

# Hodnocení profilu biogenních aminů při výrobě sladu

Bc. Filip Petroš

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Filip Petroš  
Osobní číslo: T22332  
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin  
Forma studia: Kombinovaná  
Téma práce: Hodnocení profilu biogenních aminů při výrobě sladu

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Technologie výroby sladu a piva.  
Výskyt biogenních aminů v pivě.  
Faktory ovlivňující vybrané vlastnosti sladu a piva.

### II. Praktická část

Odeberte vzorky při výrobě sladu.  
Provedte základní provozní analýzy.  
Výsledky výroby a analýz popište a diskutujte, vyvoďte závěry.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Lorencová, E., Salek, R. N., Černíková, M., Buňková, L., Hýlková, A., & Buňka, F. (2020). Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. *Food Control*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107335>
- [2] IZQUIERDO-PULIDO, M., MARINÉ-FONT, A., & VIDAL-CAROU, M. C. (1994). Biogenic Amines Formation during Malting and Brewing. *Journal of Food Science*, 59(5), 1104-1107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08201>
- [3] Halász, A., Baráth, Á., & Holzapfel, W. H. (1999). The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 208(5-6), 418-423. <https://doi.org/10.1007/s002170050440>
- [4] Romero, R., Bagur, M. G., Sánchez-Viñas, M., & Gázquez, D. (2003). The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(2), 162-167. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1885-2>

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Richardos Nikolaos Salek, Ph.D.**  
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **1. ledna 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

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

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 10. února 2024

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Biogenní aminy jsou bioaktivní látky vyskytující se v živých systémech jako součást metabolických drah. Při výrobě potravin se uplatňují některé druhy mikroorganismů, které mohou tvořit biogenní aminy. Dalším zdrojem v potravinách může být kontaminující mikrobiota. Vysoký obsah biogenních aminů může u citlivých osob vyvolat zdravotní potíže. Z tohoto důvodu je výskyt těchto látek v potravinách sledován. V této diplomové práci byl analyzován obsah osmi biogenních aminů (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin, spermin) v průběhu výroby ječného sladu. Z odebraného sladu byly vyrobené tři šarže piva a sledován vývoj biogenních aminů během výroby. Čistota provozu byla ověřena mikrobiologickým rozborem. Bylo zjištěno, že během klíčení obsah biogenních aminů rostl s maximem na konci klíčení. Odrůda ječmene ovlivňovala obsah a skladbu biogenních aminů.

Klíčová slova: ječmen, slad, pivo, biogenní aminy, bezpečnost potravin

## **ABSTRACT**

Biogenic amines are bioactive substances occurring in living systems as part of metabolic pathways. In food production are used some types of microorganisms, which can produce biogenic amines. Another source of biogenic amines in food can be contaminating microbiota. However, high content of biogenic amines can cause health problems in sensitive individuals. For this reason, the occurrence of these substances in food is monitored. In this thesis were analyzed eight biogenic amines (tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine, spermine) during the production barley malt. In addition, three batch beer were also manufactured and analyzed for biogenic amines content. Furthermore, microbiological analysis was also performed. It was found that during germination the content of biogenic amines increased with a maximum at the end of germination stage. The barley variety influenced the content and composition of biogenic amines.

Keywords: barley, malt, beer, biogenic amines, food safety

Chtěl bych poděkovat panu doc. Ing. Richardosovi Nikolaosovi Salekovi, Ph.D za vedení, cenné rady a nápomoc při tvorbě mé diplomové práce. Pracovníkům laboratoří FT děkuji za pomoc při zpracování experimentální části. Dále děkuji vedení a kolektivu sladovny za možnost provést experiment v provozu. Děkuji rodině, přátelům a kolegům za podporu během studia, nejen vysokoškolského. Závěrem děkuji mé snoubence za podporu a zázemí, díky kterému se mi snaž studovalo.

*„Výšku nebe a šíří země, propastnou hlubinu a moudrost kdo probádá?“ Sir 1,3*

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 VÝROBA SLADU A PIVA</b> .....	<b>11</b>
1.1 VÝROBA SLADU.....	11
1.1.1 Ječmen.....	11
1.1.2 Sklizeň a skladování.....	12
1.1.3 Příjem, čistění, třídění a skladování.....	13
1.1.4 Máčení.....	14
1.1.5 Klíčení.....	15
1.1.6 Hvozdění.....	17
1.1.7 Odkličování, skladování a leštění sladu.....	17
1.2 VÝROBA PIVA.....	17
1.2.1 Šrotování a vystírání.....	17
1.2.2 Rmutování.....	18
1.2.3 Scezování.....	19
1.2.4 Chmelovar.....	19
1.2.5 Chlazení a zakvašování.....	20
1.2.6 Hlavní kvašení.....	20
1.2.7 Dokvašování.....	21
1.2.8 Pasterizace a stáčení.....	21
<b>2 BIOGENNÍ AMINY VE SLADU A PIVU</b> .....	<b>22</b>
2.1 BIOGENNÍ AMINY.....	22
2.2 BIOGENNÍ AMINY VE SLADU.....	23
2.3 BIOGENNÍ AMINY V PIVU.....	24
<b>3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VYBRANÉ VLASTNOSTI SLADU A PIVA</b> .....	<b>28</b>
3.1 SLAD.....	28
3.1.1 Odrůda ječmene.....	28
3.1.2 Obsah vody (stupeň domočení).....	28
3.1.3 Obsah dusíkatých látek.....	29
3.2 PIVO.....	30
3.2.1 Obsah zinku.....	30
3.2.2 Obsah diacetylu.....	30
3.2.3 Typ pasterizačního zařízení.....	31
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
<b>4 CÍL PRAKTICKÉ ČÁSTI</b> .....	<b>33</b>
<b>5 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
5.1 NÁSTROJE A POMŮCKY.....	34
5.2 ODBĚR VZORKŮ JEČMENE A SLADU.....	34
5.2.1 Ječmen.....	34

5.2.2	Odběrové schéma a postup.....	35
5.2.3	Stanovení provozních parametrů.....	36
5.3	VÝROBA PIVA A ODBĚR VZORKŮ .....	37
5.3.1	Výroba piva .....	37
5.3.2	Odběr vzorků.....	37
5.3.3	Analýzy meziproduktů a piva .....	38
5.4	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ VE SLADU, CHMELU A V PIVU .....	38
5.5	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	40
5.5.1	Ječmen a slad.....	40
5.5.2	Pivo .....	40
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>42</b>
6.1	PROVOZNÍ ANALÝZY JEČMENE .....	42
6.2	ANALÝZA SLADU.....	43
6.3	PROVOZNÍ ANALÝZA PIVA .....	44
6.4	BIOGENNÍ AMINY V JEČMENI A SLADU.....	45
6.5	BIOGENNÍ AMINY V CHMELU .....	51
6.6	BIOGENNÍ AMINY PŘI VÝROBĚ PIVA.....	52
6.7	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	57
6.7.1	Ječmen a slad.....	57
6.7.2	Pivo .....	59
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>76</b>



## ÚVOD

Ječmen, coby surovina pro výrobu sladu v Českých zemích, nabral na oblibě v době vrcholného středověku až raného novověku (Kočár et al., 2015). Dnes je ječmen nejpoužívanější surovinou k výrobě sladu (Psota, 2022). Zvyšující se hygienické standarty a náročnější požadavky zákazníků vedou výrobce k většímu zájmu o bezpečnost výroby (MZe, 2021).

Biogenní aminy (BA) jsou sloučeniny vznikající z volných aminokyselin jak součást metabolismu živých organismů. V potravinách se na jejich tvorbě podílí mikrobiota cíleně využívaná k výrobě potravin nebo kontaminující mikroorganismy. Velké koncentrace BA v potravinách vypovídají o špatných hygienických podmínkách ve výrobě a mohou mít vážné následky pro konzumenta. (Naila et al., 2010; Bauer, 2014; Panthi et al., 2017; Lorencová et al., 2020).

V minulosti byly sledovány obsahy BA při výrobě sladu a piva (Izquierdo-poulido et al., 1994; Halász et al., 1999; Romero et al., 2003; aj.). Sledování obsahu v konečném produktu se zabývala celá řada autorů často se zaměřením na piva produkované v dané oblasti (např: Buňka et al., 2012; Pradenas et al., 2016).

Tato práce se zabývá vývojem obsahu BA během výroby světlého sladu a následného použití sledovaných sladů k výrobě piva. Byly vybrány tři odrůdy sladovnického jarního ječmene (Francin, Laudis 550, Overture). Po celou dobu byl sledován obsah biogenních aminů ve všech fázích výroby: výchozí surovina, během sladování, během výroby piva až po konečný výrobek. Dále byly sledovány některé provozní parametry během výroby. Při výrobě sladu byl sledován obsah dusíkatých látek, obsah vody, obsah volného aminodusíku, Kolbachovo číslo, barva kongresní sladiny, extrakt sladu a konečné prokvašení. Při výrobě piva pak refraktometrická sušina, specifická hustota, obsah etanolu a pH. Byl zkoumán vliv mikrobiologické jakosti na výsledném obsahu BA formou rozboru výchozích surovin a piva.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 VÝROBA SLADU A PIVA

## 1.1 Výroba sladu

Slad je základní surovinou pro výrobu piva. Průmyslové odvětví, které se zabývá výrobou sladu se nazývá sladařství a na území České republiky má dlouholetou tradici. Slad se vyrábí ve výrobních závodech nazývajících se sladovna. V roce 2021 se na území České republiky vyrobilo 518 352 tun sladu a celkem zde fungovalo 26 sladoven. (Psota, 2022) Během žňové sezony 2023 bylo v Česku sklizeno celkem 1 764 205 tun ječmene z toho 950 399 tun tvořil ječmen jarní, používaný především k výrobě sladu (ČSÚ, 2023).

### 1.1.1 Ječmen

Nejrozšířenější obilninou využívající se k výrobě sladu je ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.). Tato jednoděložná rostlina patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Podle uspořádání zrna v obilce se ječmeny dělí na dvouřadé (*distichon*), čtyřřadé (*tetrastichon*) a šestiřadé (*hexastichon*). Jednotlivé formy se odlišují stavbou obilky v klasu. Dvouřadá forma je tvořena dvěma řády obilek uniž je plodný jen střední klásek. Postranní klásky jsou neplodné. Víceřadé formy mají plodné všechny tři klásky v květu a dle tvaru uspořádání se dělí na šestiřadé nebo čtyřřadé. Surovinou pro výrobu sladu jsou především dvouřadé jarní ječmeny. Výsev probíhá v březnu a dubnu a oproti ozimým ječmenům má v průměru nižší výnos. Až na výjimky má většina zástupců obilku uzavřenou v pluše (jedná se tedy pluchatou obilninu). Pro pivovarství má tato část zrna význam během scezování. Významnou pěstitelskou oblastí na našem území je Haná, Pomoraví, Podydjí a Polabí. (Arendt a Zannini, 2013, Basařová, 2023)

Obilka ječmene obsahuje 60-68 % w/w škrobu v sušině. Molekula škrobu je tvořena jednotkami glukózy vzájemně spojeny glykosidickou vazbou. Podle typu spojení a tvaru molekuly se škrob dělí na amylozu, lineárně spojené vazbou  $\alpha$ -(1-4), a amylopektin spojené vazbou  $\alpha$ -(1-4), která se pravidelně větví vazbou  $\alpha$ -(1-6). V zrně ječmene převažuje rozvětvená forma nad lineární. Škrob je v zrně uložen ve formě škrobových granulí nabývajících různých tvarů a velikostí. Pro rostlinu funguje škrob jako zásoba energie, kterou obilka využívá během svého počátečního růstu. (Velíšek a Hajšlová, 2009; (Arendt a Zannini, 2013)

Škrob je pro ječmen hlavní zásobní polysacharid. Mimo to obsahuje zrno také neškrobové polysacharidy. Významnou složkou je celulóza, která zpevňuje celé zrno (největší

množství je lokalizováno v pluchách, oplodí a osemeni). Jeden z parametru ječmene je obsah  $\beta$ -glukanu, který se v zrně nachází v různých formách. Některé tvoří ve vodě rozpustné gumovité látky, jiné pak musí nejdříve přejít enzymatickou hydrolyzou. Vyšší obsah rostlinných gum,  $\beta$ -glukanu, a pentozanu může způsobovat problémy při scezování a filtraci. Během sladování se dbá na správný postup výroby s cílem optimálně neštěpit (rozluštit) tyto látky. Významnou vlastností pentozanu je schopnost vázat vodu a tím zvyšovat viskozitu roztoku. (Basařová et al., 2023; Arendt a Zannini, 2013)

Dusíkaté látky v ječmenu tvoří většinou různě velké molekuly, které vznikly štěpením bílkovin. Dle velikosti je lze rozdělit na makropeptidy, polypeptidy, nižší peptidy a aminokyseliny. Nízkomolekulární dusíkaté látky (především aminokyseliny) mají význam během klíčení zrna, při vývinu barvy (účast na maillardových reakcích), při výrobě piva jsou živinou pro kvasinky. Vysokomolekulární dusíkaté látky mohou mít negativní význam při tvorbě zákalů, ale naopak mají pozitivní vliv na pěnivost a plnost piva. Bílkoviny ječmene se rozdělují na albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. Mezi těmito frakcemi je rozdíl ve vlastnostech, velikosti i zastoupení v zrně. Dále se v obilce nacházejí složené proteiny (např. glykoproteiny nebo fosfoproteiny) a nukleonové kyseliny. Vše dohromady vytváří celkový obsah dusíkatých látek v zrně. Ten by se měl optimálně pohybovat v rozmezí 10,5 až 11 % w/w. Obsah lipidů v ječném zrně se pohybuje mezi 1,5–5 % w/w. Jejich největší část se nachází v klíčku a aleuronové vrstvě. Lipidy mají pozitivní význam při klíčení zrna a pro správný metabolismus pivovarských kvasnic. Negativně působí na stabilitu pěny. Produkty enzymů štěpících lipidy (lipázy) způsobují stařešinou chuť piva. (Basařová et al., 2023, Moštek 1975)

### 1.1.2 Sklizeň a skladování

Sklizeň a následné úpravy jsou důležitým krokem majícím vliv na kvalitu ječmene. Čas sklizně se odvíjí od klimatických a agrotechnických podmínek nebo místa pěstování. Ječmen by se měl sklízet ve stádiu plné zralosti. To znamená, že zrna má optimální poměr látek a zárodek je vyspělý. Při sklizni nedozrálého ječmene, kdy zrna ještě nedokončilo svůj vývoj (akumulaci látek) může dojít ke snížení energie klíčení, vyššímu obsahu dusíkatých látek a nízkému výnosu. Negativně se tyto faktory projeví při výrobě sladu a piva. Naopak pozdější sklizeň, zvláště při špatném počasí, má za následek porostlost zrna nebo poškození celých klasů i stébel. Sklizeň by měla probíhat tak, aby bylo co nejméně obilí mechanicky poškozeno. Optimální obsah vody sklizeného ječmene je 15 % w/w. Sklizený ječmen by se měl ještě před prvním uskladněním pročistit (tato fáze probíhá

ihned po sklizni). Oddělují se poškozená zrna, pluchy, nečistoty a prach. Během této posklizňové fáze uskladnění, může dojít k vyššímu nárůstu teploty v hromadě (35–40 °C), která podpoří rozvoj kontaminující mikroflóry (především plísně) a zároveň sníží klíčivost zrna. Uskladněný ječmen by v této fázi měl být optimálně provzdušněn. (Černý, 2007)

Součástí posklizňových fází zpracování je i doba dormance (stav metabolického klidu). Tato fáze je charakterizovaná jako neschopnost zrna klíčit a po delší době se ztrácí. Nehrozí tak, že by zrno začalo klíčit v nevhodnou dobu (např. v klasu, v době mrazu). Dormanci lze rozlišit jako primární a sekundární. Primární dormanci lze charakterizovat jako období po sklizni, kdy obilka není schopna klíčit za optimálních podmínek. Omezení klíčivosti způsobují inhibitory klíčení. Ty jsou postupně během posklizňového dozrávání degradovány a zrno získává schopnost růstu. Sekundární dormance je pak popisována jako citlivost zárodku na přísun vody. Různými způsoby lze dobu dormance zkrátit. Lze říci, že na délku klíčivého klidu má vliv především výběr odrůdy a podmínky uskladnění. (Basařová et al., 2023)

### 1.1.3 Příjem, čištění, třídění a skladování

Ječmen je do sladoven nejčastěji dovážen vagonovou nebo automobilní dopravou. Volně ložený ječmen je po vstupní kontrole a vážení vysypán do příjímacích košů. Z těchto košů ječmen putuje do sil pro nečištěný ječmen nebo přímo na čističku ječmene. Vertikální dopravu ječmene po závodě zajišťují různě velké elevátory s malými lopatkami (korečky). Ty postupně nabírají materiál a vynášejí ho do vyšších pater budovy. Horizontální doprava je zajištěna šnekovými nebo pásovými dopravníky. Pro dopravu vodorovnou nebo mírně vzhůru lze využít řetězové dopravníky (redlery). Existuje také pneumatická doprava, která funguje na principu unášení materiálu proudem plynu. Takové zařízení lze rozdělit na přetlakové, podtlakové nebo smíšené. Veškeré tyto typy dopravy lze využít během celého procesu výroby sladu. (Moštek, 1975)

Před začátkem sladování je zapotřebí přijatý ječmen vyčistit (prach, nečistoty, kameny, kovové předměty) a vytrídít (podle velikosti zrna). Tyto dvě operace mohou probíhat současně. K vyčištění ječmene se používají různé typy zařízení (Basařová et al., 2023):

- **Magnety:** Zařazují se pro odstranění kovových částí, které by mohly poškodit nebo snížit účinnost čisticích strojů. Magnety jsou zařazeny před vstupem do zařízení. Pravidelně se kontrolují a čistí.

- Aspirátory: V těchto zařízeních dochází k oddělení hrubých nečistot. Kamínků a jemného prachu od ječmene za pomoci přívodu vzduchu, který tyto součásti strhává a oddělí.
- Triery: V tomto zařízení dochází k oddělování zrn jiných rostlin a prasklých zrn ječmene. Obilná masa postupuje přes válec, který se otáčí a na jeho krajích se nacházejí důlky, které vybírají separované nečistoty.

Nevytríděný ječmen obsahuje obilky různých velikostí, případně zlomky zrna neodstraněného během čištění. Každá obilka, dle své velikosti, absorbuje vodu různou rychlostí. Aby byla zachována homogenita máčení a klíčení rozděljuje se zrno do několika tříd dle velikosti: I. třída (prima), II. třída (sekunda) a zadina. K výrobě sladu se využívá I. a II. třída, zadina se nepoužívá. K vytrídění zrna se používají třídící stroje s horizontálními sítí. Fungují na principu vibrujících sít a postupném propadání zrna přes síta s otvory. Tím dochází k rozdělení do jednotlivých tříd. V celém prostoru, kde dochází k těmto operacím je vlivem prašnosti větší riziko vzniku explozí. Proto jsou sladovny vybaveny účinnými cyklony, prachovými filtry a odprašovacími komorami. Pro zjištění přesné hmotnosti se před čištěním a po čištění zařazuje vážení na automatických výklopných vahách. (Basařová et al., 2023, Moštek 1975)

Při skladování ječmene musí být zajištěno odvětrávání skladovaného obilí, protože skladovaný ječmen dýchá a v případě neodvětrávání může dojít k přechodu na kvašení a vzniku etanolu a oxidu uhličitého. Tyto látky jsou pro zárodek zrna toxické. Důležitou roli ve skladování hraje obsah vody v zrně a teplota v silě. Čím vyšší je obsah vody, tím kratší je doba skladování. Teploty se měří v různých partiích obilné masy. Vyšší teplota a vlhkost může vést k rozvoji kontaminující mikroflóry a škůdců. Ke skladování zrna se dnes využívají sila s různou kapacitou. V minulosti se ječmen skladoval na půdách sladoven. Sila jsou velké stavby různých velikostí s konickým zakončením. Lze je pravidelně provětrávat a tím odvádět produkty dýchání. Sila jsou dole opatřena výpustí, ze které zrno samospádem padá do dopravního zařízení. Sila se využívají nejen na úschovu ječmene, ale i sladu, prachu či sladového květu. (Basařová et al., 2023)

#### 1.1.4 Máčení

Během procesu máčení se zrno namáčí ve vodě s cílem dosáhnout požadované hodnoty obsahu vody v zrně (stupeň domočení). Voda v zrně nastartuje procesy vedoucí ke klíčení zrna. Tyto procesy zahrnují rozpuštění endospermu, aktivaci a tvorbu enzymů a

biochemické a strukturální změny zrna. Vliv na rychlost příjmu vody zrna má druh odrůdy, velikost obilky, klimatické podmínky při pěstování aj. Velký význam má také teplota máčecí vody. Optimální teplota pro máčecí vodu bývá mezi 10-12 °C. Během máčení je vhodné ječmen provzdušňovat a zároveň odvádět odpadní produkty metabolismu ječmene. Nárustem vody v zrně dochází k nastartování biochemických změn. Ty se projeví syntézou enzymů, které začnou měnit vysokomolekulární chemické látky v zrně a posupně je štěpit na jednodušší formy. Dochází také ke spotřebování jednoduchých cukrů a štěpení neškrobových polysacharidů. (Basařová et al., 2023, Moštek 1975)

Místo, kde se ječmen namáčí se nazývá máčírna a zařízení na namáčení ječmene se nazývá náduvník. Dle technického zařízení sladovny se může máčecí proces lišit. Všeobecně se ale skládá z časového úseku, kdy je ječmen pod vodou a kdy je volně na vzduchu. Na začátku se naváží dané množství ječmene na namáčku. Následně se smíchá máčecí voda s ječmenem v náduvníku. Při prvním máčení nebo s vypuštěním první máčecí vody se odplaví splavky z hladiny. Splavky tvoří poškozená zrna, nečistoty a prach, který plave na hladině. Během máčení ve vodě se zrno v intervalech provzdušňuje. Po určitém čase se voda vypustí (nebo vymění) a zařazuje se vzdušná přestávka. Ta může trvat různou dobu a během ní zrno intenzivně dýchá. Při tomto procesu vzniká velké množství oxidu uhličitého a hrozilo by, že dojde k zastavení klíčení zrna. Proto jsou sladovny vybaveny odtahem plynu z náduvníku. Existuje několik typů máčení a každá sladovna namáčí podle vlastního harmonogramu. Během máčení se tyto dvě fáze mohou vystřídat několikrát. Při výrobě světlého sladu je optimální hodnota na konci máčení 40-44 % w/w, u tmavých sladů 45-48 % w/w. Po dosažení těchto hodnot je ječmen vymáčen z náduvníku do klíčírny. Vymačka může být buď v proudu vody (mokrý vymačka) nebo bez vody (suchý vymačka). Celková doba máčení je závislá na zvoleném postupu, odrůdě technologickém zázemí a dalších faktorech. (Basařová et al., 2023, Moštek 1975)

### 1.1.5 Klíčení

Po dosažení požadovaného stupně domočení začíná výrobní fáze klíčení. Během této doby se v zrně vytváří enzymy nutné ke štěpení zásobních makromolekulárních látek v zrně. Vnější znakem klíčení je tvorba kořínků a střílky na obilce. Biochemickými změnami dochází ke vzniku enzymů v zrně. V prvních hodinách klíčení dochází ke spotřebování rezervních látek v klíčcích, tento proces spustí impuls zvyšující přesun fytohormonů gibrelinu do aleuronové vrstvy zrna. Syntetizují se zde sladové enzymy, které pomalu štěpí endosperm na látky o nižší molekulové hmotnosti. Tyto se přesouvají blíže ke klíčku, aby

byla zajištěna jeho výživa. Důležitý je v této fázi přístup kyslíku, který zabraňuje anaerobní respiraci zrna. Vytváří se amylolytické enzymy potřebné ke štěpení škrobu a to  $\alpha$ -amyláza a  $\beta$ -amyláza. Oba enzymy štěpí škrob různými cestami za vzniku produktů různých velikostí. Mezi další enzymy štěpící škrob nebo sacharidy jsou limitní dextrináza, maltáza a sacharáza. Nemají ovšem při přípravě sladu a mladiny tak velký význam. (Basařová et al., 2023)

Proteolytické enzymy štěpí v zrna bílkoviny na peptidy a postupně až na aminokyseliny. Podle lokace štěpení lze enzymy rozdělit na endopeptidázy nebo exopeptidázy. Endopeptidázy štěpí bílkoviny uvnitř řetězce, zatímco exopeptidázy od konce. Zásobní bílkoviny se nejdříve štěpí na volné aminokyseliny, které jsou v další fázi výroby využity k syntéze bílkovin. Následně se tvoří endopeptidázy, které pronikají dovnitř zrna, kde štěpí zásobní proteiny na peptidy a aminokyseliny. Vzniklé peptidy jsou štěpeny exopeptidázami na volné aminokyseliny. Do proteolýzy se zapojuje také enzym karboxypeptidáza, která oštěpuje aminokyseliny z konců proteinových řetězců. Dále se enzymy proteolýzy zapojují do štěpení buněčné stěny zrna. Degradací bílkovin vznikají látky nižší molekulové hmotnosti se značným vlivem na výrobu piva. Cílem je dosáhnout optimálního stupně rozluštění pro zachování charakteristických vlastností (vysoký stupeň rozluštění – nižší plnost, nízké rozluštění – špatná filtrovatelnost). Volné aminokyseliny slouží jako výživa pro kvasinky a pro tvorbu aroma piva. (Benešová et al., 2017)

Během klíčení dochází rovněž k degradaci lipidů za pomoc enzymu lipázy a oxidací. Mohou vznikat produkty, které mohou negativně ovlivnit výrobu piva. U lipidů dojde k degradaci na oxid uhličitý a energii, na prvky Krebsova cyklu nebo převedení na cukry. Větší část lipidů je soustředěna v klíčku. (Basařová et al., 2023)

Tradiční technologii výroby sladu je klíčení ječmene na humnech. Zde je ječmen navýšen do výšky 10-14 cm na podlahách umístěných v chladnějších částech sladovny (sklep). Prostor musí být dobře klimatizován (odváděny produkty dýchání) a případně chlazen. Ječmen je v pravidelných intervalech otáčen. Tento způsob výroby nedosahuje vysokých kapacit, proto se dnes lze setkat s moderními způsoby klíčení. U nás velmi rozšířené jsou skříňová sladovadla (např. Saladinova skříň). V tomto typu ječmen klíčí ve vysoké vrstvě (1,5 m), je provzdušňován a případně chlazen. Do jedné skříně je vždy vymočena jedna šarže z máčírny. Podobně jsou konstruována sladovadla typu posuvná hromada. Zde je vždy ve vymáčecím prostoru převedena šarže ječmene z máčírny a postupně je za pomoci obrabečů otáčena k místu nástěru. Během této doby projde ječmen všemi fázemi klíčení.



Existují ještě další typy klíčících zařízení. Během klíčení je ječmen dle potřeby dokrápěn vodou. Teplota a délka klíčení se volí různě dle typu vyráběného sladu i použité technologie. (Basařová et al., 2023)

### 1.1.6 Hvozdění

Během tohoto kroku dochází k zastavení růstu klíčícího ječmene (zelený slad) a tvorbě sensoricky aktivních látek. Hvozdění lze rozdělit na fázi růstovou, enzymovou a chemickou. Na začátku hvozdění se zelený slad hvozdí při nižších teplotách, dobíhají vegetační projevy zrna. Postupně je teplota zvyšována, kdy již zrno neklíčí, ale nadále v něm probíhají enzymatické děje. V závěru teplota vzroste nad 60 °C a dojde k zastavení enzymatických reakcí v zrnu. V této fázi probíhají chemické reakce. Vyvíjí se barva a sensoricky aktivní látky v sladu. Hvozdění končí fází dotahování (u světlých sladů 80–85 °C). Klíčící ječmen se postupně vysušuje (hvozdí) v zařízení zvaném hvozd. Do tohoto zařízení je přiváděn vzduch o požadované teplotě, který prochází přes perforované síta (líška) s mokřým ječmenem. (Basařová et al., 2023)

### 1.1.7 Odkličování, skladování a leštění sladu

Po ukončení hvozdění se odhvozděný slad ochladí a přesune do skladovacích prostor (např. sklopením do chladících košů). Odtud je slad dopravníky dopraven do odkličovačů, kde dojde k odstranění sladového květu (klíčku) od sladu. Rozšířené je použití bubnového odkličovačů. Slad prochází přes buben s perforovanou plochou, mechanickým pohybem dochází k odstranění klíčku od obilky a oddělení zrna od sladového květu. Dalšími typy jsou šneková nebo pneumatická odkličovačů. Sladový květ je náchylný na vlhnutí a skladuje se zvláště v suchu a chladnu. Vyrobený ječný slad se před použitím skladuje v silech nebo v menších provozech na půdách sladoven. Během odležení mírně roste obsah vody a některé další parametry uchovaného sladu. Před výdejem se slad čistí (leští), aby došlo k odstranění zbylého sladového květu a případných nečistot. Slad je expedován buď volně ložený pro přepravu auty nebo pytlovaný. (Basařová et al., 2023)

## 1.2 Výroba piva

### 1.2.1 Šrotování a vystírání

Slad na várku se nejprve musí našrotovat, aby došlo k lepšímu přístupu vody k jednotlivým částem zrna. Důležitým požadavkem při šrotování je zachování celistvosti

pluch, které při scezování napomáhají lepší filtraci sladiny. Slad lze mlít několika způsoby. Základním způsobem je mletí za sucha. Při suchém mletí slad prochází přes dvou, čtyř nebo šestiválcový šrotovník. Pomleté zrnko je buď sbíráno ve zvláštním místě nebo přímo vedeno do vystírací nádoby. Na zařízeních o větším počtu (čtyř a šesti) lze rozdělovat šrot dle typu frakce (jemný šrot, krupička, aj.) Druhou možností je mletí sladu s kondicionováním. Během tohoto postupu dochází ke krátkému vlhčení sladu vodou. Při tom pluchy získávají elasticitu a lepší odolnost při šrotování. Třetí rozšířenou možností je mletí za mokra. Slad se nejdříve namáčí ve vodě (obsah vody v zrně se zvýší až na 30 % w/w) a poté rozemele spolu s vodou ve šrotovníku a odtud jde přímo do vystírací kádě. (Briggs et al., 2004; Basařová et al., 2021)

Při vystírání se postupně mísí sladový šrot s vodou. Buď se sladový šrot postupně vsypává do varné nádoby a mísí s vodou nebo prochází přes vystěradlo, kde je ke šrotu přiváděná voda. Vystírací nádoba musí být opatřena míchadlem, aby nedocházelo k sedimentaci, připalování a špatnému promíchání. Teplota vystírací vody se volí dle typu vyráběného piva (obvykle 37-60 °C). (Kinčl, 2022)

### 1.2.2 Rmutování

Při rmutování se dochází ke štěpení makromolekulárních látek (především škrobů) za pomoci enzymů přítomných ve sladu. Pro dosažení optimálních podmínek pro působení enzymů se volí několik teplot, při kterých se zařazují časové prodlevy (Briggs et al., 2004; Kinčl, 2022):

- 35–40 °C – Při těchto teplotách lze vystírat méně rozluštěné slady. Dle zvyku se tyto teploty využívají při výrobě českého ležáku.
- 50–58 °C – Během prodlevy na této teplotě dochází k intenzivnímu štěpení bílkovin a neškrobových polysacharidů. Delší prodlevy mohou vést ke snížení pěnivosti piva.
- 60–65 °C – Toto rozmezí teplot se nazývá nižší cukrotvorná teplota, nejčastěji se volí teplota 62-64 °C. Působením enzymů  $\beta$ -amylázy dochází k odštěpování maltózy z konců škrobových řetězců a směs se zcukruje.
- 65-75 °C – Během těchto teplot je aktivní enzym  $\alpha$ -amyláza. Pausou na vyšší cukrotvorné teplotě vznikají menší produkty štěpením uprostřed řetězce škrobu.

Nejčastěji se prodleva volí na teplotách 72-73 °C. Dílo během této prodlevy rychle ztekutí.

- 75-78 °C – Při dosažení těchto teplot dochází ke zpomalení enzymových reakcí a proces rmutování se ukončí.

Obecně lze použít pro rmutování dva odlišné postupy, které jsou různě modifikovány. Při dekokčním rmutování je část vystírky odebrána do zvláštní nádoby, kde je postupně vystavena různým teplotám a nakonec povařena. Vrácením zpět dojde ke zvýšení teploty zbytku díla. Tento postup se může opakovat (obvykle jednou až třikrát). Určitým protikladem proti tomuto postupu je infuzní rmutování. Při něm je celé vystřené dílo pohromadě a záhřevem se dosahuje cílových hodnot teploty. Tento postup je jednodušší, není u něj potřeba zvláštní nádoba na oddělení rmutu. Kontrolu zcukření rmutu lze provést jodovou zkouškou. (Kinčl, 2022)

### 1.2.3 Scezování

Zcukřené dílo je potřeba před dalším zpracováním oddělit a tím získat sladinu. Ke scezování se používají nejčasněji scezovací kádě s perforovaným dnem, které obsahují kypřicí zařízení a vyslazovací trysky. Modernějším způsobem je poté scezování ve sladivých filtrech. Do scezovací kádě je napuštěno odrmutované dílo a poté je zařazen odpočinek, během kterého sedimentují pluchy a pevné částice. Scezování začíná podrážením, kdy se odpouští kalná část a ta se vrací zpět do scezovací kádě. Po vyčištění sladiny pokračuje scezování stékáním předku. Předek (extraktivně nejbohatší) je sbírán ve zvláštní nádobě. Po separaci předku je do scezovací kádě napuštěna teplá vyslazovací voda, díky které lze z mláta získat zbytek extraktu. Vyslazovací voda se dodává v několika dávkách. Scezením výstřelků končí scezování na jehož konci se získává sladina (tekutý podíl) a mláto (pevný podíl). (Briggs et al., 2004; Kinčl, 2022)

### 1.2.4 Chmelovar

Při chmelovaru se do sladiny přidává chmel (chmelové výrobky). Množství se volí dle typu použitého chmele a sensorických požadavků. Během chmelovaru dochází k izomeraci  $\alpha$ -hořkých kyselin na iso- $\alpha$ -hořké kyseliny působením vysoké teploty. Do sladiny se uvolňují také aromatické chmelové látky (silice) a polyfenoly. Pro první přídavek chmele se volí odrůdy s vyšším obsahem  $\alpha$ -hořkých kyseliny pro maximální výtěžnost těchto látek. Naopak odrůdy se specifickým nebo jemnějším aroma se volí ke konci chmelovaru,

případně se přidávají do vířivé kádě. Chmelovar vede také k odpaření vody, dosažení požadované stupňovitosti mladiny a vytěkání nežádoucích látek. Maillardovou reakci dochází ke vzniku barevných a některých vonných látek. Důležitá je také koagulace bílkovin (lom mladiny). Na konci chmelovaru je mladina přečerpaná do vířivé kádě, kde je roztočením docíleno sedimentace kalů a chmele uprostřed nádoby. Po sedimentaci a odpočinku je mladina stahována a vedena do chladiče. (Briggs et al., 2004; Kinčl, 2022)

### 1.2.5 Chlazení a zakvašování

Spíláním mladiny přes chladič dochází k ochlazení mladiny na zákvasnou teplotu. Dnes se využívají deskové výměníky, do nějž je vedena horká mladina a studená voda. Ohřátá voda je jímána a využívána pro další potřeby pivovaru. Před zakvašením je mladina dostatečně provzdušněna vzduchem nebo kyslíkem. Zakvašování probíhá buď kontinuálním přívodem kvasnic do potrubí k mladině nebo přidáním do kvasné nádoby. Využívá se buď hustá kvasničná suspenze získaná z předchozího kvašení nebo nová kvasničná kultura vyrobená propagací. Další možností je využití sušených kvasnic. (Briggs et al., 2004; Kinčl, 2022)

### 1.2.6 Hlavní kvašení

Kvašením mladiny dochází ke vzniku etanolu, oxidu uhličitého a dalších látek. Tyto látky produkují během kvasného procesu pivovarské kvasinky. Ke kvašení mladiny se využívají dva druhy kvasinek, ty lze ještě dále dělit na kmeny s různými vlastnostmi (Stewart, 2015):

- Spodní kvasinky (*Saccharomyces Pastorianus*) se využívají pro výrobu piv typu ležák.
- Svrchní kvasinky (*Saccharomyces Cerevisiae*) se využívají pro výrobu piv typu Ale.

Hlavní kvašení probíhá v otevřených spilkách nebo uzavřených nádobách (Cylindrokónické kvasné tanky-CKT). Rozdělit je lze do čtyř fází: zaprašování, bílé kroužky, hnědé kroužky a propadnutí deky. Jako deka se nazývá pěna na povrchu kvasícího piva. Teplota kvašení se volí podle typu vyráběného piva a použitých kvasinek. Pro výrobu ležáku českého typu se obvykle volí teplota 10-13 °C. V průběhu výroby jsou sledovány hodnoty zdánlivého extraktu. Na konci kvašení jsou kvasné nádoby ochlazeny (4-5 °C). Během tohoto procesu dojde k sedimentaci kvasnic, které se po usazení odstředí (především u CKT). (Briggs et al., 2004; Kinčl, 2022)

### 1.2.7 Dokvašování

Po vykvašení je pivo přečerpáno do ležáckých tanků, tato část výroby se nazývá sudování. Během dokvašování dochází ke zpracování zbylého extraktu, nasycení piva oxidem uhličitým, odbourání nežádoucích látek a vyčeření piva. Používají se kovové nebo nerezové ležácké tanky. Teplota v ležáckém sklepě je obvykle -2 až 3 °C. Doba ležení je různá dle typu vyráběného piva a zvyku v daném provozu. Z hlediska pohledu lze výrobu piva rozdělit na dvoufázovou, při které je pivo po vykvašení sudováno a jednofázovou, kdy pivo zraje ve stejné nádobě kde kvasilo (uzavřený kvasný tank). Po dokvašení je pivo stáčeno do spotřebitelských obalů jako nefiltrované, ale častěji prochází filtrací případně stabilizací. Filtrace zbaví pivo kvasinek a kalů. Stabilizace se využívá na odstranění bílkovin, které by v pozdější fázi mohli tvořit zákaly. Dnes se využívá především křemelinová filtrace. Filtrované pivo je před stočením uchováno v přetlačném tanku. (Basařová et al., 2021)

### 1.2.8 Pasterizace a stáčení

Před stočením a expedicí se pro zachování mikrobiologické stability pivo pasteruje. Pivo lze pasterovat v průtokovém nebo tunelovém pasteračním zařízení. V případě první varianty je pivo pasterováno ještě před stočením průchodem přes výměník, kde dochází ke krátkému záhřevu za zvýšeného tlaku a následným chlazením v chladicí sekci na 0 °C. Tunelovým pastérem prochází pivo již ve spotřebitelském obalu a k záhřevu dochází průchodem přes tunel, kde je tryskami přiváděna teplá voda nebo pára. (Basařová et al., 2021)

Pivo se plní do různých spotřebitelských obalů. Stáčení piva do nerezových KEG sudů má výhodu především v možnosti opakovaně sud umýt a naplnit. Podobně jsou na tom skleněné lahve, kde je ovšem náročnější mytí lahví, etiketování i větší riziko mikrobiální kontaminace. Náročnější je také transport, kde se musí počítat s velikostí přepravních beden. Dalšími rozšířenými typy obalů jsou plechovky, jejich velkou výhodou je nízká hmotnost, dobrý průchod tepla a recyklovatelnost. Oblíbeným obalem pro stáčení piva jsou také PET lahve, které nacházejí uplatnění pro stáčení levnějších typů piv nebo naopak stáčení menších šarží z minipivovaru. V poslední době vzrostla obliba cisternového piva stáčeného z cisteren do malých tanků v restauraci. Odtud je pivo přímo vedeno do výčepních zařízení. (Kinčl, 2022)

## 2 BIOGENNÍ AMINY VE SLADU A PIVU

BA a polyaminy jsou bioaktivní látky jenž se vykytují v živých systémech, často jako součást metabolismu. V potravinářství je jejich výskyt nejčastěji navázán na druhy potravin, při kterých se využívají mikroorganismy. (Naila et al., 2010; Bauer, 2014) Jejich obsah je sledován z důvodu toxikologické citlivosti některých osob vůči některým druhům aminů. (Panthi et al., 2017) Při výrobě sladu vznikají BA přirozeným metabolismem či mikrobiotou na obilkách ječmene. Bezprostředně se o problematice BA dá hovořit ve vztahu k pivu při jehož výrobě se využívají kvasinky a zároveň je zde velké riziko kontaminace ve všech fázích procesu. (Adams et al., 2016)

### 2.1 Biogenní aminy

BA lze rozdělit dle struktury na heterocyklické, alifatické a aromatické. Nejčastěji vznikají dekarboxylací z aminokyselin (Tabulka 1). Pro jejich vznik v potravinách je zapotřebí, aby byly přítomné volné aminokyseliny a mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou. (Naila et al., 2010) Pojem dekarboxylázová aktivita znamená, že z aminokyseliny dochází působení enzymu dekarboxyláza (např. histidindekarboxyláza) k odštěpení karboxylové skupiny a vzniku příslušného BA. Putrescin může vzniknout z ornitinu nebo deaminací agmatinu. Stejně tak spermin a spermidin vznikají z putrescinu. (Doeun et al., 2017)

Tabulka 1: Aminokyseliny a jejich biogenní aminy (upraveno dle Bauer, 2014)

Aminokyselina	Biogenní amin
Histidin	Histamin
Tyrosin	Tyramin
Tryptofan	Tryptamin
Fenylalanin	Fenylethylamin
Lysin	Kadaverin
Arginin	Agmatin
Ornitin, arginin	Putrescin, spermin a spermidin

Výskyt BA je často vázán na potraviny, při jejíž výrobě se uplatňují mikroorganismy (kulturní i kontaminující). Patří zde sýry, mléčné výrobky, fermentované masné produkty nebo alkoholické nápoje. Byly identifikovány mikroorganismy, které mají dekarboxylační aktivitu a mohou zvyšovat obsah aminů v potravinách: rod *Enterococcus*, čeleď *Enterobacteriaceae*, rod *Pseudomonas*, skupina *Lactobacillus* nebo různé druhy kvasinek. Se vzrůstající teplotou roste produkce BA. Vliv na tvorbu má také pH potraviny. (Doeun et al., 2017)

Vyskytují se také jako součást přirozených životních procesů v živých systémech (histamin jako tkáňový hormon). Běžný výskyt BA v potravinách je pro lidský organismus neškodný a k jejich degradaci dochází ve střevech. Metabolismus biogenních aminů po konzumaci probíhá díky přítomnosti mono – a di-aminooxidáz a histidinmetyltransferázy, jejíž činností vznikají neškodné produkty. V případě blokace těchto degradačních drah nebo citlivostí jedince, může dojít k intoxikaci. Bezpečně konzumovaná dávka BA je považována do 100 mg/kg potravin (u některých autorů nižší). V případě přítomnosti etanolu (pivo, víno) se bezpečná míra razantně snižuje, protože dochází k blokaci jejich odbourávání. (Doeun et al., 2017; Fusek et al., 2020)

Intoxikace se může projevit bolestí hlavy, zarudnutím kůže, kardiovaskulárními symptomy, poruchami gastrointestinálního traktu, celkového šoku a kopřivky (Buckenhueskes, 2015). Za problémový je považován především histamin, který je spojován s konzumací makrelovitých ryb. Zdravotní potíže může způsobit také tyramin, především při konzumaci sýru s vyšším obsahem tohoto aminu. Některé BA (putrescin, kadaverin) mohou mít synergický účinek vůči jiným aminům, ačkoliv samostatně nejsou tolik toxikologicky významné. (Gardini et al., 2016)

Legislativně je ošetřen pouze maximální obsah u histaminu v rybách a produktech rybolovu na 100 mg/kg, v případě ryb a produktech rybolovu zpracovaných enzymatickým zráním v láku pak 200 mg/kg. (Evropská unie, 2005)

## 2.2 Biogenní aminy ve sladu

Při výrobě sladu nedochází k cílenému použití mikroorganismů, a tak případný výskyt BA souvisí buď s přirozeným metabolismem rostlin, s přirozenou polní mikrobiotou anebo s nedostatečnou hygienou v provozu (resp. mikrobiální kontaminací). Slad (případně surogát) nebyl nikdy považován za významný zdroj BA. (Izquierdo-Pulido et al., 1994)

Skližený ječmen obsahuje rozsáhlou škálu přítomných mikroorganismů. Především se jedná o plísně a bakterie. Obsah plísní je sledován především z důvodu předejití kontaminace druhy tvořící mykotoxiny. Dalším důvodem je prevence jevu zvaného gushing souvisejícího s přeplňováním piva. Bakterie tvoří většinu z mikroflóry vyskytující se na ječmeni. Byly zaznamenány rody *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Corynebacterium* a *Micrococcus*. (Basařová et al., 2021) Významný vliv na mikroflóru mají také podmínky skladování. Ječmen by měl být uchován v místech s nízkou vlhkostí a teplotu. Sezonní roky z vyšší vlhkosti, během dozrávání a sklizně, mohou negativně ovlivnit přítomnost bakterií a plísní na obilkách ječmene. (Bokulich a Bamforth, 2013) Přítomnost nežádoucích plísní a kvasinek na obilkách je pravděpodobnější, protože oproti bakteriím rostou při nižších hodnotách vodní aktivity (Rosentrater, 2022).

Studie Izquierdo-Pulido et al. (1994) se pokoušela zaměřit na vztah obsahu BA v pivu v závislosti na použitých surovinách. Bylo zjištěno, že na obsahu BA ve sladu se podílí buď metabolické procesy anebo mikrobiální kontaminace. Některé BA (putrescin, spermin a spermidin) mohou být přítomné v ječmenech vypěstovaných na půdách s nižším obsahem draslíku a sodíku nebo vysokým obsahem amoniaku. Bylo potvrzeno, že přídavek doplňkové suroviny (surogát) může vést ke snížení obsahu biogenních aminů v pivu.

Dle zjištění ze studie Halász et al. (1999) je patrné, že výběr odrůdy ječmene má vliv na obsahu některých BA při výrobě stejného typu sladu. Autoři také vyjádřili myšlenku, že zdrojem histaminu ve sladu je vždy mikrobiální kontaminace, protože u ječmenu nedetekovali přítomnost histidindekarboxylázy. Dále bylo zjištěno, že nejvyšší nárůst obsahu probíhá během sladování, méně pak při výrobě mladiny.

### 2.3 Biogenní aminy v pivu

Zdrojem BA mohou být jak výchozí suroviny, tak i kontaminující mikrobiota během výroby. (Izquierdo-Pulido et al., 1994) Pivo není vhodné prostředí pro rozvoj většiny kontaminující mikrobioty. Podílí se na tom několik faktorů: přítomnost etanolu, oxidu uhličitého, chmelových látek, prostředí s nízkým pH a nízkým obsahem živin a kyslíku. Pro toto prostředí se přizpůsobila skupina bakterií (pivokazících), které se mohou v konečném výrobku rozmnožovat. (Bokulich a Bamforth, 2013)

Při přípravě mladiny se během rmutování mohou množit bakterie skupiny *Lactobacillus*, rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Varem během chmelovaru dochází ke sterilizaci mladiny,



ovšem mohou přežívat termorezistentní spory (rod *Bacillus*). Po ochlazení je mladina náchylná na kontaminaci zástupci řádu *Enterobacteriales* (někdy též mladinové bakterie). Inhibiční pro ně je nízké pH a přítomnost etanolu v pozdější fázi. Představují riziko pro nealkoholické pivo. Někteří zástupci mohou kontaminovat násadní kvasnice (Bokulich a Bamforth, 2013; Matoulková et al., 2018). Během kvašení a zrání se v pivu mohou množit bakterie skupiny *Lactobacillus*, rod *Pediococcus*, rod *Kocuria*, rod *Micrococcus* v menší míře i jiné grampozitivní druhy. Vážným ohrožením je infekce anaerobními bakteriemi jako jsou rod *Pectinatus* a rod *Megasphaera*. V míchaných ochucených nápojích na bázi piva je problematická bakterie *Zymomonas mobilis*. (Bokulich a Bamforth, 2013)

Samostatnou skupinu kontaminujících mikroorganismů tvoří divoké kvasinky. Využívá se rozdělení na kvasinky patřící do rodu *Saccharomyces* a ostatní označované jako non-*Saccharomyces*. Za rizikovější se považují zástupci první skupiny, kteří jsou schopni množit se během kvašení, vytvářet senzoricky nežádoucí látky a zkvašovat zbytkový extrakt. Problémová je jejich identifikace, kdy se často podobají kvasinkám kulturním. Kvasinky non-*Saccharomyces* mohou udílet pivu nežádoucí chutě a vůně. I přesto některé druhy našly uplatnění při výrobě spontánně kvašených piv (rod *Brettanomyces*). (Matoulková et al., 2013).

Hlavními zdroji BA v pivu jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Saccharomyces* a především bakterie skupiny *Lactobacillus*, (Bokulich a Bamforth, 2013). Byla zjištěna vysoká dekarboxylová aktivita působící na aminokyseliny (histidin, lysin, ornitin, tyrosin) u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* izolovaných z fermentovaných klobás (Lorenzo et al., 2010). Při sledování produkce BA kontaminujícími bakteriemi, izolovanými z piva, v tekutých bujónech bylo zjištěno, že některé kmeny *Levilactobacillus brevis* produkují značné množství tyraminu (přes 2000 mg/l) a některé i menší množství kadaverinu. Dále byly sledovány produkce tyraminu u některých kmenů *Lactocaseibacillus casei* a *Lactocaseibacillus paracasei*, kdy v některých případech bylo zaznamenáno množství až 520 mg/l. (Lorencová et al., 2012)

V práci Matukas et al. (2022), byl zkoumán vliv třech druhů kvasinek použitých k výrobě piva na tvorbu biogenních aminů. V pivu vyrobeném pomocí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* byl v různých fázích zrání zaznamenán fenylethylamin, putrescin a tryptamin. Podobné výsledky byly zjištěny i při použití *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*. Při použití kvasinky *Brettanomyces claussenii* (skupina non-*Saccharomyces*) byl zjištěn vysoký nárůst kadaverinu (přes 180 mg/l) a putrescinu (přes

300 mg/l) především po 30 dnech zrání. Autoři vyvodili závěr, že všechny kvasinky se hodí k výrobě piva, ale druh *Brettanomyces claussenii* produkuje značné množství BA. V případě kulturní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že dokáže metabolizovat spermidin na spermin (Nalazek-Rudnicka et al., 2021).

V práci Buňka et al., (2012) byly analyzovány vzorky alkoholických piv různých druhů a nealkoholických piv běžně dostupných v tržní síti v Česku. Předmětem výzkumu bylo porovnat obsah BA v pivu po nákupu a na konci doby minimální trvanlivosti. Bylo zjištěno, že histamin nebyl detekován v žádném vzorku v obou krocích měření. U některých piv byly naměřeny vyšší koncentrace tyraminu (i přes 100 mg/l) s vzrůstajícím trendem během skladování. Obsah putrescinu byl ve vzorcích do 50 mg/l i na konci data spotřeby. U některých piv obsah vzrůstal. Kadaverin nepřesáhl u většiny piv 25 mg/l, ale u některých vzorků byl zjištěn obsah nad 50 mg/l. Celkově autoři zjistili souvislosti mezi obsahem BA a délkou skladování. Také bylo zjištěno, že 25 % testovaných vzorků alkoholického piva vykazovalo množství BA přes 100 mg/l což představuje riziko pro spotřebitele.

V práci Pradenas et al., (2016) bylo v průběhu tří let analyzováno 101 piv, přibližně 2/3 tvořily průmyslové pivovary, z Chilské tržní sítě. Celkový obsah BA se pohyboval od 0,53-85,04 mg/l. Vyšší obsah BA byl zjištěn u piv vyráběných v minipivovarech, což mohlo být způsobeno nedostatečnou sanitací. Nejčastěji byl detekován putrescin (u několika výjimek kadaverin). Histamin i tyramin byl většinou v bezpečných hodnotách. V nejvyšším množství byl detekován u několika vzorků (histamin 24,1 mg/l; tyramin 19,3 mg/l), ovšem většinou nebyl detekován vůbec. Autoři poukázali na to, že v pivech je obsah BA nižší než ve víně nebo cideru. Odůvodnili to větším zapojením bakterií mléčného kvašení při výrobě těchto nápojů. Závěr autorů je takový, že všechny analyzované vzorky piva byly bezpečné pro konzumaci.

Větší pozornost je věnována pivu vyráběným v minipivovarech (řemeslná piva, craft beer) z důvodu absence pasteračního zákroku a filtrace.

Ve studii Gil et al., (2023) bylo analyzováno 5 druhů řemeslného piva (4 piva svrchního a 1 spodního kvašení) na obsah BA. Byly zjištěny velmi nízké koncentrace BA. Celkově se obsah BA pohyboval nejvýše do 9,6 mg/l. Bylo detekováno velmi malé množství histaminu u všech piv (do 0,32 mg/l). Nízké hodnoty byly zjištěny také u tyraminu (max. 2,9 mg/l) i přes to byl tento amin detekován v nejvyšším množství ze všech stanovovaných BA. Autoři se shodují, že výroba piva v minipivovarech může přinést vyšší hygienický

standart do výroby, protože se používají modernější zařízení (nerezové nádoby, ovládání počítačem, aj.).

Ve Španělsku bylo analyzováno 26 vzorků řemeslného piva různých druhů (světlé, tmavé, polotmavé a pšeničné) z několika evropských zemí. Byl zjištěn celkový obsah BA v rozmezí 5,8-19,6 mg/l, až na výjimky byl nejvíce detekován putrescin. Obsahy tyraminu (max. 6,5 mg/l) a histaminu (max. 5,7 mg/l) byly nižší při srovnání s jinými studii v této zemi. Autoři potvrdili, že vyšší produkce BA je při nižším pH, což může značit mikrobiální kontaminaci bakteriemi skupiny *Lactobacillus*. Dále bylo zjištěno, že výskyt BA není v některých pivovarech homogenní a u různých šarží se liší. Větší vliv na obsah BA má místo výroby (pivovar) a suroviny, než styl vyráběného piva. (Poveda, 2019)

Výzkum v oblasti výskytu BA v řemeslných pivovarech u nás provedli Lorencová et al., (2020). Bylo analyzováno 115 vzorků piv z minipivovarů přičemž byly vzorky rozděleny dle extraktu původní mladiny (EPM). Analýza probíhala při koupi a na konci data minimální trvanlivosti. Ve všech pivech byl detekován spermin a spermidin ovšem v bezpečných koncentracích. Na konci trvanlivosti se obsah histaminu zvýšil z původních 20 % vzorků na 30 %. U některých jeho koncentrace přesahovala 20 mg/l, což dle autorů může citlivým jedincům způsobit problémy. Ve většině (90 %) byl detekován putrescin a kadaverin v různých koncentracích <10-20 mg/l. Ovšem u některých vzorků obsah kadaverinu přesáhl 100 mg/l. Tato koncentrace může být nebezpečná především pro synergický účinek na jiné BA. Nejvíce detekovány BA byl tyramin. Závěrem bylo zjištěno, že 30 % všech vzorků obsahovalo 50-100 mg/l a u 18 % vzorků přesáhl obsah více jak 100 mg/l. Autoři vyvodili závěr, že řešením by bylo nastavení lepší hygieny výroby.

Při studiu výskytu BA v nealkoholickém pivu v práci Aflaki et al., (2014) byly zjištěné velmi nízké hodnoty u všech studovaných vzorků (nealko piva z různých zemí). Histamin nepřesáhl hodnotu 0,48 mg/l a kadaverin 0,32 mg/l. Nejvyšší koncentrace byla detekovaná u tyraminu 2,56 mg/l. Co se týče celkového obsahu BA, hodnoty se pohybovaly v rozmezí 2,25-6,74 mg/l.

### 3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VYBRANÉ VLASTNOSTI SLADU A PIVA

#### 3.1 Slad

##### 3.1.1 Odrůda ječmene

Odrůda ječmene významně ovlivňuje vyrobený slad i jeho použití. Pěstitelé ječmene kladou důraz například na výnos, nepoléhavost, odolnosti k porůstání nebo k hmotnosti 1000 zrn. Pro sladovny jsou naopak klíčové parametry extrakt, optimální poměr dusíkatých látek, optimální luštitelnost zrna. Byl také vytvořen parametr nazýván *Ukazatel sladovnické kvality*. Ten zahrnuje obsah dusíkatých látek, extrakt v sušině sladu, relativní extrakt při 45 °C, Kolbachovo číslo aj. (Dráb et al., 2013). Významnou odrůdou se na konci 19. století stala odrůda Proskovcův hanácky. Tato odrůda vznikla šlechtěním původních krajinných odrůd a stala se v té době základní odrůdou nejen u nás, ale i ve světě. Stala se taky jednou ze základních odrůd v šlechtitelských programech. Odrůdy ječmene bývají zařazeny do pěstování a později dle nových požadavků nahrazeny za nové. V současnosti šlechtění probíhá na úrovni molekulární genetiky, kdy je možné získávat odrůdy s vlastnostmi, které by běžným křížením bylo dosaženo za delší dobu (nebo vůbec). (Olšovská et al., 2018; Basářová et al. 2023) Některé odrůdy mají specifické vlastnosti, kterými jsou určeny na vaření piva s CHZO (Chráněné zeměpisné označení) České pivo. Seznam těchto odrůd se každý rok pravidelně aktualizuje dle Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského a.s. (ÚNMZ, 2009). Pěstitelské plochy v roce 2022 byly nejčastěji osety odrůdou Bojos (22,41 %), Overture (12,25 %) a Laudis 550 (11,79 %) (Psota, 2022).

##### 3.1.2 Obsah vody (stupeň domočení)

Ječmen před máčením obsahuje asi 8-10 % w/w vody. Tato voda se nazývá konstituční a udržuje zrno ve stavu, ve kterém dokáže začít klíčit při přechodu do vhodných podmínek. Těsně po sklizni může ječmen obsahovat nejvýše 16 % w/w vody, ale pro skladování je vhodnější 12,5 – 15,0 % w/w (Černý, 2007). Při vyšším obsahu vody hrozí zahřívání, vyšší produkce CO<sub>2</sub> a tím zadušení zrna a prodýchávání extraktu. Obsah vody má významnou roli během máčení a klíčení, kdy lze jejím obsahem ovlivnit vlastnost vyrobeného sladu. Během máčení se postupně zvyšuje obsah vody (stupeň domočení). Zrno překonává klidové stádium a začíná klíčit. Pro slady světle se volí nižší stupeň

domočení (40-44 % w/w) a pro tmavé vyšší (45-48 % w/w). Při špatných ročních zrna vodu přijímá špatně a hrotí riziko utopení zrna (zničení zárodku). Na rychlost příjmu vody zrnem má vliv i velikost obilky. Při klíčení patří obsah vody mezi hlavní regulátory ovlivňující výsledné vlastnosti sladu. Při vyšším obsahu se dosahuje vyššího rozluštění, lepší aktivity enzymů a kratší doby klíčení. Naopak může být hromada nevyrovnaná a hrozí vyšší ztráta hmotnosti prodýcháním. V případě, že ječmen v hromadě nedosahuje požadovaného obsahu vody jsou během klíčení hromady kroupy. Pro výrobu tmavších sladů se cílí na vyšší rozluštění, aby byly přítomné prekurzory pro tvorbu sensoricky aktivních látek během hvozdění. Při sušení zeleného sladu dochází ke snižování obsahu vody na hodnoty, při kterém lze slad dlouhodobě skladovat (cca 4,5 % w/w). Hvozdění by mělo být pozvolné, aby se odstranila i voda vázaná až do fáze rovnovážné vlhkosti (nelze odstranit sušením). Celkový obsah vody v zeleném sladu ovlivní spotřebu energie při hvozdění a čas k tomu potřebný. Během skladování sladu obsah vody mírně stoupá. (Basařová et al., 2021). Dle ČSN 56 6610 je nejvýše přípustný obsah vody světlého plzeňského sladu 5 % w/w (ÚNMZ, 2010).

### 3.1.3 Obsah dusíkatých látek

Obsah dusíkatých látek v ječmeni je výrazně ovlivněn agronomickými podmínkami během pěstování. Lze se setkat s označením *celkový obsah bílkovin*, ale tato skupina zahrnuje i dusíkaté látky nebílkovinové povahy. Za optimální se považují hodnoty od 10,5 – 11,7 % w/w. S vyšším obsahem dusíkatých látek (bílkovin) se zvyšuje tvrdost obilky a dochází k horšímu rozluštění, také se zhoršuje extraktivnost. Pro sladařství jsou nevhodné ječmeny s obsahem dusíkatých látek pod 10 % w/w. Použití takových ječmenů vede k nízké aktivitě enzymů a nízkých hodnot relativního extraktu vyrobeného sladu. U takto vyrobených piv může nastat problém s pěnivostí. Ječmeny s vyšším obsahem bílkovin je zapotřebí dostatečně namočit, aby došlo během klíčení k dostatečnému rozluštění. Během sladování se struktura dusíkatých látek mění a tím se ovlivňuje vlastnost vyrobeného sladu. Dochází ke štěpení bílkovin na produkty o nižší molekulové hmotnosti. Ty mají význam při tvorbě kořínků a strelky během klíčení a v pozdější fázi se během hvozdění účastní Maillardových reakcí. Ve výsledném pivu se podílí na plnosti. Velké množství látek o vysoké molekulové hmotnosti (nerozluštěné bílkoviny) vede k tvorbě zákalů. Ubytek bílkovin ve sladu oproti surovému ječmeni se udává 0,3 % w/w. (Prokeš, 2000; Basařová et al., 2021)

## 3.2 Pivo

### 3.2.1 Obsah zinku

Zinek je důležitý prvek ve výživě pivovarských kvasinek. V metabolismu je využíván v procesu syntézy bílkovin, tvorbě buněčné stěny a činnosti některých buněčných organel (Golgio aparát). Má vliv na působení až 300 enzymů, nejdůležitěji alkoholdehydrogenázy. Zinek se do mladiny dostává ze sladu, kde je v zrně lokalizován především v obalové vrstvě. Jen velmi malá část zinku přejde ze sladu do mladiny během rmutování. Většina se během varu vysráží s bílkoviny. Při nízké hladině zinku může kvašení probíhat pomalu. Bylo zjištěno, že při zakvašení dochází k rychlému poklesu obsahu zinku v mladině a jeho přechodu do buňky. V buňce je pak velká část zinku lokalizovaná ve vakuole. Na konci kvašení mohou kvasnice před odstřelením vykazovat nízký obsah zinku. Vysoké obsahy v mladině mohou být pro kvasinky toxické. (De Nicola a Walker, 2009) Podobná zjištění byla prokázána při použití ječmene hnojeného vyšším množstvím zinečnatých hnojiv. Sladina vyrobená z takové suroviny vykazoval rychlejší začátek kvašení. (Cerkal et al., 2010) Obsah zinku v mladině by měl být v rozmezí 0,1-0,3 mg/l (Hill, 2015).

### 3.2.2 Obsah diacetylu

Diacetyl (2,3 butandion) je chemická sloučenina patřící mezi vicinální diketony. Charakterizuje ji silné nasládlé těkavé aroma připomínající chuť másla. Jeho výskyt v pivu je nepříjemný a projevuje se především u piv typu ležák. Diacetyl je přirozený produkt kvasinek, které vylučují  $\alpha$ -acetolaktát v metabolismu syntézy aminokyseliny valin. Z této látky vzniká za působení enzymu  $\alpha$ -acetohydroxycidsyntázy diacetyl. Produkci lze ovlivnit obsahem kyslíku, teplotou kvašení, kmenem kvasinek nebo aminokyselinového složení média. Lze také redukovat aktivitu enzymu podílejícího se na přeměně prekurzorů. Diacetyl je v průběhu dokvašování (při nižších teplotách) kvasinkami odbouráván na látky, jejíž aroma není tak výrazné. Problém může nastat při zkrácení doby zrání nebo při nedostatku buněk ve zrajícím pivu. Případně lze vybírat kmeny kvasinek s nízkou tvorbou diacetylu. Snížit produkci vicinálních diketonu lze také na úrovni molekulární biologie (genetická rekombinace). Koncentrace diacetylu ve finálním výrobku neměla přesáhnout 0,05-0,1 mg/l. Pro určitý typ (značku) piva může být vyšší množství diacetylu typické a žádané. Nutno dodat, že za vyšší obsah diacetylu může také mikrobiální kontaminace především rodem *Pediococcus* a skupinou *Lactobacillus*. (Liu, 2015; Vontrobová et al., 2017)

Technologickou možností eliminace diacetylu je zařazení diacetylové pauzy. Na konci hlavního kvašení se teplota kvašení mírně zvedne (o 5 °C) a ponechá několik dní. Během této prodlevy dojde k rychlejšímu odbourání diacetylu, tím se zkrátí doba ležení i riziko dalších nežádoucích chutí. Po konci pauzy následuje klasické chlazení a ležení. (Novotný, 2019)

### 3.2.3 Typ pasterizačního zařízení

Pasterizační zákrok zajišťuje usmrcení mikrobioty vyskytující se v pivu, spolu s přirozenými vlastnostmi piva (nízké pH, obsah alkoholu, hořkých látek, nízký obsah živin, anaerobní prostředí) vytváří mikrobiologickou stabilitu nápoje. V současné době jsou v pivovarství rozšířené především tunelové a průtokové (flash) pastery. Při použití tunelové pasterace je nepasterované pivo stáčené do obalu (skleněné láhve, plechovky) a uzavřeno. Následuje vstup do tunelového pasteru, kde výrobek putuje po páse a je postupně sprchován proudem vody (páry) o různé teplotě. Pro maximální úspory je zde využívána rekuperace teplé vody. Nárůst ohřevu musí být pozvolný jinak hrozí prasknutí skleněných láhví nebo vyboulení plechovek. Druhým typem je průtokový paster. Zde pivo prochází přes tepelný deskový výměník, kde dochází k rychlému dosažení cílové teploty, následuje doba výdrže (např. 72,5 °C/ 20 s) a chlazení. Zároveň teplé pivo ohřívá studené nepasterizované a tím je tento proces efektivnější. Studené pasterizované pivo je z vyrovnávacího tanku vedeno do plniče, kde musí být zachována velmi přísná hygiena, protože zde dochází ke kontaktu piva s okolním prostředím. Tento typ pasterace vyžaduje důkladnou mikrobiologickou kontrolu. (Wray, 2015)

Rozdíly v těchto zařízeních jsou značné a volba typu je především o možnostech pivovaru. Použitím tunelového pasteru je zamezena případná kontaminace po tepelném zákroku, pivo je ovšem déle vystaveno teplotnímu záhřevu, což může mít negativní vliv na organoleptické vlastnosti. Provoz takového zařízení je nákladnější ekonomicky i finančně. Průtoková pasterace sice zajistí krátkodobé zvýšení teploty (tím nižší vliv na senzorické vlastnosti) ovšem hrozí opětovná kontaminace při nedodržení hygienických podmínek v plniči. (Kinčl, 2022)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 CÍL PRAKTICKÉ ČÁSTI

V praktické části byly porovnávány tři sladovnické odrůdy ječmene ve vztahu k biogenním aminům během výroby sladu a piva. Výroba sladu byla sledovaná v provozním měřítku, kde byly odebírány vzorky v jednotlivých fázích výroby. Z odebraného sladu byly v laboratorním měřítku vyrobeny tři šarže piva (reprezentující odrůdu ječmene). Taktéž byly v jednotlivých fázích výroby piva odebírány vzorky. Cíle praktické části byly:

- Hlavním cílem práce bylo pozorovat vliv odrůdy ječmene na profil a obsah biogenních aminů při výrobě sladu a následně piva.
- Dílčím cílem práce bylo zaznamenávat provozní parametry při výrobě sladu a piva. Dále byl sledován vliv mikrobiologie ječmene, sladu a vyrobeného piva na obsah biogenních aminů.

## 5 METODIKA PRÁCE

### 5.1 Nástroje a pomůcky

- Odběrové sáčky (VIPOR, s.r.o., Česká republika)
- Chladnička (SK Design s.r.o., Česká republika)
- Vzorovnice (MERCY s.r.o., Česká republika)
- Ruční mlýnek na obilí Corona (Corona, Itálie)
- Třepačka Heidolph Promax 1020 (Heidolph, Německo)
- Láhev pivní NRW (PIVOTÉKA s.r.o., Česká republika)
- Korunkovačka (PIVOTÉKA s.r.o., Česká republika)
- Korunkové uzávěry (PIVOTÉKA s.r.o., Česká republika)
- Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)
- Běžné laboratorní vybavení
- Vybavení pro mikrobiologickou analýzu

### 5.2 Odběr vzorků ječmene a sladu

#### 5.2.1 Ječmen

Pro experimentální část byly odebrané vzorky ze tří sladařských odrůd ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) Odrůdy byly zvoleny tak, aby jejich rok registrace byl blízký. Současně byl výběr zaměřen také na to, zda je odrůda doporučena pro výrobu piva s CHZO „České pivo“. Taková odrůda je charakteristická nižším cytolytickým a proteolytickým rozluštěním a vyšším množstvím zbytkového extraktu (ÚNMZ, 2009). Ječmeny byly vypěstované v České republice v roce 2022. Před začátkem byl ječmen vyčištěn na vibrační čističce. K výrobě byl použit ječmen I. třídy. Byly použity odrůdy:

- **Francin**: Odrůda registrována v roce 2014 doporučená pro CHZO „České pivo“.
- **Laudis 550** (dále v textu Laudis): Odrůda registrovaná v roce 2013 doporučená pro CHZO „České pivo“.
- **Overture**: Odrůda registrovaná v roce 2014 doporučená pro výrobu běžných piv.

## 5.2.2 Odběrové schéma a postup

Tabulka 2: Schéma odběru vzorku – ječmen a slad

Odběr	Popis odběru	Měřený provozní parametr
Před máčením	Odběr surového ječmene během navažování.	Celkový obsah bílkovin, obsah vody
Po vymáčení	Odběr ihned po konci máčení (máčení 32 hodin s jednou vzdušnou přestávkou).	Stupeň domočení
1. den klíčení	Odběr klíčícího ječmene po 1. dnu klíčení.	Stupeň domočení
2. den klíčení	Odběr klíčícího ječmene po 2. dnu klíčení.	Stupeň domočení
3. den klíčení	Odběr klíčícího ječmene po 3. dnu klíčení.	Stupeň domočení
4. den klíčení	Odběr klíčícího ječmene po 4. dnu klíčení.	Stupeň domočení
5. den klíčení	Odběr klíčícího ječmene po 5. dnu klíčení.	Stupeň domočení
Slad neodklíčený	Odběr neodklíčeného sladu ihned po skončení hvozdění (dotahování 80 °C/3 h).	
Slad odklíčený	Odběr odklíčeného sladu po výstupu z odkličovadla.	Celkový obsah bílkovin, obsah vody, FAN*, Kolbachovo číslo, barva kongresní sladiny, extrakt sladu, konečné prokvašení
Slad po uležení	Odběr uskladněného sladu po 30 dnech/ 20 ± 2 °C.	

\*FAN (Free amino nitrogen) – volný aminodusík

Odběr vzorků probíhal v dubnu a květnu 2023 ve sladovně v České republice. Byl vyráběn a analyzován světlý slad. Vzorek ( $100\pm 50$  g) byl po odběru vložen do sáčku určeného ke mražení potravin a zmrazen ( $-14\pm 2$  °C). Vzorky byly takto uchovány až do analýzy. Fotografie z odběru vzorků jsou uvedeny v příloze I.

Místa odběru jsou uvedena v tabulce 2. Odběr vzorku proběhl stejně u každé odrůdy. Dále byly během výroby měřeny provozní parametry. Byl také odebrán vzorek sladového květu (klíčku) u odrůdy Laudis během odkličování, aby bylo možné ověřit výskyt BA v klíčku. Celkem bylo ve sladovně odebráno 31 vzorků.

### 5.2.3 Stanovení provozních parametrů

U odebraných vzorků byly měřeny provozní parametry. Měření probíhalo na přístroji Infracore 1241 (FOSS, Dánsko) dle metody EBC 3.13 a EBC 4.17, (1997). Stanovení bylo provedeno ihned po odběru vzorku. Každý vzorek byl měřen pětkrát ( $n=5$ ). Byly stanoveny:

- Obsah vody – Stanovení u ječmene a sladu, udává množství vody v zrně (% w/w)
- Stupeň domočení – Stanovení během máčení a klíčení, udává množství vody v zrně (% w/w)
- Celkový obsah dusíkatých látek – Obsah dusíku v ječmeni a sladu násoben faktorem 6,25 (% w/w)

Dále byla připravena kongresní sladina dle metody EBC 4.5.1, (2004). Každé stanovení probíhalo třikrát ( $n=3$ ). Na kongresní sladině byly stanoveny:

- FAN (volný aminodusík) – souhrn aminokyselin, amoniaku a malých peptidů přítomných ve sladině (mg/l), dle metody EBC 4.10, (1997).
- Kolbachovo číslo – poměr dusíku, který přechází ze sladu do sladině (% w/w), dle metody EBC 4.9.3, (2009)
- Barva kongresní sladině – udává barvu sladině měřenou spektrofotometricky při vlnové délce 430 nm (j. EBC), dle metody EBC 4.19, (2000).
- Extrakt sladu – množství extraktu, který přejde do roztoku během rmutování (% w/w), dle metody EBC 4.5.1, (2004)
- Konečné prokvašení – úbytek extraktu před a po vykvašení (%), informuje o složení sladině a množství zkvasitelných cukrů, dle metody EBC 4.11.1, (1999)

## 5.3 Výroba piva a odběr vzorků

### 5.3.1 Výroba piva

Z každé odrůdy vyrobeného sladu byly v laboratorních podmínkách uvařené tři šarže piva (pivo reprezentující odrůdu). Na každou šarži bylo použito  $750 \pm 10$  g sladu a 3 l vystírací vody. K výrobě piva byl použit vícekrokový infuzní způsob vaření (tabulka 3), zcukření bylo ověřeno jodovou zkouškou. Vyslazování bylo provedeno vodou o teplotě  $75 \pm 1$  °C na objem 3 l. Během chmelovaru byl přidán chmel Kazbek ( $\alpha$ -hořké kyseliny 5,72 % w/w; ročník 2022, Česká republika) ve dvou dávkách. Na začátku 5 g a v polovině 5 g. Celková doba chmelovaru byla 60 min. Pro kvašení byly použity spodní kvasnice *Saccharomyces pastorianus* Saflager S-189 (Fermentis, Francie). Kvašení probíhalo 10 dní při teplotě  $20 \pm 2$  °C. Následně bylo pivo stočeno do sterilovaných pivních láhví, hnědě barvy o objemu 0,5 l, s přídavkem dextrózy (6 g/l) a uzavřeny korunkovým uzávěrem. Pivo leželo 40 dní při teplotě  $4 \pm 2$  °C. Pivo nebylo filtrováno ani tepelně ošetřeno. Fotografie z výroby piva jsou uvedeny v příloze III.

Tabulka 3: Rmutovací schéma

Krok	Teplota (°C)	Doba prodlevy (min)
Vystírání	$55 \pm 2$	10
	$62 \pm 2$	20
	$72 \pm 2$	30
Odrmutování	$75 \pm 2$	5

### 5.3.2 Odběr vzorků

Odběr vzorku pro stanovení BA probíhal dle schématu u každé odrůdy (tabulka 4). Vzorek byl odebrán a ihned zmražen na teplotu  $-18 \pm 2$  °C v odměrné nádobce (objem vzorku  $50 \pm 10$  ml). Celkem bylo odebráno 21 vzorků.

Tabulka 4: Schéma odběru vzorku – pivo a meziprodukty

Odběr	Popis odběru
Rmut 10 minu po vystírání	Odběr po smísení sladového šrotu s vodou.
Rmut na konci rmutování	Odběr po odřmutování. Před začátkem scezování.
Sladina	Odběr před začátkem chmelovaru.
Mladina	Odběr po ochlazení mladiny na zákvasnou teplotu. Před přidáním kvasnic.
Pivo po vykvašení	Odběr vykvašeného piva před stáčením do láhve.
Pivo hotové z láhve	Odběr piva z láhve po konci ležení.

### 5.3.3 Analýzy meziproduktů a piva

Refraktometrická sušina mladiny a piva byla stanovena na digitálním refraktometru Digital refractometer Kern ORF 45BE (Kern & Sohn GmbH, Německo). Měření bylo provedeno třikrát ( $n=3$ ). U hotových piv byla na přístroji Anton Paar Density Meter DMA 4500M s modulem Alcoalyzer Beer ME (Anton Paar GmbH, Rakousko) měřena hodnota specifické hustoty a alkoholu (% v/v). Měření bylo provedeno dvakrát ( $n=2$ ). Hodnota pH vyrobeného piva byla měřena na pH metru HI 99161 (Hanna instruments, Česká republika) s elektrodou. Měření bylo provedeno dvakrát ( $n=2$ ). Pivo bylo před analýzou odplyněno na třepačce po dobu 30 minut.

## 5.4 Stanovení biogenních aminů ve sladu, chmelu a v pivu

Stanovení BA probíhalo dle Buňka et al., 2012; Lorencová et al., 2020; Míšková et al., 2023. Každý vzorek byl připraven a měřen čtyřikrát ( $n=4$ ). Fotografie ze stanovení provozních parametrů a BA jsou uvedeny v příloze II.

### Příprava vzorků

Navážka pevného lyofilizovaného vzorku  $1,0 \pm 0,1$  g byla v kádince smísená s 10 ml kyseliny chloristé ( $c=0,6$  mol/l) a protřepána 45 minut na třepačce. Vzorek byl odstředěn (6000 ot/min) po dobu 10 minut a kapalná část byla přelita do další kádinky (objem 25 ml) a k pevné část bylo přidáno 7 ml kyseliny chloristé ( $c=0,6$  mol/l) a znovu potřepáno po

dobu 45 minut a odstředěno za stejných podmínek. Kapalný podíl byl znovu oddělen od pevného a celá extrakce byla potřetí zopakována. V dalším kroku byl tekutý podíl v kádince doplněn kyselinou chloristou ( $c=0,6$  mol/l) na objem 25 ml a přefiltrován přes filtrační papír. Filtrát byl dále použit k derivatizaci stejně jako tekuté vzorky.

### **Příprava karbonátového pufru**

Bylo připraveno 240 ml karbonátového pufru. Nejdříve byl připraven 230 ml roztok hydrogenuhličitanu sodného ( $c=0,5$  mol/l), do kterého byl přidán roztok uhličitanu sodného ( $c=0,5$  mol/l) až do ustálení pH na hodnotě 9,2. Bylo odměřeno 240 ml tohoto roztoku a do něj byla přidána navážka uhličitanu draselného, aby bylo docíleno koncentrace 0,333 g/l ml. Hodnota pH vzniklého roztoku byla 11,1 až 11,2. Roztok byl během přípravy míchán na magnetickém míchadle.

### **Příprava roztoku dansylchloridu**

Roztok byl připraven smícháním  $1,6\pm 0,1$  g dansylchloridu a s 320 ml acetonu.

### **Derivatizace vzorků**

Do derivatizační nádoby bylo odpipetováno 0,1 ml vnitřního standartu (1,7-heptandiamin o koncentraci 500 mg/l v kyselině chloristé o koncentraci 0,6 mol/l). Dále byl přidán 1 ml vzorku a k němu přidán 1,5 ml karbonátového pufru. Bylo přidáno 2 ml připraveného roztoku dansylchloridu a poté byly vzorky třepány na třepačce po dobu 20 hodin v temnu. Dále bylo ke vzorku přidáno 0,2 ml roztoku prolinu ( $c= 0,1$  g/ml) a třepáno 1 hodinu. Poté bylo do každé nádoby přidáno 3 ml heptanu a celá směs byla 3 minuty intenzivně protřepána. Ze vzniklé heptanové vrstvy bylo odpipetováno 1 ml do vialky a zbytek rozpouštědla bylo odpařeno proudem dusíku při teplotě  $62\pm 2$  °C. Vzniklý produkt byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu a vzniklá směs byla přefiltrována přes filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m. Do analýzy na kapalinovém chromatografu byly vzorky uchovány v chladničce při teplotě  $3\pm 2$  °C.

### **Analýza vzorku na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC)**

BA byly analyzovány pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Dionex HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro separaci byla použita kolona ZORBAX Eclipse Plus C18, 50 mm  $\times$  3,0 mm, 1,8  $\mu$ m (Agilent Technologies, USA). Vlnová délka pro spektrofotometrickou detekci byla  $\lambda = 254$  nm.

## 5.5 Mikrobiologický rozbor

### 5.5.1 Ječmen a slad

Mikrobiologický rozbor byl proveden u vzorku ječmene před máčením a sladu po uležení. Vzorky byly před analýzou vytemperované na teplotu  $20 \pm 2$  °C. Bylo použito desítkové ředění a očkovovalo se ředění od  $10^{-1}$  až  $10^{-5}$  dle očekávaných nárůstů. K přípravě ředění byl použit sterilní fyziologický roztok (NaCl 0,9 % w/w). Vzorky byly očkovány na Petriho misky s živnou půdou nebo byly očkovány přelivem. Při očkování bylo postupováno dle zásad aseptické práce. Byly použity živné půdy:

Plate Count agar (PCA) – Půda pro stanovení aerobních mikroorganismů, množství 0,1 ml bylo naočkováno roztěrem. Kultivace 72 h při  $30 \pm 2$  °C.

Půda dle Mana, Rogosa a Sharpe (MRS) – Půda pro stanovení mléčných bakterií, množství 0,1 ml bylo naočkováno roztěrem. Kultivace 72 h při  $30 \pm 2$  za anaerobních podmínek.

Půda s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou (VRBL) – Půda pro stanovení koliformních bakterií, množství 1 ml bylo očkováno přelivem. Kultivace 24 h při  $37 \pm 2$  °C.

Dichloranový glycerolový agar (DG 18) – Půda pro stanovení plísní a kvasinek v potravinách s nižší vodní aktivitou (např. cereálie). Množství 0,1 ml bylo očkováno roztěrem. Kultivace 5 dní při  $25 \pm 2$  °C.

### 5.5.2 Pivo

Mikrobiologický rozbor vyrobeného piva byl proveden po 90 dnech ležení. K rozboru byly použity dva způsoby očkování. Metoda roztěrem a metoda membránové filtrace.

#### Metoda roztěrem

Láhev byla vychlazená ( $4 \pm 2$  °C) a asepticky otevřena. Dále bylo postupováno za stejných podmínek jako u analýzy ječmene a sladu (kap. 5.5.1). Byly použity živné půdy:

PCA – Půda pro stanovení aerobních mikroorganismů. Množství 0,1 ml bylo očkováno roztěrem. Kultivace 72 h při  $30 \pm 2$  °C.

MRS - Půda pro stanovení mléčných bakterií, množství 0,1 ml bylo naočkováno roztěrem. Kultivace 72 h při  $30 \pm 2$  za anaerobních podmínek.



Chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení (DRBC) – Půda pro stanovení kvasinek a plísní. Množství 0,1 ml bylo očkováno roztěrem. Kultivace 5 dní při  $25\pm 2$  °C.

Acetobacter agar (AA) – Půda pro stanovení bakterií rodu *Acetobacter*. Množství 0,1 ml bylo očkováno roztěrem. Kultivace 3-5 dní při  $30\pm 2$  °C.

### **Membránová filtrace**

Láhev byla vychlazena ( $4\pm 2$  °C), asepticky otevřena a rozočkovaná ve sterilním laminárním boxu. Bylo očkováno  $20\pm 2$  ml piva metodou membránové filtrace (Merck Millipore, USA). Propustnost membránového filtru byla 0,45 µm. Pro rozbor byly použity kultivační média:

PCA s nystatinem – Půda pro stanovení aerobních mikroorganismů. Pro inhibici růstu kvasinek byl přidán nystatin. Kultivace 48 h při  $25\pm 2$  °C.

MacConkey agar (MC) – Půda pro stanovení koliformních bakterií a řádu *Enterobacteriales*. Kultivace 72 h při  $37\pm 2$  °C.

Raka-Ray agar (R-R) – Půda pro stanovení bakterií mléčného kvašení. Kultivace probíhala anaerobně 7 dní při  $28\pm 2$  °C.

NBB-Agar s růstovým faktorem (F) – Půda pro stanovení striktně anaerobních bakterií schopných kazit pivo. Modifikace růstovým faktorem pro selekci růstu hledané skupiny mikroorganismů. Kultivace probíhala anaerobně 7 dní při  $28\pm 2$  °C.

CuSO<sub>4</sub> agar – Půda pro stanovení divokých kvasinek rodu *Saccharomyces*. Kultivace probíhala 4 dny při  $27\pm 2$  °C.

Lyzinový agar (LYS) – Půda pro detekci divokých kvasinek skupiny *non-Saccharomyces*. Kultivace 7 dní při  $25\pm 2$  °C.

NBB-C – Tekutá půda pro stanovení bakterií kazících pivo. V uzavřené láhvi s patentním uzávěrem bylo smícháno 10 ml tekuté půdy NBB-C, 150 ml vzorku piva a 90 ml dechlorované sterilní vody. Kultivace probíhala 7 dní při  $20\pm 2$  °C. Vyhodnocení probíhalo na základě vizuální a mikroskopické kontroly vzorku.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Provozní analýzy ječmene

U vzorků ječmene byl před začátkem sladování měřen obsah dusíkatých látek a obsah vody. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 5. V letech 2020-2022 byl obsah dusíkatých látek u odrůdy Francin 11,3 % w/w, Laudis 11,3 % w/w a Overture 10,5 % w/w (Psota, 2023). V této práci byl oproti tomuto průměru zjištěn nižší obsah u všech třech odrůd. Průměrný obsah dusíkatých látek při sklizni v roce 2022 byl 11,3 % w/w, což bylo hodnoceno jako příznivé. Celkový obsah vody u ječmenů v tomto roce byl 11,8 % w/w. (MZe, 2023) Obsah dusíkatých látek byl u vzorků použitých v experimentu podobný jako při zkouškách během jejich registrace (Psota et al., 2013; 2014).

Tabulka 5: Provozní parametry ječmene

	<b>Francin</b>	<b>Laudis 550</b>	<b>Overture</b>
Obsah dusíkatých látek (% w/w)	11,1±0,2	10,8±0,1	10,3±0,1
Obsah vody (% w/w)	11,7±0,1	12,6±0,1	10,9±0,1

Během klíčení byl měřen stupeň domočení. Zaznamenané stupně domočení během klíčení jsou uvedeny v tabulce 6. Nejvyšší stupeň domočení po máčení byl naměřen u odrůdy Overture (44,12±0,18 % w/w), nižší pak u Francin (42,56±0,40 % w/w) a Laudis (42,01±0,19 % w/w). Během klíčení byl ječmen dvakrát kropen (po 24 a 48 h). Vlivem toho došlo k nárůstu stupně domočení s maximem 2. den klíčení u všech třech odrůd (Francin 44,50 % w/w; Laudis 44,40 % w/w; Overture 45,14 % w/w). Následně obsah vody v klíčícím ječmeni klesal nejrychleji do 3. dne klíčení, z důvodu oschnutí, zhruba o 1,58-3,26 % w/w. Nejvýrazněji u odrůdy Overture Během dalších dnů nebyl pokles tak výrazný. Před nástěrem na hvozd (5. den klíčení) byl nejvyšší obsah vody u odrůdy Francin (41,52±0,16 % w/w), poté u Overture (40,48±0,08 % w/w) a nejnižší u Laudis (39,92±0,13 % w/w). V práci Psota et al., (2015) bylo zjištěno, že obsah vody na začátku klíčení ovlivňuje především cytolytické a proteolytické rozluštění zrna. Každá odrůda reaguje na změnu stupně domočení jinak.

Tabulka 6: Stupeň domočení během klíčení (% w/w)

	Po vymáčení	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den
<b>Francin</b>	42,56±0,40	42,80±0,12	44,44±0,11	42,86±0,18	42,32±0,19	41,52±0,16
<b>Laudis 550</b>	42,00±0,19	43,58±0,22	44,40±0,36	42,32±0,08	40,54±0,11	39,92±0,13
<b>Overture</b>	44,12±0,18	44,62±0,08	45,14±0,18	41,88±0,08	41,68±0,19	40,48±0,08

## 6.2 Analýza sladu

Vybrané provozní parametry sladu jsou uvedeny v tabulce 7. Obsah dusíkatých látek se během výroby buď nezměnil nebo mírně snížil, stejně jako u Psota et al., (2013; 2014). Obsah vody u vyrobeného sladu se pohyboval v běžných hodnotách (Mikyška a Prokeš, 2009). Vyšší obsah volného aminodusíku (FAN) byl naměřen u odrůdy Overture. Odrůda Francin a Overture dosáhly hodnot, kterých nejčastěji dosahují sladařské odrůdy ječmene. Nižší obsah byl zaznamenán u odrůdy Laudis. Hodnotu FAN ovlivňuje především ročník a místo pěstování (Psota, 2019).

Podobně to bylo u hodnoty Kolbachova čísla, což je ve shodě s hodnotami zjištěnými při zavádění těchto odrůd (Psota et al., 2013; 2014). Kolbachovo číslo udává množství dusíku, který přejde do sladiny ze sladu (Hartman et al., 2017). Světlý slad pro výrobu piva s CHZO „České pivo“ má mít hodnotu Kolbachova čísla 39±3 % (ÚNMZ, 2010). Obě odrůdy vhodné pro „České pivo“ tento parametr splnily. Odrůda Overture vykazovala vysokou hodnotu Kolbachova čísla. Toto odpovídá zjištění Psoty et. al., (2015), kteří zjistili hodnotu Kolbachova čísla u odrůdy Overture 44,7 % při stupni domočení 45 % w/w na začátku klíčení. Snížení stupně domočení na 42 % w/w vedlo ke snížení Kolbachova čísla.

Barva kongresní sladiny byla nižší u odrůdy Laudis, ovšem stále tato hodnota byla o málo vyšší než u analýz stejných odrůd u Psoty (2023). Nižší byly i extrakty sladu a hodnota konečného prokvašení. Nejvyšší extrakt sladu byl zjištěn u odrůdy Overture, stejně tak u hodnoty konečného prokvašení. Což může odpovídat vyššímu obsahu vody při vymáčení u této odrůdy.

Tabulka 7: Provozní analýza sladu

	<b>Francin</b>	<b>Laudis 550</b>	<b>Overture</b>
Obsah dusíkatých látek (% w/w)	11,2±0,2	10,8±0,1	10,1±0,2
Obsah vody (% w/w)	4,6±0,2	4,4±0,1	4,1±0,2
FAN (mg/l)	152±4	140±12	178±3
Kolbachovo číslo (%)	38,4±0,6	38,0±0,5	43,6±1,0
Barva kongresní sladiny (j. EBC)	4,0±0,2	3,5±0,1	4,0±0,3
Extrakt sladu (% w/w)	80,6±0,1	80,9±0,3	82,0±0,2
Konečné prokvašení (%)	77,2±0,6	79,3±0,4	81,3±1,4

### 6.3 Provozní analýza piva

Výsledky ze stanovení provozních analýz mladiny a piva jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Provozní analýza mladiny a piva

	<b>Francin</b>	<b>Laudis 550</b>	<b>Overture</b>
<b>Mladina</b>			
Refraktometrická sušina (% w/w)	12,6±0,1	13,9±0,1	13,4±0,1
<b>Pivo</b>			
Refraktometrická sušina (% w/w)	7,0±0,1	7,5±0,2	6,9±0,1
Specifická hustota (g/cm <sup>3</sup> )	1,0112±0,0001	1,0120±0,0001	1,0099±0,0001
Etanol (% v/v)	5,32±0,02	5,94±0,03	5,91±0,04
pH	4,33±0,10	4,30±0,10	4,30±0,10

Refraktometrická sušina mladiny byla nejvyšší u odrůdy Laudis a nejnižší u odrůdy Francin. Tento rozdíl může být způsoben nižším obsahem extraktu u odrůdy. Vyšší refraktometrické sušiny mladiny bylo dosaženo u odrůdy Overture. Výsledek koreluje s vyšším extraktem sladu (kap. 6.2). Vyšší obsah u odrůdy Laudis byl patrně způsoben neúmyslným zásahem do technologie během výroby. Pokud by se refraktometrická sušina dala považovat za hodnotu EPM (extrakt původní mladiny) lze vyrobená piva legislativně zařadit. Pivo z odrůdy Francin spadalo do kategorie ležák (EPM 11-12 % w/w), Laudis a Overture do kategorie plné pivo (EPM 13 % w/w a více). (Česká republika, 2018)

Refraktometrická sušina piva byla nejvyšší u odrůdy Laudis. Stejně tak tomu bylo u hodnoty specifické hustoty. Nejnižší specifická hustota byla naměřena u odrůdy Overutre, což odpovídá zjištění Psota et al., (2014), že tato odrůda vykazuje vysokou míru prokvašení (tedy snížení specifické hustoty). Tato informace je v souladu s údajem o konečném prokvašení zjištěné při analýze sladu. Nejvyšší obsah alkoholu byl zjištěn u piva odrůdy Laudis, což je v souladu s údaji o refraktometrické sušině mladiny. Hodnota pH u všech třech piv byla nižší než je uvedeno u piv vyráběných různým postupem např. Enge et al., (2005); Salek et al., (2022) nebo u většiny analyzovaných vzorků řemeslného piva u Silva et al., (2022).

#### 6.4 Biogenní aminy v ječmeni a sladu

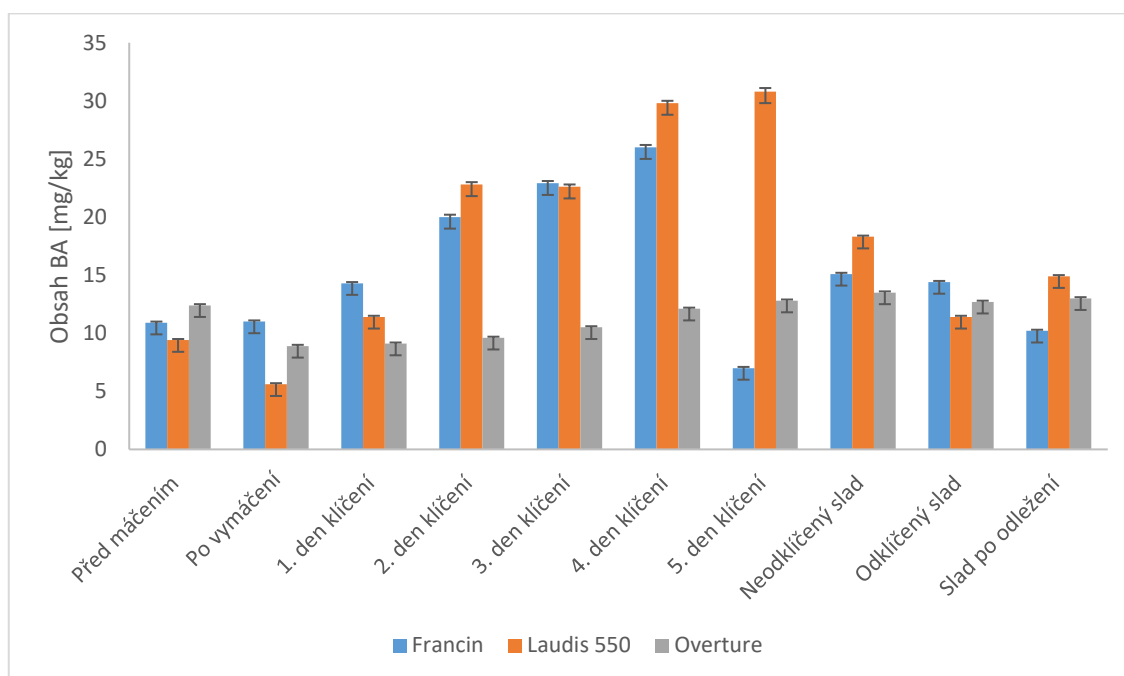
Hodnoty LOD (limit detekce) a LOQ (limit kvalifikace) jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Limity detekce a kvantifikace

Biogenní amin	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	R <sup>2</sup>
Tryptamin	3,49±0,01	10,58±0,02	0,999
Fenylethylamin	2,99±0,01	9,08±0,02	0,999
Putrescin	4,04±0,01	12,26±0,03	0,999
Kadaverin	3,61±0,01	10,92±0,01	0,999
Histamin	3,08±0,02	9,33±0,02	0,999
Tyramin	2,36±0,01	7,15±0,01	0,999
Spermidin	2,53±0,01	7,68±0,01	0,999
Spermin	3,29±0,02	9,96±0,02	0,999

Vývoj obsahu BA během výroby je uveden na obrázku 1. Po vymáčení ječmene byl zaznamenán stejný nebo mírně nižší obsah BA. Za nepatrné snížení obsahu v tomto kroku může být vyloučení těchto látek do hydrofilního prostředí máčecí vody. Následujících 5 dnů klíčení obsah BA rostl nejvíce u odrůdy Francin a Laudis. Velmi pozvolný byl nárůst BA u odrůdy Overture. Neodklíčený slad obsahoval, kromě odrůdy Overture, nižší množství BA než zelený slad (naklíčený ječmen před hvozdním, 5. den klíčení). Odklíčením sladu došlo také k mírnému poklesu, který mohl být způsoben odstraněním klíčku. Dosud neexistuje detailní práce o výskytu BA v klíčku, včetně případného vlivu na zdraví zvířat při jehož krmení se sladový květ především využívá. Odležením se mírně změnil obsah BA v znu. Dle Galarce et al. (2016), byl celkový obsah BA ve sladu od třech různých pivovaru od 155 – 214 mg/kg. Byl zaznamenán daleko nižší obsah v surovém ječmeni než ve vyrobeném sladu, což je v souladu s Izquierdo-Pulido et al., (1994), kde bylo zjištěno, že za nárůst obsahu může metabolická činnost během růstu zrna.

Srovnat celkové množství s jinými autory je problematické. Autoři často stanovují různé BA, ze kterých pak vyhodnocují celkové množství. Z tohoto důvodu bude v další části diskutována především přítomnost jednotlivých biogenních aminů.



Obrázek 1: Celkový obsah BA během výroby sladu

V této práci byl sledován vývoj a obsah osmi BA (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin, spermin). Během výroby sladu nebyl v žádném vzorku detekován tryptamin, histamin a spermidin.

Tryptamin nebyl detekován ve šrotovaném sladu u Kalače et al., (1997) a ani v případě použití kukuřice jako surogátu (Romero et al., 2003). Malé množství tryptaminu bylo zjištěno v práci Izquierdo-Pulido et al. (1994) v závěru klíčení ječmene a ve vyrobeném sladu. Ovšem detekované množství nepřesáhlo 4 mg/kg.

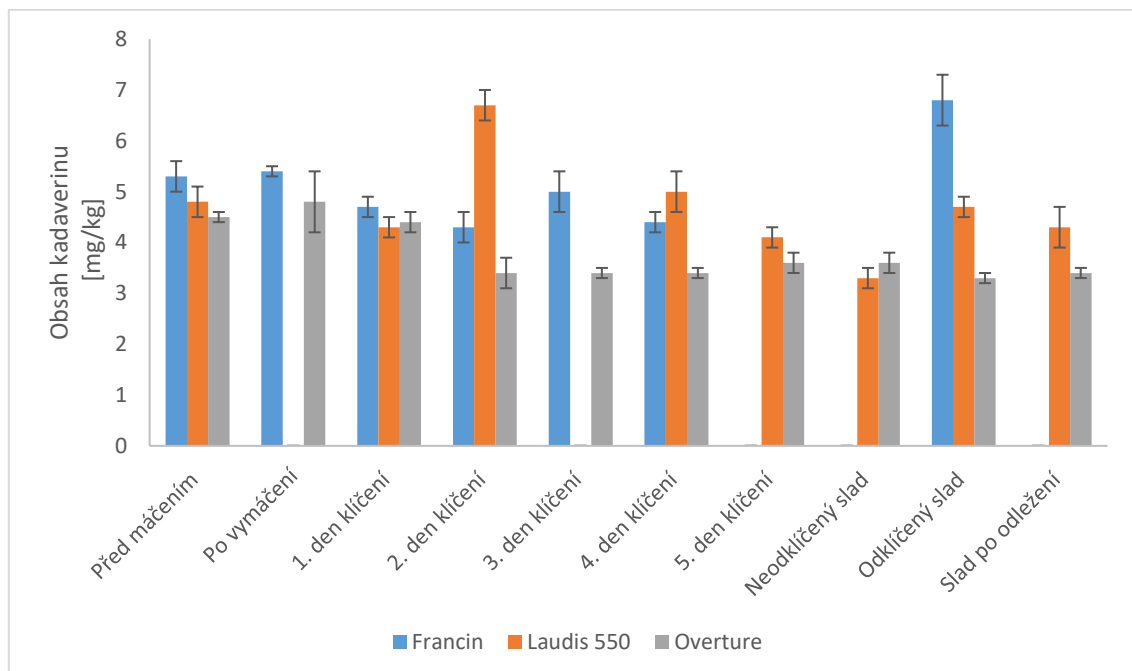
Obsah histaminu je v potravinách sledován a u citlivých osob může jeho přítomnost v různých koncentracích vyvolávat zdravotní potíže (Sánchez-Pérez et al., 2018). Z toho důvodu je mu v odborné literatuře věnovaná zvláštní pozornost. Bylo zjištěno, že ječmen neobsahuje enzym histidin-dekarboxyláza. Přítomný histamin je tedy vždy jiného původu než z metabolismu obilky (Halász et al., 1999). V některých studiích buď nebyl histamin detekován nebo pouze ve stopovém množství (Galarce et al., 2016; Romero et al., 2003). Velmi malý nárůst byl po 2 dnech klíčení pozorován u Izquierdo-Pulido et al. (1994), ale celkový obsah ve vyrobeném sladu byl  $2,7 \pm 0,3$  mg/kg. Byly však zjištěny i vyšší obsahy histaminu ve sladovém šrotu od 6,75-17,3 mg/kg (Kalač et al., 1997). Při klíčení ječmene nebyl zaznamenán významný rozdíl v obsahu histaminu v surovém ječmeni a ve vyklíčeném zrna (Çelik et al., 2023). Každopádně, nepřítomnost histaminu během sladování je známkou dobré hygienické praxe ve výrobním podniku (Durak-Dados et al., 2020).

Spermidin je polyamin, který se přirozeně účastní metabolismu rostlin (Gill a Tuteja, 2014). Přestože v této práci nebyl pozorován výskyt spermidinu, v jiných studiích byl běžně detekován. Byl pozorován výskyt v surovém ječmeni ( $15,8 \pm 0,3$  mg/l) i jeho přírůstek během klíčení až na hodnotu  $44,8 \pm 2,9$  mg/kg ve sladu (Izquierdo-Pulido et al., 1994). Obsah v nesladované kukuřici byl ve srovnání s ječným sladem velmi rozdílný. Zatímco nesladovaná kukuřice obsahovala 4,38 mg/kg, ječný slad 42,57 mg/kg. Tento rozdíl je způsoben aktivitou dekarboxylačních enzymů během klíčení ječmene při teplotách 18-20 °C. (Romero et al., 2003) Vyšší hodnoty v ječném sladu byly naměřeny u Galarce et al. (2016) a to 55,58 – 82,54 mg/kg.

Během klíčení byl ojediněle zaznamenán výskyt fenylethylaminu. U odrůdy Francin byl zaznamenán 1. den klíčení v množství  $4,9 \pm 0,4$  mg/kg, ale dále již pozorován nebyl. Ovšem 2. den klíčení vzrostl u odrůdy Francin obsah tyraminu na podobnou úroveň ( $4,7 \pm 0,2$  mg/kg), mohlo dojít k metabolické přeměně na tyramin. Na konci klíčení (5. den) odrůdy

Laudis byl zaznamenán fenylethylamin v množství  $6,0 \pm 0,5$  mg/kg. Autoři Izquierdo-Pulido et al. (1994) zaznamenali fenylethylamin během klíčení (3. den), který se v malém množství zachoval i ve vyrobeném sladu ( $1,8 \pm 0,4$  mg/kg). Naopak nebyl zaznamenán u ječného sladu ani u nesladované kukuřice (Romero et al., 2003). Ve vyklíčeném ječmeni byl zaznamenán 5 krát vyšší obsah fenylethylaminu než v původní surovině u Čelik et al., (2023). Původní hodnoty  $10 \pm 1$   $\mu\text{g/kg}$  se během klíčení zvýšily na  $54 \pm 10$   $\mu\text{g/kg}$ .

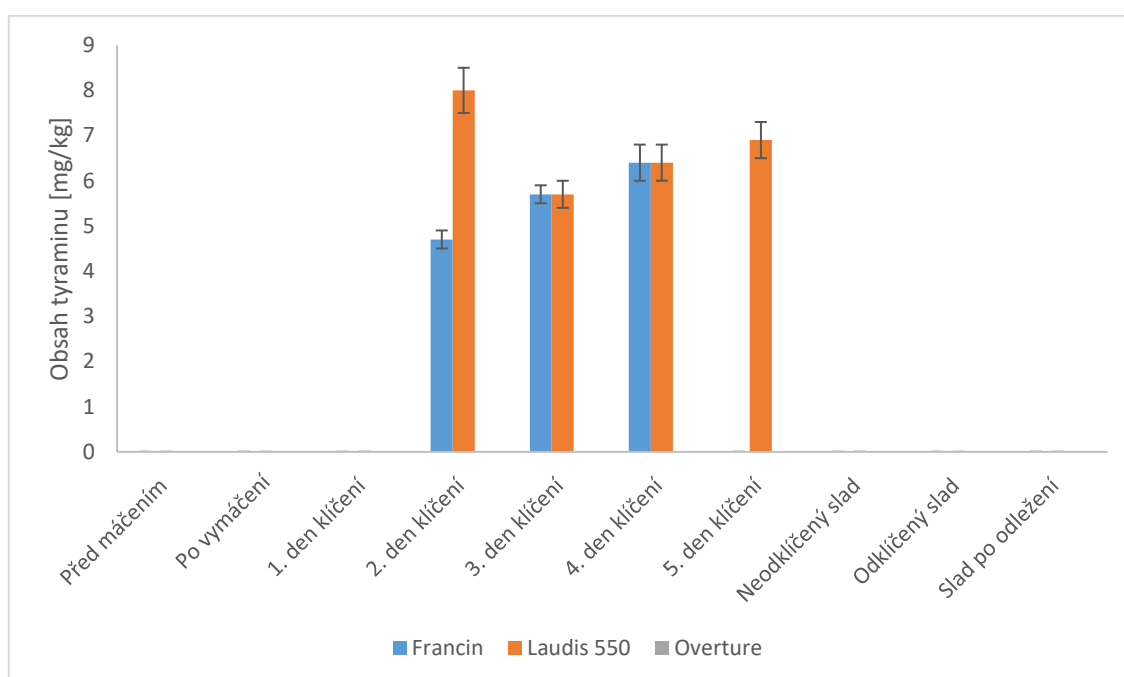
Obsah kadaverinu během výroby je graficky uveden na obrázku 2. Tento amin byl zaznamenán u všech zkoumaných odrůd. Celkově byly nejnižší hodnoty zjištěny u odrůdy Overture, kde se obsah kadaverinu postupně snižoval až do 2. dne klíčení, poté se významně nezměnil. V případě odrůdy Laudis nebyl v některých krocích kadaverin detekován. To mohlo být způsobeno chybou při měření. Stejně tak lze uvažovat, zda za snížení 5. den klíčení u odrůdy Francin může chybět měření, nebo kadaverin přítomný nebyl, každopádně v odklíčeném sladu se znovu nacházel. Kadaverin byl přítomný v ječmeni před začátkem máčení, toto zjištění se neshoduje s některými autory, kteří ve nesladovaných obilovinách nezaznamenali výskyt tohoto aminu (Izquierdo-Pulido et al., 1994, Romero et al., 2003). Vyšší hodnoty kadaverinu ve sladu byly zaznamenány u třech různých pivovarů, přičemž rozdíly byly významné (5,18-24,20 mg/kg) (Kalač et al., 1997). V některých případech nebyl kadaverin ve sladu detekován vůbec (Galarce et al., 2016).



Obrázek 2: Obsah kadaverinu během výroby sladu



Tyramin byl detekován pouze během klíčení u odrůdy Francin a Laudis (obrázek 3). U odrůdy Francin měl vzrůstající tendenci s maximem 4. den klíčení ( $6,4 \pm 0,4$  mg/kg). Vyšší obsah byl zaznamenán 2. den klíčení u odrůdy Laudis, dále byl růst pozvolný až do 5. dne klíčení ( $6,9 \pm 0,4$  mg/kg). V případě odrůdy Overture nebyl tyramin detekován. Zjištěné hodnoty byly nižší, než uvádí jiní autoři. Potvrdilo se, že obsah tyraminu během klíčení roste, ovšem u Izquierdo-Pulido et al., (1994) přetrvával i ve vyrobeném sladu ( $14,6 \pm 6,1$  mg/kg). Byly zjištěné vyšší hodnoty ve šrotovaném sladu ( $20,10$ - $28,50$  mg/kg) (Kalač et al., 1997). Rozdílný obsah tyraminu způsobuje použitá odrůda ječmene i druh vyráběného sladu (Halász et al., 1999).

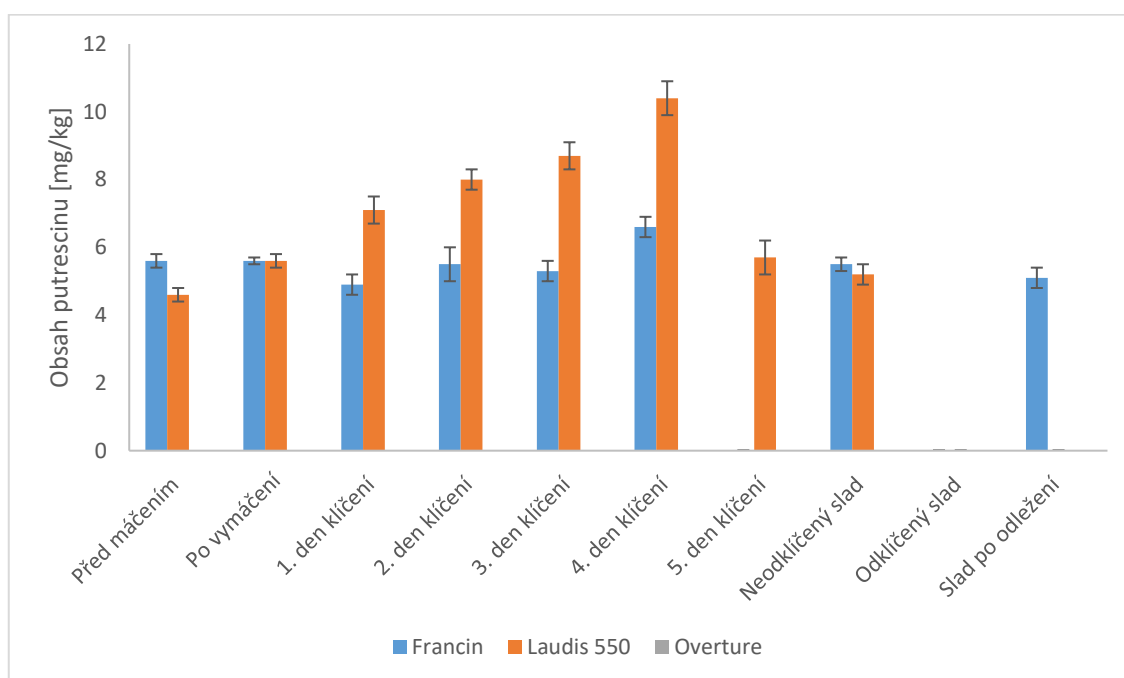


Obrázek 3: Obsah tyraminu během výroby sladu

Putrescin, spermin a spermidin patří mezi polyaminy, které se přirozeně vyskytují v metabolismu rostlin (Gill a Tuteja, 2014). Jak již bylo řečeno, spermidin nebyl u žádné odrůdy zjištěn. Obsah putrescinu a sperminu je uveden v grafu na obrázku 4 a 5. Vzrůstající trend je pravděpodobně způsoben metabolickou činností zrna. Z putrescinu vzniká spermidin a z něj poté spermin. Tyto dráhy platí i zpětně. (Teti et al., 2002)

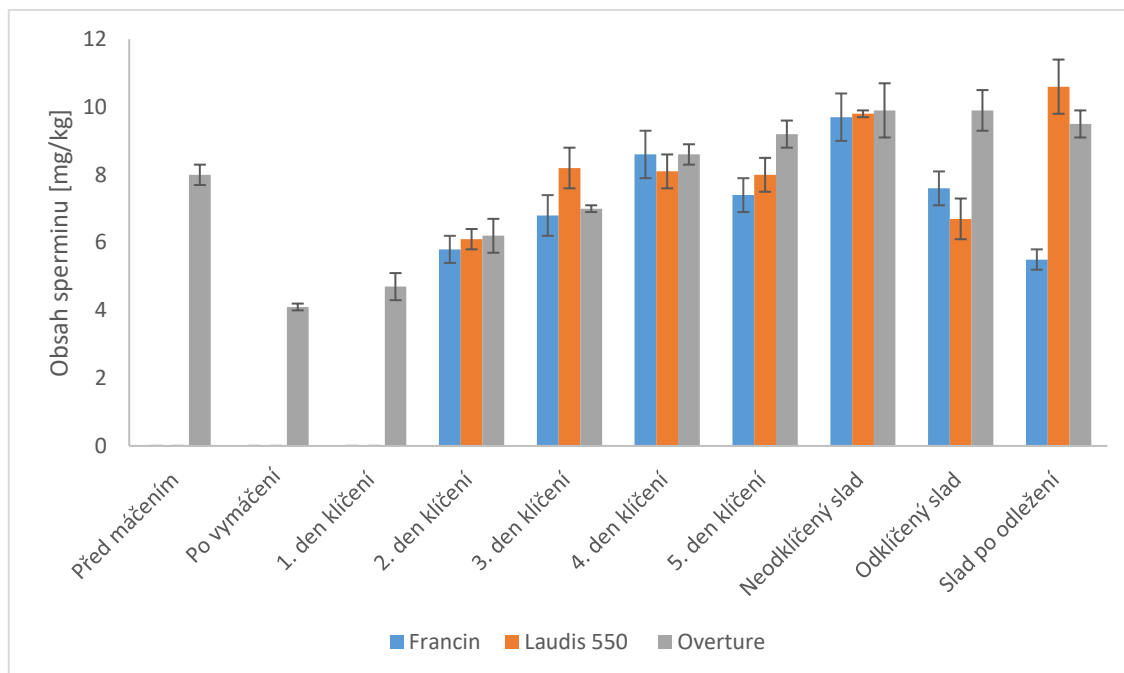
U odrůdy Francin byl putrescin zjištěn v ječmeni a jeho obsah se výrazně nezměnil během výroby sladu, pouze 5. den klíčení nebyl stanoven, ale lze předpokládat, že v zrna přítomný byl. V odhvozděném neodklíčeném sladu detekován byl, po odklíčení ne. Nárůst ve sladu po odležení mohl být způsoben mikrobiotou sladu. U odrůdy Laudis rostl obsah putrescinu během klíčení, s maximem 4. den ( $10,4 \pm 0,5$  mg/kg). Poté obsah klesal a

v odklíčeném sladu už nebyl detekován. Putrescin nebyl detekován u odrůdy Overture. U autorů Izquierdo-Pulido et al. (1994) byl putrescin detekován v ječmeni ( $10,8 \pm 1,2$  mg/kg) s nárůstem během klíčení a s maximem ve vyrobeném sladu ( $38,4 \pm 2,1$  mg/kg). Obecně lze předpokládat, že se jedná o odklíčený slad, protože tato operace patří do technologického postupu výroby sladu. Podobné hodnoty byly zjištěny i u jiných autorů (Romero et al., 2003). Velmi vysoké hodnoty zaznamenal u sladu ze třech různých pivovarů (dle objemu várky) Galarce et al. a to v rozmezí 70,66 – 90,62 mg/kg (Galarce et al., 2016). Byly také zaznamenány velmi vysoké rozdíly mezi různými typy sladu (Halász et al., 1999).



Obrázek 4: Obsah putrescinu během výroby sladu

Spermin byl zjištěn v surovém ječmeni pouze u odrůdy Overture. Jeho pokles po vymáčení mohl být způsoben částečným vyplavením do máčecí vody. Následně obsah sperminu rostl, od 2. dne klíčení, u všech odrůd podobně. U odrůdy Francin a Laudis byl po odklíčení zaznamenán pokles. U odrůdy Laudis po odležení obsah sperminu vzrostl, což může souviset s absencí putrescinu ve stejném kroku (Teti et al., 2002). Nejvýznamnější pokles ve vyrobeném sladu byl zaznamenán u odrůdy Francin. Během klíčení ječmene byl zaznamenán spermin v surovém ječmeni, i po celou dobu klíčení s maximální hodnotou  $22,5 \pm 1,6$  mg/kg ve vyrobeném sladu u Izquierdo-Pulido et al., (1994). Podobné výsledky obsahu sperminu byly zaznamenány u ječného sladu ( $14,23$  mg/kg) a nesladované kukuřice ( $3,4$  mg/kg) (Romero et al., 2003). Autoři Halász et al. (1999) potvrdili vliv odrůdy na obsah putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu.



Obrázek 5: Obsah sperminu během výroby sladu

V této práci byl také analyzován obsah BA ve sladovém květu odebraného u odrůdy Laudis. Celkový obsah byl  $35,6 \pm 0,3$  mg/kg a byl detekován fenylethylamin ( $17,7 \pm 1,2$  mg/kg), kadaverin ( $12,5 \pm 0,6$  mg/kg) a spermin ( $5,4 \pm 0,3$  mg/kg). Sladový květ je využíván především jako výživný přídatek do krmiv. Problematické je využití pro lidskou výživu, protože kořínky ječmene jsou nepříjemně hořké. (Karlović et al., 2020) Obsah BA ve sladovém květu (jako krmivo) nebyl podrobně sledován, větší pozornost je věnovaná například výskytu BA v různých typech silážích (Driehuis et al., 2018).

## 6.5 Biogenní aminy v chmelu

Obsah BA ve chmelu byl zjišťován u odrůdy Žatecký poloraný červeňák. Výsledky obsahu jsou uvedeny v tabulce 10. Chmel vykazoval nejvyšší obsah sperminu, fenylethylaminu, histaminu a spermidinu. Při výrobě piva se používá relativně nízká dávka chmele vzhledem k celkovému množství piva. Lze proto usoudit, že vysoké obsahy BA neohrožují zdraví konzumenta. Někteří autoři zjišťovali obsah BA v chmelu, resp. v chmelových výrobcích. Galarce et al., (2016) stanovili u třech různých pivovarů celkový obsah BA 123,56 mg/l, 134,65 mg/l, 174,10 mg/l. Nejčastěji byl detekován spermidin a poté putrescin, spermin a tyramin. V české studii autoři Kalač et al. (1997) zjišťovali obsah některých BA v chmelu a chmelových výrobcích. V chmelu byl zjištěn obsah putrescinu (13,70-23,90 mg/l), tyraminu (12,30-15,60 mg/l), kadaverinu (2,35-7,81 mg/l) a histaminu (5,49-6,91 mg/l). Podobné hodnoty byly zjištěny u chmelových granulí (pelety). U

chmelových extraktů byl zjištěn daleko vyšší obsah některých BA, což odpovídá tomu, že se jedná o extrakt. Byl stanoven putrescin (5,43 mg/l), tyramin (228,00 mg/l), kadaverin (7,51 mg/l) a histamin (53,10 mg/l). V žádné formě chmele nebyl detekován tryptamin.

Tabulka 10: Obsah BA v chmelu

<b>Biogenní amin</b>	<b>Obsah (mg/kg)</b>
Tryptamin	25,50±8,75
Fenylethylamin	59,43±5,26
Putrescin	11,09±9,30
Kadaverin	11,82±7,26
Histamin	89,03±24,93
Tyramin	18,36±3,27
Spermidin	26,78±12,96
Spermin	131,76±23,90
Celkový obsah BA	373,76±52,56

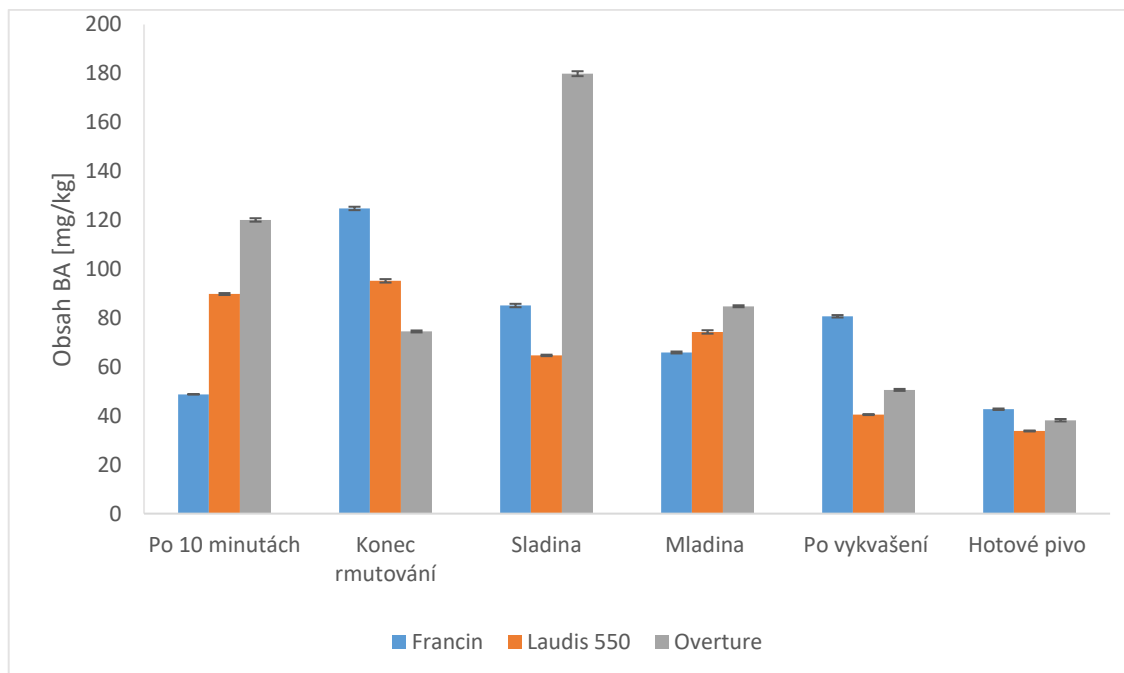
## 6.6 Biogenní aminy při výrobě piva

Grafický přehled obsahu BA během výroby piva je uveden na obrázku 6. Celkový obsah BA po vystírání se lišil dle odrůdy. Nejvyšší obsah byl zaznamenán u odrůdy Overture (120,9 mg/l). Na konci rmutování se výrazně zvýšil obsah u odrůdy Francin, a naopak došlo ke snížení u odrůdy Overture. Obsah u odrůdy Laudis byl podobný během celého rmutování. Po scezení a odstranění mláta se u odrůd Francin a Laudis snížil obsah BA. Vliv na obsah BA v mlátě byl zkoumán Kalačem et al., (1997), kdy bylo zjištěno, že množství a profil BA byl v mlátě různý, ale v žádném případě by neohrozil hospodářská zvířata, pro které je mláto určeno. Lze říci, že odstranění mláta mohlo mít na celkový obsah BA vliv, ovšem bylo by potřeba provést důkladnější analýzu mláta. Výrazně se zvýšily hodnoty u odrůdy Overture po scezení. Někteří autoři uvádějí podobné skokové nárůsty BA během rmutování, jako možnou příčinou poukazují na mikrobiální kontaminaci. (Galarce et al., 2016)

Snížení v mladině u odrůdy Overture je možné vysvětlit tepelným rozkladem některých BA během chmelovaru (Romero et al., 2003). Ve studené mladině před zakvašením byly u odrůdy Francin a Overture nižší hodnoty než ve sladince, u odrůdy Laudius se mírně zvýšily. Lze předpokládat nepatrný vliv chmele na vývoj obsahu BA. Po vykvašení došlo k poklesu obsahu u odrůdy Laudis a Overture a zvýšení u odrůdy Francin. V Galarce et al., (2016) byl v zjištěn úbytek, ale i nezměněný obsah BA ve srovnání mladina - po vykvašení a během zrání nebyly zjištěny výrazné změny v obsahu. V této práci zráním piva došlo ke snížení celkového obsahu BA u piv ze všech třech odrůd.

Celkový obsah BA v láhvi na konci zrání byl u odrůdy Francin  $42,7 \pm 0,3$  mg/l, Laudis  $33,8 \pm 0,2$  mg/l a Overture  $38,2 \pm 0,5$  mg/l. Toto zjištění lze srovnat s Lorencová et al. (2020), kdy bylo zjištěno, že ve vzorcích piv z českých minipivovarů se u, největšího podílu piv, pohyboval obsah mezi 20-50 mg/l. Ve vyrobeném pivu byly celkové obsahy BA u autorů Galarce et al., (2016) 11,82-65,29 mg/l. Obecně je bezpečná míra BA v potravinách v hodnotách 100 mg/l (mg/kg) (Fusek et al., 2020). Z tohoto hlediska byly všechny tři vyrobená piva bezpečná, ovšem musí se brát ohled na přítomný alkohol, který může bezpečnou hranici snížit (viz kap 2.1). Někteří autoři konstatují, že je obtížné stanovit toxickou hranici BA, protože to ovlivňuje citlivost jedince, skladba BA v potravině aj. (Vinci a Maddaloni, 2020). Pravidelné užívání některých typů antidepresiv může také blokovat degradační dráhy BA v lidském těle. Citlivost se poté výrazně zvyšuje. (Ruiz-Capillas a Herrero, 2019)

Byly detekovány různé druhy BA během výroby piva. Ve finálním výrobku byly detekovány především polyaminy (spermin a putrescin), podrobněji budou jednotlivé BA rozebírány v další části.

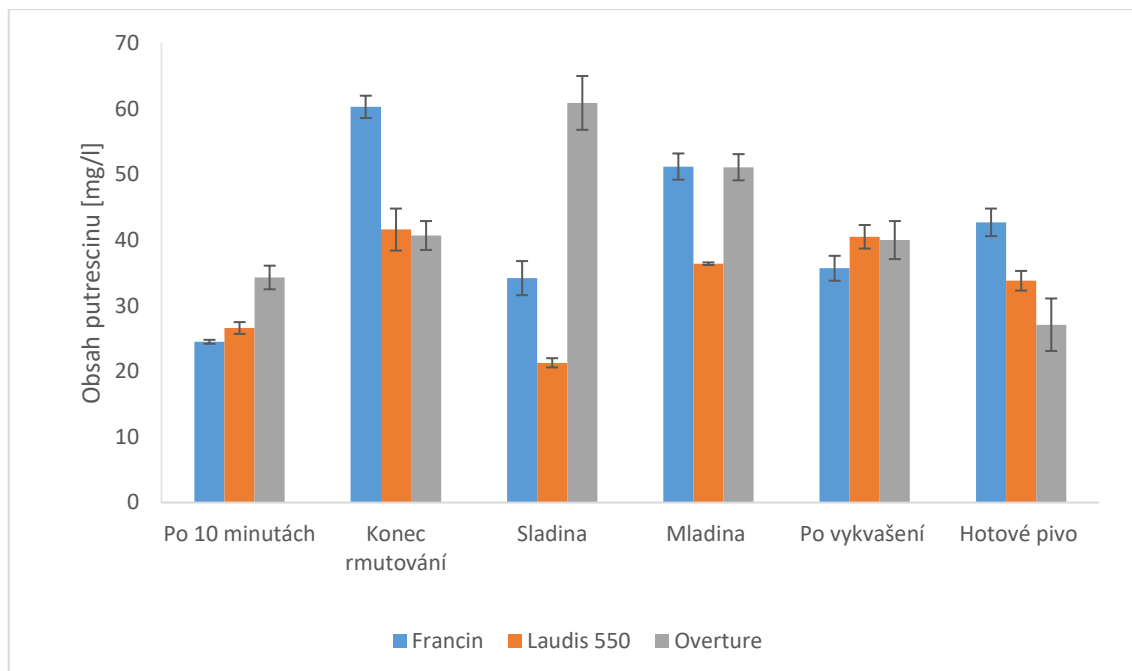


Obrázek 6: Obsah BA v meziproduktech a pivo

V některých fázích výroby byly detekovány i další BA, které se často v dalších krocích již neobjevovaly. Fenylethylamin byl detekován u odrůdy Francin ve vykvašeném pivo ( $35,7 \pm 1,9$  mg/l), ve vyrobeném pivo už nebyl detekován. Spermidin byl detekován u odrůd Francin a Laudis na konci rmutování a u odrůdy Overture na začátku a ve sladince. Detekován byl také histamin, a to v různých fázích výroby. Na konci rmutování ( $10,0 \pm 0,3$  mg/l) a ve sladince ( $11,4 \pm 0,1$  mg/l) u odrůdy Francin, Po vystírce a v mladince byl detekován u odrůdy Laudis ( $12,0 \pm 0,7$  mg/l;  $10,4 \pm 0,2$  mg/l). U odrůdy Overture byl detekován ve vystírce ( $19,5 \pm 0,5$  mg/l) a ve sladince ( $25,1 \pm 1$  mg/l). Každopádně výskyt histaminu byl vždy pouze v meziproduktech výroby, které se běžně nekonzumují. Ve finálním výrobku nebyl zjištěn obsah histaminu. Vyšší obsahy histaminu během výroby piva jsou spojeny s mikrobiální kontaminací (Halász et al., 1999; Galarce et al., 2016). Obsah histaminu byl navrhnout jako jeden z indikátorů dobré hygieny výroby piva (Kalač a Křížek, 2003). V žádné fázi výroby nebyl detekován tryptamin.

Ve všech fázích výroby byl nejčastěji detekován putrescin (obrázek 7), to je shodě s Galarce et al., (2016). Během rmutování se jeho obsah zvýšil, po odstranění mláta se obsah snížil u odrůdy Francin a Laudis, naopak se výrazně zvýšil u Overture. Kalač et al. (1997) stanovili obsah putrescinu v mlátu a to  $10,7$  mg/l;  $10,9$  mg/l a  $29,2$  mg/l. Po chmelovaru se u odrůdy Francin a Laudis obsah zvýšil, u odrůdy Overture snížil. Po vykvašení byl obsah u všech třech odrůd podobný. V práci Halász et al. (1999) byly zkoumány tři různé odrůdy a z nich vyrobené mladiny. Obsah putrescinu byl  $14,4$  mg/l,  $20,5$  mg/l a  $30,7$  mg/l

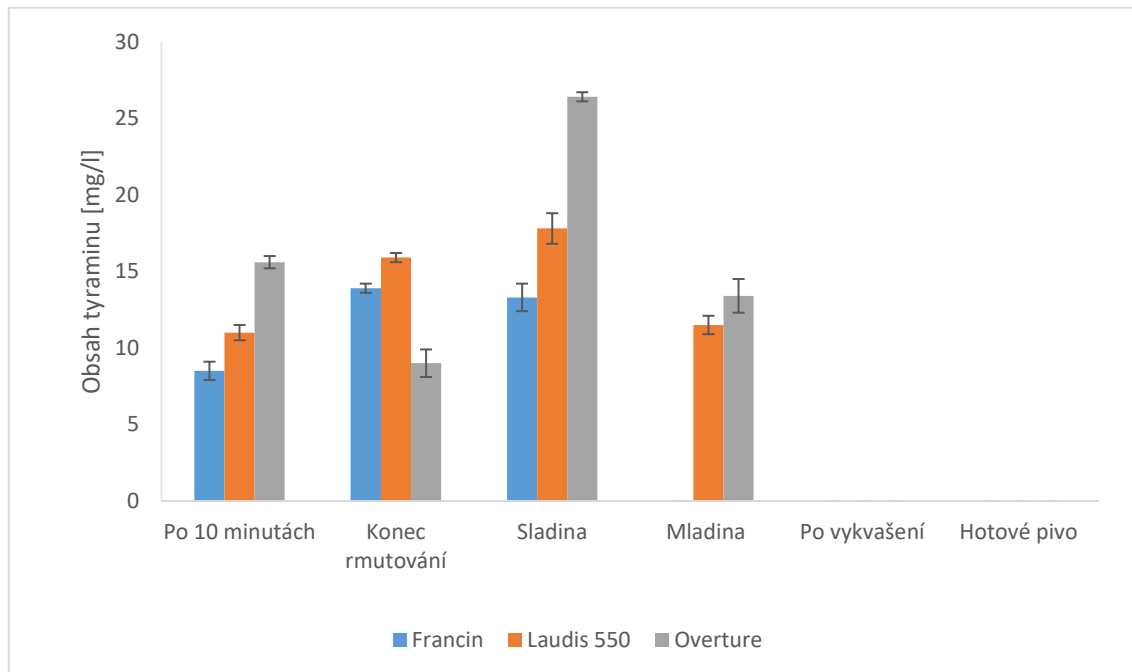
v laboratorně vyrobených mladínách. Autoři taktéž zjistili, že fermentací mladin došlo ke snížení obsahu putrescinu což je částečně ve shodě s výsledky u odrůdy Francin a Overture. U stejných autorů byl v láhvvém pivu, ze tří různých pivovarů, stanoven různý obsah putrescinu (2,9-23,02 mg/l). Autoři se shodují, že vliv na obsah má především technologie výroby. (Halász et al., 1999) Během zrání došlo ke zvýšení obsahu u odrůdy Francin a snížení u Laudis a Overture. Pivo z odrůdy Francin mohlo obsahovat vyšší množství kvasinek po primární fermentaci. Putrescin je polyamin, který se vyskytuje v metabolismu kvasinek i jiných mikroorganismů. Právě to mohl být důvod jejich změn během rmutování a hlavně kvašení. (Igarashi a Kashiwagi, 2010) Bylo zjištěno, že se obsah putrescinu během ležení výrazně nemění. (Galarce et al., 2016)



Obrázek 7: Obsah putrescinu meziproduktech a pivu

Tyramin byl ve výrobě piva detekován pouze do začátku fáze kvašení (mladina), jak je patrné z obrázku 8. Po vystírce byl tyramin přítomný v rmutech všech odrůd. Galarce et al., (2016) zjistili různý obsah během rmutování (1,76 mg/l; 1,84 mg/l 32,04 mg/l). Na konci rmutování vzrostl obsah u odrůdy Francin a Laudis, klesl u Overture. Po scezení se obsah významně nezměnil u odrůdy Francin a Laudis. Patrné bylo zvýšení obsahu u odrůdy Overture (toto zvýšení může i za zvýšení celkového obsahu BA v tomto kroku). Po chmelovaru nebyl detekován u odrůdy Francin, u zbylých dvou odrůd detekován byl. Ve vyrobeném pivu tyramin detekován nebyl. Toto zjištění není v souladu se studii, kde obsah tyraminu během fermentace rostl (Izquierdo-Pulido et al., 1994). Stejní autoři uvádějí, že na obsah tyraminu během fermentace působí různé faktory s různou intenzitou.

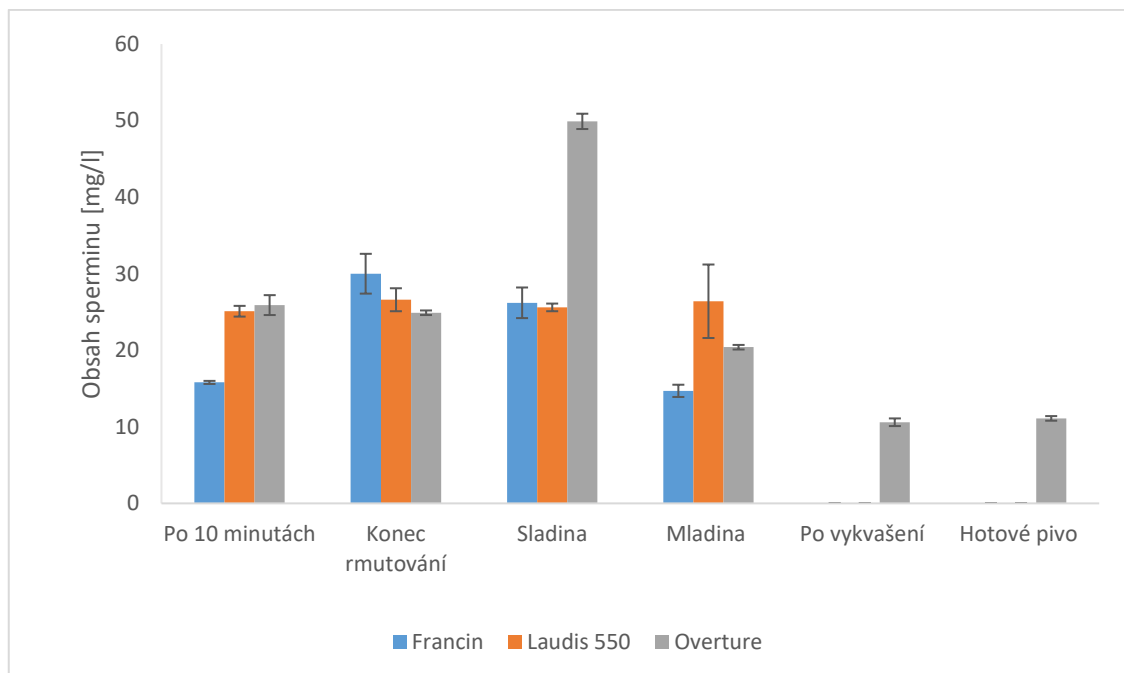
Bylo zjištěno, že obsah tyraminu se významně nezměnil od mladiny po hotové pivo (Galarce et al., 2016). Výrazný nárůst tyraminu během kvašení je způsoben mikrobiální kontaminací, především bakteriemi skupiny *Lactobacillus* (Romero et al., 2003).



Obrázek 8: Obsah tyraminu meziproductech a pivo

Obsah sperminu během výroby je vyobrazen na obrázku 9. Spermin byl detekován po celou dobu rmutování. U autorů Galarce et al., (2016) a Halász et al., (1999) byly zjištěny pouze stopové množství během provozní výroby. Mezi vystírkou a koncem se zvýšil obsah u odrůdy Francin. Po scezení se výrazně zvýšil obsah u odrůdy Overture. V mladině se snížil obsah u odrůd Francin a Overture. V laboratorně vyrobených mladinách byl Halász et al., (1999) zjištěn obsah sperminu 9,3-21,4 mg/l. Za zmínku stojí, že ve vykvašeném pivo byl spermin detekován v malém množství pouze u odrůdy Overture. Na obsahu sperminu bude mít pravděpodobně vliv jeho možnost přeměny na spermidin, případně putrescin (Teti et al., 2002).





Obrázek 9: Obsah sperminu meziproduktech a pivu

Rozdíly mezi předchozími studii a touto prací mohly být způsobené různými faktory. Autoři Halász et al., (1999) konstatovali, že na obsahu BA ve sladu i pivu má významný vliv použitá technologie výroby. Méně významným vlivem může být odrůda ječmene. V tuzemsku jsou odrůdy ječmene pravidelně sledovány během probíhajících kampaní. Tak jako bývají odlišné různé technologické parametry v každém roce, je možné, že existuje vliv na vývoj BA během výroby sladu (resp. piva). Tento vliv může zahrnovat i klimatické podmínky v daném roce, lokalita, agronomické podmínky. Pro lepší pochopení by bylo třeba provést více analýz ječmene v závislosti na výše zmíněných podmínkách.

## 6.7 Mikrobiologický rozbor

### 6.7.1 Ječmen a slad

Výsledky mikrobiologického rozboru ječmene jsou uvedeny v tabulce 11. Celkový obsah mikroorganismů byl nejnižší u odrůdy Francin, vyšší pak u odrůdy Laudis a Overture. V minulosti byly stanovené podobné hodnoty, lze předpokládat, že se jedná o běžnou polní a skladištní mikrobiotu ječmene (Kosař, 1979). Počet mléčných bakterií na obilkách ječmene byl nejnižší u odrůdy Laudis. Nejvyšší obsah koliformních bakterií, plísní a kvasinek byl zjištěn u odrůdy Overture. Tento výskyt ovšem nejspíš neměl vliv na obsah BA během výroby sladu z této odrůdy, protože obsah BA byl u této odrůdy nejnižší.

Tabulka 11: Výsledky mikrobiologického rozboru ječmene (CFU/g)

	PCA	MRS	VRBL	DG18
<b>Francin</b>	$2,1 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^2$
<b>Laudis 550</b>	$1,1 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^2$	$9,1 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^2$
<b>Overture</b>	$3,5 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^3$

\*CFU (Colony forming units) – Kolonie tvořící jednotku

Podobné výsledky byly zjištěny v rozsáhlé studii O'Sullivan et al., (1999), kde byly srovnávané průmyslové (konvenční) sladovny s tradiční technologií humen. Celkový obsah aerobních bakterií byl  $6,5 \cdot 10^5$  a  $2,8 \cdot 10^6$  CFU/g, mléčných bakterií 40 a 80 CFU/g a koliformní bakterie  $1,3 \cdot 10^5$  a  $2,0 \cdot 10^5$  CFU/g. Obsah plísní a kvasinek byl široký  $1,5 \cdot 10^2$  a  $2,3 \cdot 10^4$  CFU/g. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky zjištěné touto prací až na nižší obsah mléčných bakterií u autorů O'Sullivan et al., (1999).

Během výroby sladu dochází k podmínkám vhodných pro růst mikroorganismů (vyšší obsah vody, vysoká relativní vlhkost, přítomnost živin) (Bokulich a Bamforth, 2013). Výsledky mikrobiologické analýzy sladu jsou uvedeny v tabulce 12. Celkový obsah mikroorganismů byl ve vyrobeném sladu podobný jako u surového ječmene. K mírnému zvýšení obsahu mléčných bakterií došlo u odrůdy Francin a Laudis. Během výroby došlo k pomnožení koliformních bakterií. Podobný obsah byl stanoven u kvasinek a plísní.

Bylo zjištěno, že během sladování roste obsah mikroorganismů již od máčení a po celou dobu výroby. Vysoký obsah mikroorganismů během sladování může ovlivnit klíčení, především spotřebováváním kyslíku, který nemůže být využíván zrnem. Výskyt bakterií skupiny *Lactobacillus* může mít v určitých fázích i pozitivní význam, protože inhibuje růst některých plísní. Jejich přítomnost může snižovat délku kořínku a tím velikost sladovnické ztráty. Velmi náchylný na kontaminaci, při vyšší relativní vlhkosti, je slad při uskladnění. (Bokulich a Bamforth, 2013)

Tabulka 12: Výsledky mikrobiologického rozboru sladu (CFU/g)

	PCA	MRS	VRBL	DG18
<b>Francin</b>	$1,5 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^2$
<b>Laudis 550</b>	$1,3 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^3$
<b>Overture</b>	$1,5 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^3$

Ve studiích O'Sullivan et al., (1999) bylo zjištěno, že ve vyrobeném sladu byl zaznamenán nárůst mléčných bakterií, koliformních bakterií, plísní a kvasinek. Celkový obsah mikroorganismů byl  $1,7 \cdot 10^7$  a  $5 \cdot 10^5$  CFU/g. Obsah mléčných bakterií  $2,5 \cdot 10^5$  a  $8 \cdot 10^4$  CFU/g, obsah koliformních bakterií vzrostl na  $2 \cdot 10^4$  a  $1,32 \cdot 10^6$  CFU/g. Kvasinky a plísně v množství  $3 \cdot 10^4$  a  $6,1 \cdot 10^4$  CFU/g. Tyto hodnoty jsou většinou podobné jako ty zjištěné u třech zkoumaných odrůd v této práci.

Co se týče vlivu mikroorganismů na celkový obsah BA v ječmeni a sladu. Bylo zjištěno, že na obsahu BA se mohou podílet zástupci skupiny *Lactobacillus* a čeleď *Enterobacteriaceae* (Doeun et al., 2017). Koliformní bakterie se řadí do druhé zmíněné čeledi. Vyšší obsah BA, se vzrůstajícím trendem během klíčení byl zaznamenán u odrůdy Francin a Laudis. Nelze říci zda na vývoj obsahu BA měl vliv přítomnost mikroorganismů, protože u odrůdy Overture byl zjištěn vyšší obsah mikroorganismů, ale obsah BA byl nejnižší. Lze předpokládat, že za obsah BA v těchto případech může přirozený metabolismus zrna.

### 6.7.2 Pivo

Výsledky mikrobiologického rozboru metodou roztěrem jsou uvedeny v tabulce 13. U všech třech šarží piva byl detekován vysoký obsah celkového počtu na půdě PCA. U piva Francin byl nárůst nepočítatelný a výsledkem je pouze odhad. Za tento počet může nejspíše obsah kvasinek, protože pivo bylo nefiltrované a nepasterované. Nejvyšší obsah bakterií na půdě MRS byl stanoven u piva z odrůdy Overture. Dle výsledku nebyly na půdě DRBC stanoveny, žádné kvasinky ani plísně. Vzhledem k tomu, že pivo bylo nefiltrované lze předpokládat, že na tomto typu půdy pivní kvasinky nerostou. Nejvyšší nárůsty byly zaznamenány na půdě AA, kde ovšem nelze s jistotou konstatovat, zda se jedná o kontaminaci bakterií rodu *Acetobacter*. Možné vysvětlení je, že na této půdě rostou také kvasinky, které mohou za vyšší nárůsty na půdě PCA. Je také možné, že se skutečně jednalo o zástupce rodu *Acetobacter*, který v pivu může přežívat (Basařová et al., 2021).

Tabulka 13: Výsledky mikrobiologického rozboru piva metodou roztěrem (CFU/ml)

	PCA	MRS	DRBC	AA
<b>Francin</b>	$>1 \cdot 10^9$	$5,9 \cdot 10^4$	0	$>1 \cdot 10^8$
<b>Laudis 550</b>	$1,2 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^4$	0	$>1 \cdot 10^8$
<b>Overture</b>	$1,2 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^5$	0	$>1 \cdot 10^8$

Výsledky mikrobiologického rozboru metodou membránové filtrace jsou uvedeny v tabulce 14. Ve vzorcích nebyly detekovány kontaminující bakterie na žádné z pevných půd. V tomto případě nebyly stanovované kulturní kvasinky, protože se předpokládá, jejich přítomnost v nefiltrovaném pivu. Nebyly zjištěny koliformní bakterie, bakterie skupiny *Lactobacillus*, striktně anaerobní bakterie a divoké kvasinky non-*Saccharomyces*. V tekuté půdě NBB-C byl mikroskopickou kontrolou zjištěn ojedinělý výskyt koku u piv z odrůd Franci na Laudis. U piva z odrůdy Overture ojediněle tvary podobné kokům a diplokokům, ovšem ve všech třech případech mohlo jít i o lehce zaměnitelné kaly.

Tabulka 14: Výsledky mikrobiologického rozboru piva (CFU/20 ml)

	PCA	MC	R-R	F	CuSO <sub>4</sub>	LYS
<b>Francin</b>	0	0	0	0	1	0
<b>Laudis 550</b>	0	0	0	0	5	0
<b>Overture</b>	0	0	0	0	0	0

Na agaru s CuSO<sub>4</sub> byly zjištěny divoké kvasinky u vzorku Francin. Morfologicky byly podlouhlejší, odlišné od divokých kvasinek u odrůdy Laudis. Zde se jednalo o malé kulaté buňky. Tato půda se používá pro stanovení divokých kvasinek rodu *Saccharomyces*. Jedná se tedy o kontaminaci nejspíše během stáčení z kvasné nádoby. Některé druhy divokých kvasinek mají potenciál kazit pivo, ovšem je třeba brát v potaz podmínky (teplota skladování, živiny, nasycení CO<sub>2</sub>, pH nebo obsah ethanolu), za kterých divoké kvasinky v pivu pouze přežívají (Bokulich a Bamforth, 2013).

Značně rozdílné výsledky byly zjištěny u stanovení bakterií skupiny *Lactobacillus*. Na půdě MRS byl, oproti nulovému počtu na buď R-R, zaznamenán vysoký počet kolonií. Toto lze vysvětlit tak, že na těchto půdách běžně rostou kvasinky a gram negativní bakterie. Pro jejich inhibici je nutné dodat vhodný inhibitor (cykloheximid, fenylethanol). (Kubizniková a Matoulková, 2016) V tomto rozboru byla použita půda MRS bez další úpravy. Do půdy R-R byl dodán fenylethanol a cyklohexamid. To může být důvod rozdílných výsledků.

Celkově lze považovat výsledky mikrobiologického rozboru za neprůkazné, protože byly nalezeny značné rozdíly mezi oběma metodami. Během výroby mohlo dojít ke kontaminaci kvasných nádob nebo láhví.

## ZÁVĚR

V této diplomové práci byl pozorován obsah a vývoj osmi biogenních aminů (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin, spermin) během výroby ječného sladu ze tři odrůd ječmene (Francin, Laudis 550, Overture) v provozních podmínkách. V daných fázích byly odebírány vzorky pro analýzu biogenních aminů. Byl také sledován vývoj vybraných provozních parametrů během výroby sladu. Pro ověření schopnosti biogenních aminů přecházet do piva bylo z odebraného sladu vyrobeno v laboratorních podmínkách pivo. Během toho byly odebírány vzorky meziproductu pro analýzu biogenních aminů. Dále byly stanoveny provozní parametry vyrobeného piva. Jakost výroby sladu i piva byla ověřena mikrobiologickým rozborem.

Na základě výsledků této práce lze říci:

- Během výroby sladu obsah biogenních aminů rostl, především ve fázi máčení a klíčení.
- V zrně převládaly biogenní aminy typicky se vyskytující v metabolismu rostlin.
- Profilové složení biogenních aminů se lišilo v závislosti na odrůdě ječmene.
- Byl zjištěn rozdílný obsah a profil biogenních aminů v odrůdách určených pro výrobu piva s CHZO „České pivo“ a odrůdách pro běžná piva.
- V žádné fázi výroby sladu nebyl detekován histamin, což je známkou dobré výrobní praxe.
- Obsah biogenních aminů ve vyrobeném pivu byl nízký a nepředstavoval riziko pro běžného konzumenta.
- Obsah biogenních aminů v chmelu byl vyšší, ale nepředpokládá se použití chmele pro přímý konzum a pro výrobu piva se ho používá relativně malé množství.
- Obsah biogenních aminů v ječmeni a sladu nebyl ovlivněn přítomnou mikrobiotou. Celkové obsahy mikroorganismů se nelišily od dřívějších pozorování.
- Z výsledku mikrobiologického rozboru nelze s jistotou říci zda za nárůst biogenních aminů v pivu můžou kontaminující mikroorganismy.
- Lze konstatovat, že v pivu nebyly přítomné koliformní bakterie a striktně anaerobní mikroorganismy.

V minulosti byl obsah biogenních aminů u piva poměrně důkladně sledován. Obsah při výrobě sladu, a jeho možný vliv na celkové množství v pivu, podrobněji sledován nebyl. V budoucích výzkumech je možné se zaměřit na obsah biogenních aminů v zrně ve vztahu k místu pěstování, počasí během sezony (během růstu i žní), odrůdě nebo technologii sladování. Velmi zajímavé by bylo porovnat vliv ročníku, případně několika ročníků za stejných podmínek (lokalita, technologie, výroba, atd.). Větší pozornost by mohla být věnována obsahu biogenních aminů v klíčku (sladovém květu) a jeho možný negativní vliv na hospodářská zvířata.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. a MCCLURE, P. J., 2016. Food microbiology. 4th edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 978-1-84973-960-3.

AFLAKI, F.; GHOULIPOUR, V.; SAEMIAN, N. a SHEIBANI, S., 2014. Biogenic Amine Contents in Non-alcoholic Beers: Screening and Optimization of Derivatization. Online. Food Analytical Methods. Roč. 7, č. 3, s. 713-720. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9746-x>. [cit. 2024-04-16].

ARENDRT, E. K. a ZANNINI, E., 2013. Barley. Online. Cereal Grains for the Food and Beverage Industries. S. 155-201e. ISBN 9780857094131. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857098924.155>. [cit. 2023-10-05].

BASAŘOVÁ, G.; PSOTA, V.; ŠAVEL, J.; BASAŘ, P.; HARTMAN, I. et al., 2023. Sladařství: teorie a praxe výroby sladu. Druhé, doplněné a upravené vydání. Praha: HBT. ISBN 978-808-7109-731.

BASAŘOVÁ, G.; ŠAVEL, J.; BASAŘ, P.; BASAŘOVÁ, P. a BROŽ, A., 2021. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Vydání druhé, přepracované, doplněné a aktualizované. Praha: Havlíček Brain Team. ISBN 978-80-87-109-71-7.

BAUER, F., 2014. RESIDUES IN MEAT AND MEAT PRODUCTS | Residues Associated with Meat Production. Online. Encyclopedia of Meat Sciences. S. 221-225. ISBN 9780123847348. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00239-7>. [cit. 2023-10-22].

BENEŠOVÁ, K.; BĚLÁKOVÁ, S.; MIKULÍKOVÁ, R. a SVOBODA, Z., 2017. Activity of Proteolytic Enzymes During Malting and Brewing. Online. Kvasny Prumysl. 2017-2-15, roč. 63, č. 1, s. 2-7. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp201701>. [cit. 2023-10-19].

BOKULICH, N. A. a BAMFORTH, Ch. W., 2013. The Microbiology of Malting and Brewing. Online. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Roč. 77, č. 2, s. 157-172. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>. [cit. 2023-10-23].

BRIGGS, D. E.; BOULTON, Ch. A.; BROOKES, P. A. a STEVENS, R., 2004. Brewing Science and Practice. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85-573906-2.

BUCKENHUESKES, H. J., 2015. Quality improvement and fermentation control in vegetables. Online. *Advances in Fermented Foods and Beverages*. S. 515-539. ISBN 9781782420156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00022-0>. [cit. 2023-10-22].

BUŇKA, F.; BUDINSKÝ, P. ČECHOVÁ, M. ; DRIENOVSKÝ, V.; PACHLOVÁ, V. et al., 2012. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. Online. *Journal of the Institute of Brewing*. Roč. 118, č. 2, s. 213-216. ISSN 00469750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jib.31>. [cit. 2024-03-31].

ČELIK, E. E.; CANLI, M.; KOCADAĞLI, T.; ÖZKAYNAK KANMAZ, E. a GÖKMEN, V., 2023. Formation of Histamine, phenylethylamine and  $\gamma$ -Aminobutyric acid during sprouting and fermenting of selected wholegrains. Online. *Food Research International*. Roč. 173. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113447>. [cit. 2024-04-17].

CERKAL, R.; HŘIVNA, L.; RYANT, P.; PROKEŠ, J.; BŘEZINOVÁ BELCREDI, N. et al., 2010. Zinc - effect on the spring barley's plant and roots growth, grain technological quality, and yeast fermentation. Online. *Kvasny Prumysl*. 2010-3-1, roč. 56, č. 3, s. 152-159. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2010021>. [cit. 2024-04-14].

ČERNÝ, L., 2007. Jarní sladovnický ječmen: pěstitelský rádce. Praha: Pro katedru rostlinné výroby, FAPPZ, ČZU v Praze vydalo vydavatelství Kurent. ISBN 978-80-87111-04-8.

ČESKÁ REPUBLIKA, 2018. Vyhláška č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: . 125/2018. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248/zneni-20181201>.

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD, 2023. Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizní zemědělských plodin. Online. Dostupné z: [https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02G&z=T&f=TABULKA&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&evo=v1442\\_!\\_ZEM02G-sklizen\\_1](https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02G&z=T&f=TABULKA&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&evo=v1442_!_ZEM02G-sklizen_1). [cit. 2024-04-20].

DE NICOLA, R. a WALKER, G. M., 2009. Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. Online. *Enzyme and Microbial Technology*. Roč. 44, č. 4, s. 210-216. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.11.008>. [cit. 2024-04-14].



DOEUN, D.; DAVAATSEREN, M. a CHUNG, M., 2017. Biogenic amines in foods. Online. Food Science and Biotechnology. Roč. 26, č. 6, s. 1463-1474. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>. [cit. 2024-03-27].

DRÁB, Š.; PSOTA, V.; FRANČÁKOVÁ, H.; SACHAMBULA, L.; HARTMANN, J. et al., 2013. The dependence of malt quality on the variety and year. Online. Kvasny Prumysl. 2013-7-1, roč. 59, č. 7-8, s. 181-189. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2013018>. [cit. 2024-04-20].

DRIEHUIS, F.; WILKINSON, J.M.; JIANG, Y.; OGUNADE, I. a ADESOGAN, A.T., 2018. Silage review: Animal and human health risks from silage. Online. Journal of Dairy Science. Roč. 101, č. 5, s. 4093-4110. ISSN 00220302. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>. [cit. 2024-03-24].

DURAK-DADOS, A.; MICHALSKI, M. a OSEK, J., 2020. Histamine and other biogenic amines in food. Online. Journal of Veterinary Research. 2020-04-30, roč. 64, č. 2, s. 281-288. ISSN 2450-8608. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0029>. [cit. 2024-04-07].

EBC 4.10: Free amino nitrogen of malt by spectrophotometry, 1997. EBC Analytica.

EBC 4.11.1: Fermentability, final attenuation of laboratory wort from malt: reference method, 1999. EBC Analytica.

EBC 4.19: Boiled wort colour, 2000. EBC Analytica.

EBC 4.5.1: Extract of malt: Congress mash, 2004. EBC Analytica.

EBC Method 3.13: Moisture and total nitrogen in barley by near infrared spectroscopy, 1997. EBC Analytica.

EBC Method 4.17: Moisture and total nitrogen in malt by near infrared spectroscopy, 1997. EBC Analytica.

ENGE, J.; ŠEMÍK, P.; KORBEL, J.; ŠROGL, J. a SEKORA, M., 2005. Technological aspects of infusion and decoction mashing. Online. Kvasny Prumysl. 2005-5-1, roč. 51, č. 5, s. 158-165. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2005008>. [cit. 2024-04-14].

EVROPSKÁ UNIE, 2005. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

FUSEK, M.; MICHÁLEK, J.; BUŇKOVÁ, L. a BUŇKA, F., 2020. Modelling biogenic amines in fish meat in Central Europe using censored distributions. Online. Chemosphere. Roč. 251. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126390>. [cit. 2023-10-22].

GALARCE, O.; HENRÍQUEZ-AEDO, K.; PETERSEN, D.; PEÑA-FARFAL, C. a ARANDA, M., 2016. A Selective Chromatographic Method to Determine the Dynamic of Biogenic Amines During Brewing Process. Online. Food Analytical Methods. Roč. 9, č. 12, s. 3385-3395. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0526-2>. [cit. 2024-03-12].

GARDINI, F.; ÖZOGUL, Y.; SUZZI, G.; TABANELLI, G. a ÖZOGUL, F., 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. Online. Frontiers in Microbiology. 2016-08-12, roč. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>. [cit. 2024-03-28].

GIL, R. L.; AMORIM, C. M. P. G.; AMORIM, H. G.; MONTENEGRO, M. da C. B. S. M. a ARAÚJO, A. N., 2023. Influence of Brewing Process on the Profile of Biogenic Amines in Craft Beers. Online. Sensors. Roč. 23, č. 1. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s23010343>. [cit. 2024-04-07].

GILL, S. S. a TUTEJA, N., 2014. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Online. 2014-11-04, roč. 5, č. 1, s. 26-33. ISSN 1559-2324. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291>. [cit. 2024-03-14].

HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á. a HOLZAPFEL, W. H., 1999. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. Online. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A. 1999-5-3, roč. 208, č. 5-6, s. 418-423. ISSN 1431-4649. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002170050440>. [cit. 2023-10-22].

HARTMAN, I.; SVOBODOVÁ, I.; SPÁČILOVÁ, V. a MÍŠA, P., 2017. Reakce odrůd sladovnického ječmene na pěstování v režimu nízkých vstupů („low – input“) a ekologickém režimu II. část Sladovnická kvalita. Obilnářské listy. Roč. 25, č. 3-4, s. 90-93.

HILL, A. E. (ed.), 2015. Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste. 1. Elsevier. ISBN 978-1-78242-331-7.

IGARASHI, K. a KASHIWAGI, K., 2010. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. Online. *Plant Physiology and Biochemistry*. Roč. 48, č. 7, s. 506-512. ISSN 09819428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.017>. [cit. 2024-03-26].

IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. a VIDAL-CAROU, M.C., 1994. Biogenic Amines Formation during Malting and Brewing. Online. *Journal of Food Science*. Roč. 59, č. 5, s. 1104-1107. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08201.x>. [cit. 2023-10-22].

KALACH, P. a KRÍŽEK, M., 2003. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. Online. *Journal of the Institute of Brewing*. Roč. 109, č. 2, s. 123-128. ISSN 00469750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x>. [cit. 2024-03-26].

KALACH, P.; HLAVATÁ, V. a KRÍŽEK, M., 1997. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. Online. *Food Chemistry*. Roč. 58, č. 3, s. 209-214. ISSN 03088146. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00098-2). [cit. 2024-03-13].

KARLOVIĆ, A.; JURIC, A.; ĆORIC, N.; HABSCHIED, K.; KRSTANOVIĆ, V. et al., 2020. By-Products in the Malting and Brewing Industries—Re-Usage Possibilities. Online. *Fermentation*. Roč. 6, č. 3. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation6030082>. [cit. 2024-03-24].

KINČL, T., 2022. *Praxe výroby piva nejen v malých pivovarech*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-122-2.

KOČÁR, P.; BENEŠ, J.; PREUSZ, M. a VANĚČEK, Z., 2015. Barley and Malt in the Middle Age and Early Modern Period in Czech Lands. Online. *Kvasny Prumysl*. 2015-5-1, roč. 61, č. 5, s. 153-158. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2015018>. [cit. 2024-03-31].

KOSAŘ, K., 1979. Microorganism important for malting industry I. Online. *Kvasny Prumysl*. 1979-5-1, roč. 25, č. 5, s. 99-101. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp1979014>. [cit. 2024-05-03].

- KUBIZNIAKOVÁ, P. a MATOULKOVÁ, D., 2016. Brewing microbiology - Lactic acid bacteria and cultivation methods of detection - part II. Online. *Kvasny Prumysl.* 2016-12-5, roč. 62, č. 11-12, s. 335-345. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2016033>. [cit. 2024-05-04].
- LIU, S.-Q., 2015. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. Online. *Brewing Microbiology*. S. 357-374. ISBN 9781782423317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00017-4>. [cit. 2024-04-14].
- LORENCOVÁ, E.; BUŇKOVÁ, L.; MATOULKOVÁ, D.; DRÁB, V.; PLEVA, P. et al., 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. Online. *Roč. 47, č. 10, s. 2086-2091.* ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>. [cit. 2024-03-30].
- LORENCOVÁ, E.; SALEK, R. N.; ČERNÍKOVÁ, M.; BUŇKOVÁ, L.; HÝLKOVÁ, A. et al., 2020. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. Online. *Food Control*. Roč. 117. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107335>. [cit. 2024-03-26].
- LORENZO, J. M.; CACHALDORA, A.; FONSECA, S.; GÓMEZ, M.; FRANCO, I. et al., 2010. Production of biogenic amines “in vitro” in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages. Online. *Meat Science*. Roč. 86, č. 3, s. 684-691. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.005>. [cit. 2024-03-30].
- MATOULKOVÁ, D.; KOPECKÁ, J. a KUBIZNIAKOVÁ, P., 2013. Brewing microbiology - wild yeasts and methods of their detection. Online. *Kvasny Prumysl.* 2013-9-1, roč. 59, č. 9, s. 246-257. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2013025>. [cit. 2024-03-29].
- MATOULKOVÁ, D.; VONTROBOVÁ, E.; BROŽOVÁ, M. a KUBIZNIAKOVÁ, P., 2018. Microbiology of brewery production - bacteria of the order Enterobacterales. Online. *Kvasny Prumysl.* 2018-8-15, roč. 64, č. 4, s. 161-166. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp201824>. [cit. 2024-03-29].
- MATUKAS, M.; STARKUTE, V.; ZOKAITYTE, E.; ZOKAITYTE, G.; KLUPSAITE, D. et al., 2022. Effect of Different Yeast Strains on Biogenic Amines, Volatile Compounds and Sensory Profile of Beer. Online. *Foods*. Roč. 11, č. 15. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11152317>. [cit. 2024-03-30].

MIKYŠKA, A. a PROKEŠ, J., 2009. Barley storage system and its impact on malt and beer quality. Online. Kvasny Prumysl. 2009-3-1, roč. 55, č. 3, s. 73-81. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2009008>. [cit. 2024-04-15].

MÍŠKOVÁ, Z.; LORENCOVÁ, E.; SALEK, R. N; KOLÁČKOVÁ, T.; TRÁVNÍKOVÁ, L. et al., 2023. Occurrence of Biogenic Amines in Wines from the Central European Region (Zone B) and Evaluation of Their Safety. Online. Foods. Roč. 12, č. 9. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12091835>. [cit. 2024-04-06].

MOŠTEK, J., 1975. Sladařství: Biochemie a technologie sladu. Řada potravinářské literatury. Praha: SNTL.

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P. a MEERDINK, G., 2010. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. Online. Journal of Food Science. Roč. 75, č. 7. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>. [cit. 2024-03-27].

NALAZEK-RUDNICKA, K.; WOJNOWSKI, W. a WASIK, A., 2021. Occurrence and Levels of Biogenic Amines in Beers Produced by Different Methods. Online. Foods. Roč. 10, č. 12. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10122902>. [cit. 2024-03-30].

NOVOTNÝ, P., 2019. Pivařka<sup>2</sup>: průvodce domácího sládky : teorie, rady, návody, recepty. Populárně naučná. V Brně: Jota. ISBN 978-80-7565-555-4.

OLŠOVSKÁ, J.; MIKYŠKA, A.; ČEJKA, P.; SLABÝ, M. a PSOTA, V., 2018. Study on technological properties of the historical barley variety Proskovcuv hanacky. Online. Kvasny Prumysl. 2018-8-15, roč. 64, č. 4, s. 167-172. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp201822>. [cit. 2024-04-20].

O'SULLIVAN, T.F.; WALSH, Y.; O'MAHONY, A.; FITZGERALD, G.F. a SINDEREN, D., 1999. A Comparative Study of Malthouse and Brewhouse Microflora. Online. Journal of the Institute of Brewing. Roč. 105, č. 1, s. 55-61. ISSN 00469750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00006.x>. [cit. 2024-05-04].

PANTHI, R. R.; JORDAN, K. N.; KELLY, A. L. a SHEEHAN, J.J. (Diarmuid), 2017. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. Online. Cheese. S. 23-50. ISBN 9780124170124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00002-8>. [cit. 2023-10-22].

POVEDA, J.M., 2019. Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. Online. Food Control. Roč. 96, s. 227-233. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.012>. [cit. 2024-04-08].

PRADENAS, J.; GALARCE-BUSTOS, O.; HENRÍQUEZ-AEDO, K.; MUNDAC-URIBE, R. a ARANDA, M., 2016. Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. Online. Food Control. Roč. 70, s. 138-144. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.043>. [cit. 2024-04-08].

PROKEŠ, J., 2000. Technological importance of nitrogenic compounds in barley and malt. Online. Kvasny Prumysl. 2000-10-1, roč. 46, č. 10, s. 277-279. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2000023>. [cit. 2024-03-06].

PRUGAR, J., 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV. ISBN 978-808-6576-282.

PSOTA, V. (ed.), 2022. Ječmenářská ročenka 2022. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. ISBN 978-80-86576-97-8.

PSOTA, V. (ed.), 2023. Ječmenářská ročenka. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. ISBN 978-80-88613-38-1.

PSOTA, V., 2019. Free amino nitrogen in sweet wort made from barley varieties tested in the Czech Republic. Online. KVASNY PRUMYSL. 2019-08-15, roč. 65, č. 4. ISSN 2570-8619. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2019.65.142>. [cit. 2024-04-15].

PSOTA, V.; DVOŘÁČKOVÁ, O. a SACHAMBULA, L., 2013. Barley varieties registered in the Czech Republic in 2013. Online. Kvasny Prumysl. 2013-5-1, roč. 59, č. 5, s. 118-126. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2013012>. [cit. 2024-03-10].

PSOTA, V.; DVOŘÁČKOVÁ, O.; SACHAMBULA, L. a NEČAS, M., 2014. Barley varieties registered in the Czech Republic in 2014. Online. Kvasny Prumysl. 2014-5-1, roč. 60, č. 5, s. 114-122. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2014011>. [cit. 2024-03-10].

PSOTA, V.; SACHAMBULA, L. a PAULŮ, A., 2015. Sensitivity of the selected malting barley varieties to the degree of steeping. Online. Kvasny Prumysl. 2015-10-1, roč. 61, č. 10-11, s. 288-295. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2015026>. [cit. 2024-04-20].

ROMERO, R.; BAGUR, M. G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M. a GÁZQUEZ, D., 2003. The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. Online. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Roč. 376, č. 2, s. 162-167. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1885-2>. [cit. 2024-05-07].

ROSENTRATER, K. A., 2022. Microflora and storage molds. Online. Storage of Cereal Grains and Their Products. S. 503-534. ISBN 9780128127582. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812758-2.09001-2>. [cit. 2024-03-02].

RUIZ-CAPILLAS, C. a HERRERO, A., 2019. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. Online. Foods. Roč. 8, č. 2. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods8020062>. [cit. 2024-04-24].

SALEK, R. N.; LORENCOVÁ, E.; GÁL, R.; KŮROVÁ, V.; OPUSTILOVÁ, K. et al., 2022. Physicochemical and Sensory Properties of Czech Lager Beers with Increasing Original Wort Extract Values during Cold Storage. Online. Foods. Roč. 11, č. 21. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11213389>. [cit. 2024-04-24].

SÁNCHEZ-PÉREZ, S.; COMAS-BASTÉ, O.; RABELL-GONZÁLEZ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M.; LATORRE-MORATALLA, M. et al., 2018. Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are They Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? Online. Foods. Roč. 7, č. 12. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods7120205>. [cit. 2024-03-13].

SILVA, S.; OLIVEIRA, A. I.; CRUZ, A.; OLIVEIRA, R. F.; ALMEIDA, R. et al., 2022. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Portuguese Craft Beers and Raw Materials. Online. Molecules. Roč. 27, č. 22. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>. [cit. 2024-04-24].

Situační a výhledová zpráva obiloviny 2022, 2023. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR. ISBN 978-80-7434-742-9.

STEWART, G.G., 2015. Yeast quality assessment, management and culture maintenance 1. Online. Brewing Microbiology. S. 11-29. ISBN 9781782423317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00002-2>. [cit. 2024-04-20].

Strategie bezpečnosti potravin a výživy 2030, 2021. I. vydání. Praha: Ministerstvo zemědělství. ISBN 978-80-7434-621-7.

TETI, D.; VISALLI, M. a MCNAIR, H., 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. Online. *Journal of Chromatography B*. Roč. 781, č. 1-2, s. 107-149. ISSN 15700232. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00669-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00669-4). [cit. 2024-03-20].

ÚŘAD PRO TECHNICKOU NORMALIZACI, METROLOGII A STÁTNÍ ZKUŠEBNICTVÍ, 2009. ČSN 56 6635, České pivo.

ÚŘAD PRO TECHNICKOU NORMALIZACI, METROLOGII A STÁTNÍ ZKUŠEBNICTVÍ, 2010. ČSN 56 6610, Slad.

VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ, J., 2009. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-15-2.

VINCI, G. a MADDALONI, L., 2020. Biogenic Amines in Alcohol-Free Beverages. Online. *Beverages*. Roč. 6, č. 1. ISSN 2306-5710. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/beverages6010017>. [cit. 2024-04-24].

VONTROBOVÁ, E.; KOPECKÁ, J.; ROTKOVÁ, G. a MATOULKOVÁ, D., 2017. Factors Influencing the Production of Sensory Active Substances in Brewer's and Wine Yeast. Online. *Kvasny Prumysl.* 2017-8-15, roč. 63, č. 4, s. 173-189. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp201720>. [cit. 2024-04-14].

WRAY, E., 2015. Reducing microbial spoilage of beer using pasteurisation. Online. *Brewing Microbiology*. S. 253-269. ISBN 9781782423317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00012-5>. [cit. 2024-04-14].

ZAVŘELOVÁ, M., 2014. The composition of barley grain in regards to food technology. Online. *Kvasny Prumysl.* 2014-5-1, roč. 60, č. 5, s. 127-130. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2014013>. [cit. 2023-10-01].



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní aminy
CHZO	Chráněné zeměpisné označení
CKT	Cylindro-konický kvasný tank
EBC	European Brewery Convention
j. EBC	jednotky EBC
PCA	Plate Count Agar
MC	MacConkey agar
R-R	půda dle Raka-Reye
F	Půda NBB-Agar s růstovým faktorem
LYS	Lyzinový agar
LOD	Limity detekce
LOQ	Limity kvalifikace
FAN	Free amino nitrogen (volný aminodusík)
MRS	Půda dle Mana, Rogosa a Sharpe
VRBL	Půda s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou
DRBC	Chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení
DG18	Dichloranový glycerolový agar
AA	Acetobacter agar
CFU	Kolonie tvořící jednotku
EPM	Extrakt původní mladiny

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Celkový obsah BA během výroby sladu .....	46
Obrázek 2: Obsah kadaverinu během výroby sladu .....	48
Obrázek 3: Obsah tyraminu během výroby sladu.....	49
Obrázek 4: Obsah putrescinu během výroby sladu .....	50
Obrázek 5: Obsah sperminu během výroby sladu .....	51
Obrázek 6: Obsah BA v meziproduktech a pivu .....	54
Obrázek 7: Obsah putrescinu meziproduktech a pivu .....	55
Obrázek 8: Obsah tyraminu meziproduktech a pivu .....	56
Obrázek 9: Obsah sperminu meziproduktech a pivu .....	57

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Aminokyseliny a jejich biogenní aminy (upraveno dle Bauer, 2014).....	22
Tabulka 2: Schéma odběru vzorku – ječmen a slad.....	35
Tabulka 3: Rmutovací schéma.....	37
Tabulka 4: Schéma odběru vzorku – pivo a meziprodukty .....	38
Tabulka 5: Provozní parametry ječmene .....	42
Tabulka 6: Stupeň domočení během klíčení (% w/w).....	43
Tabulka 7: Provozní analýza sladu .....	44
Tabulka 8: Provozní analýza mladiny a piva.....	44
Tabulka 9: Limity detekce a kvantifikace.....	45
Tabulka 10: Obsah BA v chmelu.....	52
Tabulka 11: Výsledky mikrobiologického rozboru ječmene (CFU/g) .....	58
Tabulka 12: Výsledky mikrobiologického rozboru sladu (CFU/g) .....	58
Tabulka 13: Výsledky mikrobiologického rozboru piva metodou roztěrem (CFU/ml) .....	59
Tabulka 14: Výsledky mikrobiologického rozboru piva (CFU/20 ml) .....	60

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Fotografie z odběru vzorku ječmene a sladu

Příloha II: Fotografie z provozních analýz a BA

Příloha III : Fotografie z výroby piva

## PŘÍLOHA I: FOTOGRAFIE Z ODBĚRU JEČMENE A SLADU



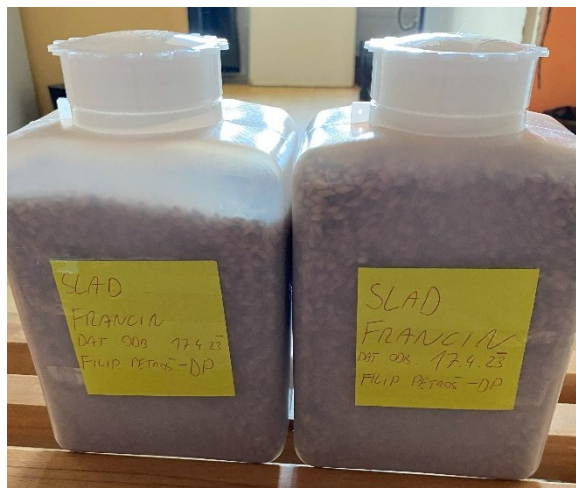
Odrůda Francin, před máčením



1. den klíčení



5. den klíčení



Uskladnění vyrobeného sladu

## PŘÍLOHA II: FOTOGRAFIE Z PROVOZNÍCH ANALÝZ A BA



Přístroj na analýzu ječmene a sladu



Stanovení dusíku a obsahu vody



### PŘÍLOHA III: FOTOGRAFIE Z VÝROBY PIVA



Vyrobené pivo  
Francin – Laudis – Overture