **118**(2), 213-216 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1002/jib.31. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.31>

BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, **147**, 112 – 119.

BUŇKOVÁ, Leona. *Potravinářská mikrobiologie*. UTB Zlín, 2016.

CASADEI, M.A, R INGRAM, E HITCHINGS, J ARCHER a J.E GAZE. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, **63**(1-2), 125-134 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00465-7. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004657>

ČECHOVÁ, Markéta. *Monitoring obsahu biogenních aminů v lahvovaných pivech v ČR*. UTB Zlín, 2012. Diplomová práce.

ČERNÍKOVÁ, Michaela a Zuzana MÍŠKOVÁ. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 9788073187491.

DAS, Deeplina a Arun GOYAL. Lactic Acid Bacteria in Food Industry. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, s. 757 [cit. 2017-05-02]. DOI: 10.1007/978-94-007-2214-9_33. ISBN 9789400722132. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-007-2214-9_33

FELIS, Giovanna E. a Franco DELLAGLIO. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Intestinal Microbiology*. 2007, **5**, 44-61. ISSN 1466-531X.

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, **64**(1-2), 105-117 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004451>

HALÁSZ, A., Ágnes BARÁTH a Wilhelm H. HOLZAPFEL. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* [online]. 1999-5-3, **208**(5-6), 418-423 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1007/s002170050440. ISSN 14314649. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050440>

HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*

& *Technology* [online]. 1994, **5**(2), 42-49 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701>

HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006. ISBN 9788024715629.

HOLLEROVÁ, Ida a Petra KUBIZNIAKOVÁ. Monitoring G+ bakteriální kontaminace v českých pivovarech. *Kvasný průmysl. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha*, 2002, **48**(11-12), 309-313.

HUCKER, Barry, Lara WAKELING a Frank VRIESEKOOOP. Vitamins in brewing: the impact of wort production on the thiamine and riboflavin vitamer content of boiled sweet wort. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2014, **120**(3), 164-173 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1002/jib.142. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.142>

HULÍN, Petr, Pavel DOSTÁLEK a Igor HOCHEL. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chem. listy* [online]. **102**, 327-337 [cit. 2017-05-04].

IZQUIERDO-PULIDO, MARIA, JOSEP-MIQUEL CARCELLER-ROSA, ABEL MARINÉ-FONT a M. CARMEN VIDAL-CAROU. Tyramine Formation by *Pediococcus* spp. during Beer Fermentation. *Journal of Food Protection* [online]. 1997, **60**(7), 831-836 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.4315/0362-028X-60.7.831. ISSN 0362028x. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-60.7.831>

JĘDRYCHOWSKI, Lucjan. a Harry. WICHERS. *Chemical and biological properties of food allergens*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, c2010. Chemical and functional properties of food components series. ISBN 9781420058550.

JESPERSEN, L. a M. JAKOBSEN. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, **33**(1), 139-155 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01154-3. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160596011543>

JUNEJA, Vijay K. a John Nikolaos. SOFOS. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington, DC: ASM Press, c2010. ISBN 9781555814595.

KALACĚ, P., J. ŠAVEL, M. KRĚŽEK, T. PELIKÁNOVÁ a M. PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food chemistry*. 2002, **79**, 431-434. ISSN 0308-8146.

KALACĚ, Pavel, Věra HLAVATÁ a Martin KRĚŽEK. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry* [online]. 1997, **58**(3), 209-214 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0308-8146(96)00098-2. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814696000982>

KALACĚ, Pavel a Martin KRĚŽEK. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the institut of brewing*. 2003, **109**(2), 123-128. ISSN 2050-0416.

KALACĚ, Pavel, Jan ŠAVEL, Martin KRĚŽEK, Tamara PELIKÁNOVÁ a Marie PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry* [online]. 2002, **79**(4), 431-434 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00193-0. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602001930>

KALACĚ, Pavel, Jan ŠAVEL, Martin KRĚŽEK, Tamara PELIKÁNOVÁ a Marie PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry* [online]. 2002, **79**(4), 431-434 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00193-0. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602001930>

KAROVIČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, **59**, 70-79. ISSN 0931-7597.

KELLNER, Vladimír et al. *Pozitivní přínos piva ke zdraví spotřebitele* [online]. *Kvasný průmysl*, 2002, **48**, 244-248 [cit. 2017-05-08].

KELLNER, Vladimír. Pivo, vitaminy a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka. [Http://www.ceske-pivo.cz](http://www.ceske-pivo.cz) [online]. Český svaz pivovarů a sladoven, 2012 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.ceske-pivo.cz/pivo-vitaminy-dalsi-dulezite-latky-pro-vyzivu-zdravi-cloveka>

KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 9788070805510.

KOLÁŘOVÁ, Miroslava. Biogenní aminy. [Http://www.chempoint.cz](http://www.chempoint.cz) [online]. Mendelova univerzita v Brně, 2012 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy>

KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 807157757x.

KŘÍŽEK, Martin a Pavel KALÁČ. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*. 1998, **16**, 151-159. ISSN 1212-1800.

LANDETE, José M., Sergi FERRER, Lucía POLO a Isabel PARDO. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(4), 1119-1124 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1021/jf049340k. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049340k>

LARQUÉ, Elvira, María SABATER-MOLINA a Salvador ZAMORA. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition* [online]. 2007, **23**(1), 87-95 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.nut.2006.09.006. ISSN 08999007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900706003583>

LEBLANC, J.G., J.E. LAIÑO, M. Juarez DEL VALLE, et al. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2011, **111**(6), 1297-1309 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>

LEE, Robert J. Chemistry of Beer: Carbon Dioxide vs Nitrogen. *Http://www.themadscienceblog.com* [online]. 2013 [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://www.themadscienceblog.com/2013/12/chemistry-of-beer-carbon-dioxide-vs.html>

LINARES, Daniel M., Beatriz DEL RÍO, Victor LADERO, Noelia MARTÍNEZ, María FERNÁNDEZ, María Cruz MARTÍN a Miguel A. ÁLVAREZ. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, **3**, - [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00180. ISSN 1664302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00180/abstract>

LORENCOVÁ, Eva. *Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu Lactobacillus a Bifidobacterium*. UTB Zlín, 2015. Dizertační práce.

LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vladimír DRÁB, Pavel PLEVA, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Production of biogenic amines by

lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2012, **47**(10), 2086-2091 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>

MAHOVSKÁ, Iveta. *Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakteriálních kontaminant piva*. UTB Zlín, 2015. Diplomová práce.

MATOUKOVÁ, Dagmar, Petra KUBIZNIAKOVÁ a Karel SIGLER. Schopnost mléčných bakterií kazit pivo a souvislost s přítomností genů horA, horC a hitA. *Kvasný průmysl* [online]. 2012, **58**(11-12), 336-342 [cit. 2017-05-04]. ISSN 0023-5830.

MATOUKOVÁ, Dagmar a Petra KUBIZNIAKOVÁ. Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci – I. část. *Kvasný průmysl*. 2015, **61**(3), 76-88.

MCHUGH., Dennis J. *A guide to the seaweed industry*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. ISBN 9251049580.

OLŠOVSKÁ, Jana. Pivo a zdraví. *Pivní ročenka*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2015, , 1-6.

OLŠOVSKÁ, Jana et al. *Pivo a zdraví* [online]. *Kvasný průmysl*, 2014, **60**, 174-181 [cit. 2017-05-07]. ISSN 0023-5830.

ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology* [online]. 2007-6-11, **225**(3-4), 385-394 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1007/s00217-006-0429-3. ISSN 14382377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0429-3>

PAPAGIANNI, Maria a Sofia ANASTASIADOU. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococcus*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* [online]. 2009, **8**(1), 3- [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1186/1475-2859-8-3. ISSN 14752859. Dostupné z:

[http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-8-](http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-8-3)

PETROVA, Penka, Kaloyan PETROV a Galina STOYANCHEVA. Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria - structures, properties, and applications. *Starch - Stärke* [online]. 2013, **65**(1-2), 34-47 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1002/star.201200192. ISSN 00389056. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/star.201200192>

PREEDY, Victor R. *Beer in health and disease prevention*. [Online-Ausg.]. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 9780123738912.

RACEK, Jaroslav. Pivo jako potravina. <Http://www.ceske-pivo.cz> [online]. Český svaz pivovarů a sladoven, 2009 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.ceske-pivo.cz/pivo-jako-potravina>

REDDY, Gopal, Md. ALTAF, B.J. NAVEENA, M. VENKATESHWAR a E. Vijay KUMAR. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, **26**(1), 22-34 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.004. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007000961>

SAKAMOTO, Kanta a Wil N KONINGS. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, **89**(2-3), 105-124 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00153-3. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503001533>

SALMINEN, Seppo., Atte von WRIGHT a Arthur. OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2004. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 139. ISBN 0824753321.

SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, **29**(2-3), 213-231 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321>

SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 9788021042070.

SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. 1996, **29**(7), 675-690 [cit. 2017-04-30]. DOI:

10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>

SIEZEN, R. J. *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism, and applications : proceedings of the seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria : genetics, metabolism, and applications, 1-5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002. ISBN 1402009224.

SPITALE, Freek et al. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**, e95384 [cit. 2017-05-04]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>

STADLER, Richard H. a David R. LINEBACK. *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*. Wiley: Hoboken, N.J., c2009. ISBN 9780470074756.

STAREC, Milan. Nutriční vlastnosti piva. <Http://pivovary.info> [online]. 2007 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://pivovary.info/view.php?cislocclanku=2007120009>

STILES, Michael E. a Wilhelm H. HOLZAPFEL. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1997, **36**(1), 1-29 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160596012330>

STOLP, Heinz. *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. New York: Cambridge University Press, 1988. ISBN 0521276365.

SUKOVÁ, Irena. Biogenní aminy v mléčných výrobcích. <Http://www.agronavigator.cz> [online]. 2006 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=50116&ids=314>

SUZUKI, Koji, Kazumaru IJIMA, Kanta SAKAMOTO, Manabu SAMI a Hiroshi YAMASHITA. A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2006, **112**(2), 173-191 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x>

SUZZI, G. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, **88**(1), 41-54 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0168-

1605(03)00080-1. ISSN 01681605. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503000801>

ŠVAČINA, Štěpán. *Klinická dietologie*. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024722566.

ŠAVEL, Jan. *Technologie výroby piva* [online]. 2010, , 3-14 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z:
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/6/6-technologie_vyroby_piva.pdf

ŠTEGNEROVÁ, H., E. NÁPRAVNÍKOVÁ, I. STEINHAUSEROVÁ a P. ŠVEC. Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry. *Veterinářství*. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Česká sbírka mikroorganismů (CCM) Brno, Ústav hygieny a technologie masa Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2007, **57**, 39-42. Dostupné také z: <http://vetweb.cz/identifikace-bakterii-mlecneho-kvaseni-v-mase-balenem-v-podminkach-ochranné-atmosféry/>

TODAR, Kenneth. Lactic acid bacteria. [Http://textbookofbacteriology.net/lactics.html](http://textbookofbacteriology.net/lactics.html) [online]. Madison, Wisconsin, 2008 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z:
<http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>

TURKOVÁ, Kristýna. *Produkce vitamínů, exopolysacharidů a bakteriocinů bakteriemi mléčného kvašení*. 2007. Bakalářská práce. PřF MU.

VAUGHAN, Anne, Tadhg O'SULLIVAN a Douwe SINDEREN. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2005, **111**(4), 355-371 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>

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

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 808665902x.

VOS, Paul et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Dordrecht: Springer, 2009. ISBN 9780387684895.

ZIOLA, Morrow a Barry ZIOLA. Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene *gtf*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2011, , - [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1094/ASBCJ-2011-0124-01. ISSN 03610470. Dostupné z: <http://www.asbcnet.org/publications/journal/vol/Abstracts/ASBCJ-2011-0124-01.htm>

ZORNÍKOVÁ, Gabriela. Biogenní aminy v potravinách. *Http://www.chempoint.cz* [online]. Mendelova univerzita v Brně, 2012 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>

Seznam použitých symbolů a zkratek

BA Biogenní aminy

BMK Bakterie mléčného kvašení

MZ Ministerstvo zemědělství

PA Polyaminy

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin (Velíšek, 2002)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Biogenní aminy a jejich biologický význam (Velíšek, 2002)

*Tabulka 2: Bakterie mléčného kvašení produkující biogenní aminy (Ancín, González, Jimé-
nez, 2008)*

*Tabulka 3: Množství vitaminů v kvasnicích a pivu a doporučená denní dávka vitaminů B
(Basařová et al., 2010; Olšovská, 2014)*

Tabulka 4: Množství biogenních aminů v pivu (Kalač a Křížek, 2003)

