

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Biogenní aminy v pivu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Dagmar Čiháková

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Biogenní aminy v pivu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Matyáši Orsákovi Ph. D. za odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Vladimíru Pivcovi za ochotnou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě patří díky mým rodičům, kteří mne podporovali po celou dobu mého studia.

Biogenní aminy v pivu - Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá technologickým procesem vaření piva, popisuje suroviny potřebné pro jeho výrobu a poukazuje na prospěšné a škodlivé látky obsažené v pivu jako jsou biogenní aminy (BA). Dále je zde sepsána problematika biogenních aminů v potravinách a především v pivu, kde se jedná se o histamin, putrescin, kadaverin, tyramin a tryptamin. Uvedené BA byly v praktické části stanovené ve světlých spodně kvašených pivech z tuzemských minipivovarů a velkých průmyslových pivovarů.

Pivo je dle legislativy považováno za bezpečnou potravinu, obsahuje velkou škálu zdraví prospěšných látek, jako jsou vitaminy skupiny B, bílkoviny, sacharidy, minerály, rozpustná vláknina a polyfenolické sloučeniny, které mají antikarcinogenní, antioxidační a antimikrobiální účinky. Na druhou stranu najdeme v pivě i látky škodlivé jako alkohol, těžké kovy, N-nitrosaminy, aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, dusičnany a biogenní aminy.

V druhé části literární rešerše je shrnuta problematika BA v některých potravinách a nápojích, jejich chemická struktura, způsob jak vznikají a jejich negativní účinky na lidský organismus. BA jsou přírodní, biologicky aktivní látky, které jsou důležité pro lidský organismus. Jejich nadměrné množství v pivu je toxické pro lidský organismus. Ethanol obsažený v pivu snižuje aktivitu enzymu monoaminoxidasy a to vede ke snížené schopnosti odbourávání BA. U konzumentů může intoxikace BA zapříčinit bolesti hlavy, zvracení, hypertenzi, alergické reakce, vyrážku a i ztrátu vědomí, proto by měl být obsah těchto látek sledován.

V praktické části byly analyzovány vzorky světlých spodně kvašených piv. Do první skupiny vzorků byla zařazena piva nefiltrovaná a nepasterovaná z minipivovarů, ve druhé skupině byla piva filtrovaná a pasterovaná z velkých pivovarů. Pomocí HPLC byly v pivech stanovovány vybrané BA (histamin, putrescin, kadaverin, tyramin a tryptamin). Výsledné hodnoty poukazují, že až na výjimky, se v tuzemských pivech vyskytují biogenní aminy ve velmi malých koncentracích a splňují tak legislativní požadavky. Porovnány byly také výsledky mezi dvěma skupinami vzorků, ukázalo se, že pivo z minipivovarů není příliš kontaminováno, jak bylo původně předpokládáno. Ukazuje to na dobré technologické postupy při výrobě piva i v takto malých zařízeních.

Klíčová slova: amin, pivo, dekarboxylace, HPLC, UV detekce

Biogenic amines in beer - summary

This thesis deals with the technological process of brewing beer, describes the raw materials needed for its production, and points out the useful and harmful substances contained in beer as biogenic amines (BA). Furthermore, there are described the issues of biogenic amines in food and primarily in beer, which is a histamine, putrescine, cadaverine, tyramine and tryptamine. In the practical section BA was determined in lager bottom-fermented beers from local microbreweries and large industrial breweries.

Beer is according to legislation considered as a safe food containing a variety of healthful nutrients such as B vitamins, proteins, carbohydrates, minerals, soluble fiber and polyphenolic merged, which have anticarcinogenic, antioxidant and antimicrobial effects. On the other hand, in beer we can find harmful substances such as alcohol, heavy metals, N-nitrosamines, aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, nitrates and biogenic amines.

In the second part of the research are summarized the issues of BA in certain foods and beverages, their chemical structure, the way how they are created and their negative effects on the human body. BA are natural, biologically active substances that are essential for the human organism. Their excessive amount in beer is toxic for the human organism. Ethanol contained in the beer decreases the activity of the enzyme monoamine oxidase, and this leads to reduced degradation of BA. Intoxication of BA can cause headaches, vomiting, hypertension, allergic reactions, rashes and even loss of consciousness, therefore, should be the content of these substances monitored.

In the practical part of this theses the samples of bottom-fermented beers were analyzed. The first group of samples included unfiltered and unpasteurized beers from microbreweries. In the second group there were filtered and pasteurized beers from large breweries. HPLC determined BA in beer (histamine, putrescine, cadaverine, tyramine and tryptamine). The resulting values indicate that the domestic beers contain biogenic amines in very small concentrations, thus satisfy the legislative standards. The results were also compared between the two groups of samples. These samples showed that the beer from microbreweries is not contaminated as originally was expected. It shows good technological processes in the manufacture of beer in such small devices.

Keywords: amine, beer, decarboxylation, HPLC, UV detection

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	3
2.1	Hypotéza	3
3	Literární rešerše	4
3.1	Pivo	4
3.1.1	Pivo	4
3.1.2	Suroviny pro vaření piva	4
3.1.2.1	Voda	4
3.1.2.2	Sladovnický ječmen a slad	5
3.1.2.3	Výroba sladu	5
3.1.2.4	Chmel a chmelové produkty	6
3.1.2.5	Chemické složení chmele	7
3.1.2.6	Pivovarské kvasinky	8
3.1.3	Postup výroby piva	9
3.1.3.1	Šrotování sladu	9
3.1.3.2	Vystírání a rmutování	9
3.1.3.3	Scezování sladiny	10
3.1.3.4	Chmelovar	10
3.1.3.5	Chlazení mladiny a separace kalů	11
3.1.3.6	Hlavní kvašení mladiny	11
3.1.3.7	Dokvašování a zrání piva	11
3.1.3.8	Filtrace	11
3.1.3.9	Pasterace	12
3.1.4	Chemické složení piva	12
3.1.4.1	Anorganické látky	12
3.1.4.2	Těkavé látky	13
3.1.5	Prospěšné látky v pivu	13
3.1.6	Cizorodé látky v pivu	14
3.1.7	Nežádoucí mikroorganismy v pivu	15
3.1.7.1	Mléčné bakterie	16
3.1.8	Druhy piv	16

3.1.9	Průmyslové pivovary	17
3.1.10	Minipivovary	17
3.2	Biogenní aminy	19
3.2.1	Charakteristika biogenních aminů	19
3.2.2	Vznik biogenních aminů	19
3.2.3	Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů	20
3.2.4	Mikroorganismy produkující biogenní aminy	21
3.2.4.1	Bakterie mléčného kvašení	21
3.2.5	Vliv biogenních aminů na lidský organismus	22
3.2.5.1	Detoxikace organismu	22
3.2.6	Biogenní aminy v potravinách	22
3.2.6.1	Biogenní aminy ve víně	23
3.2.6.2	Biogenní aminy v sýrech a mléčných výrobcích	23
3.2.6.3	Biogenní aminy ve fermentovaných masných výrobcích	24
3.3	Biogenní aminy v pivu	25
3.3.1	Histamin	25
3.3.2	Putrescin	26
3.3.3	Tyramin	27
3.3.4	Tryptamin	27
3.3.5	Kadaverin	28
3.3.6	Biogenní aminy v pivech z minipivovarů	29
3.4	Metody stanovení biogenních aminů	30
3.4.1	HPLC	30
3.4.1.1	Kolony	31
3.4.1.2	Nastavení teploty	32
3.4.1.3	Detektory v kapalinové chromatografii	32
4	Praktická část	34
4.1	Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu	34
4.2	Analyzované vzorky	34
4.3	Materiál	36
4.3.1	Tlumivý roztok pro analýzu histaminu a tyraminu	36
4.3.2	Vnitřní standardy 1,6-diaminohexan a 1,7-diaminoheptan	36
4.4	Laboratorní pomůcky a přístroje	37
4.4.1	Laboratorní pomůcky	37
4.4.2	Laboratorní přístroje	37

4.5	Příprava standardů na analýzu.....	37
4.6	Stanovení putrescinu, kadaverinu a tryptaminu	40
4.7	Stanovení histaminu a tyraminu	41
5	Výsledky.....	42
5.1	Výsledky stanovení putrescinu, kadaverinu a tryptaminu.....	42
5.2	Výsledky stanovení histaminu a tyraminu	46
6	Diskuze	50
7	Závěr	53
8	Seznam použité literatury a zdrojů	54
9	Seznam zkratk	59
10	Seznam tabulek	60
11	Seznam grafů.....	61
12	Seznam obrázků	62
13	Seznam příloh.....	63

1 Úvod

Pivo je slabě alkoholický fermentovaný nápoj, vyráběný z vody, obilného sladu (legislativa povoluje i z části nahradit slad surogáty) a chmele, chmelových produktů či chmelových extraktů. Připravená mladina je následně řízeně kvašena pivovarskými kvasinkami.

Pivo patří k nejstarším alkoholickým nápojům na světě, jeho historie sahá až do dávné Mezopotámie, 4000 př. n. l. První zmínka o pivovarské tradici v českých končinách pochází z roku 993, kdy byl založen Břevnovský klášter s pivovarem. Od té doby se pivovarnický průmysl u nás rozvíjel a roku 1499 byl založen asi nejznámější minipivovar U Fleků, který vaří Flekovský tmavý ležák dodnes. V dnešní době je velký rozmach minipivovarů, v České republice nalezneme už více jak tři sta minipivovarů, které se snaží konkurovat velkým pivovarským gigantům. Pivo z minipivovarů zákazníkům láká, je nepasterované, nefiltrované a velmi často mohou konzumenti ochutnat pivní speciály. Velké pivovary zas lákají na stabilní chuť produktu a zaručují pravidelnou kontrolu finálního výrobku, což u minipivovarů není vždy možné v takové míře a tak je jejich pivo rizikovější pro konzumenta.

Pivo obsahuje velké množství zdraví prospěšných látek jako vitaminy, bílkoviny, flavonoidy či sacharidy. Na druhou stranu je pivo alkoholický nápoj a tak by se měl konzumovat s rozumem. Mimo to v pivě nalezneme i látky cizorodé jako mykotoxiny, N-nitrosaminy a biogenní aminy.

Biogenní aminy jsou látky nebezpečné, vyskytují se téměř ve všech potravinách jako produkty metabolismu mikroorganismů. Ve větším množství se objevují zejména ve fermentovaných výrobcích. Pokud je jejich koncentrace nízká tak nepředstavují nebezpečí pro lidský organismus. Ve vyšších koncentracích je jejich přítomnost toxická, zejména pak pokud potravina obsahuje i alkohol, který účinky některých biogenních aminů umocňuje. Konzumace piva s vysokým obsahem biogenních aminů může vést ke zvracení, bolestem hlavy, hypertenzi, alergickým reakcím, vyrážce a v extrému i ke ztrátě vědomí konzumenta.

Legislativa přímo určuje maximální koncentrace pro jednotlivé biogenní aminy v potravinách, u piva je nejnebezpečnější výskyt histaminu, nejvyšší povolená koncentrace tohoto biogenního aminu v pivu je 20 mg/kg.

Biogenní aminy v pivu lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří aminy, které jsou obsaženy ve sladu a dalších surovinách pro výrobu piva, jejich počáteční množství nelze příliš ovlivnit, ale během procesu vaření piva lze zabránit jejich rozvoji. Jedná se o putrescin, agmantin, spermin a spermidin. Do druhé skupiny aminů patří tyramin, histamin a kadaverin.

Jejich množství lze regulovat a to správným technologickým postupem vaření piva, důkladnou sanitací zařízení, kontrolou surovin pro vaření piva a především zabránit mikrobiologické kontaminaci.

2 Cíl práce

Cílem této práce je teoreticky popsat výrobu piva a suroviny, které se pro výrobu tohoto slabě alkoholického nápoje používají. Dále popsat problematiku výskytu biogenních aminů v pivu. Charakterizovat jejich strukturu a původ. Zmapovat suroviny a jiné potraviny, ve kterých se biogenní aminy vyskytují. Následně zjistit jaký vliv mají biogenní aminy obsažené v pivu na organismus konzumentů.

V praktické části je úkolem stanovení vybraných biogenních aminů vyskytujících se ve vzorcích piva, konkrétně ve světlých spodně kvašených pivech z minipivovarů a velkých průmyslových pivovarů. Poté srovnat koncentrace biogenních aminů jako histamin, putrescin, kadaverin, tryptamin a tyramin v nepasterovaných a nefiltrovaných pivech z malých pivovarů s pasterovanými a filtrovanými pivy z velkých průmyslových pivovarů.

2.1 Hypotéza

Biogenní aminy se budou vyskytovat v analyzovaných vzorcích piva. Na množství biogenních aminů má vliv technologický proces výroby piva a jeho finální úpravy jako pasterace a filtrace. Předpokladem je, že v pivech z minipivovarů bude biogenních aminů nalezeno více než v pivech z velkých průmyslových pivovarů.

3 Literární rešerše

3.1 Pivo

3.1.1 Pivo

Pivo je slabě alkoholický nápoj vyráběný z vody, obilných sladů a chmele. Mladina je následně kvašena ušlechtilým druhem kvasinek po určitou dobu, při charakteristické teplotě pro daný druh kvašení. Doba ležení je vždy specifická pro určitý druh piva. Jako zdroj zkvasitelných cukrů se v České republice používá převážně škrob z ječných sladů, výjimečně lze použít jako zdroj škrobu pšenici, kukuřici, žito či rýži (Chládek, 2007).

3.1.2 Suroviny pro vaření piva

3.1.2.1 Voda

Pivovarství patří k průmyslovým odvětvím, kde je jedna z největších spotřeb vody. Na 1 hl vystaveného piva je použito mezi 3,7 až 10,9 hl vody, v průměru je uváděno 6 hl vody na 1 hl piva (Kunze, 1994). Pitná voda musí vyhovovat požadavkům ČSN 75 7111.

Basařová et. al. (2010) rozděluje vodu v pivovarském průmyslu na následující tři kategorie:

- Varní voda je základní surovinou pro přípravu piva. Z hlediska hygienické a zdravotní nezávadnosti musí splňovat požadavky na pitnou vodu. Zároveň musí varní voda vyhovovat technologickým požadavkům při výrobě piva. Voda v pivě představuje 75 až 85 % hmotnosti.
- Mycí a sterilační voda nesmí obsahovat mikroorganismy, chemické kontaminanty a nesmí zapáchat. Pro výplachy a sterilaci je vodu doporučeno chlorovat (Moll, 1994).
- Provozní voda se používá například pro parní generátory, chlazení, pasteraci či pro výplachy sudů a transportních nádob.

V žádném typu používaných vod při vaření piva by se neměly objevovat ani v nejmenší míře biogenní aminy (Kalač a Křížek, 2003).

3.1.2.2 Sladovnický ječmen a slad

Už od počátků pivovarské výroby k výrobě piva používaly slady z různých obilovin. Ječmen setý (*Hordeum sativum*) je jednou z nejstarších kulturně pěstovaných plodin a dnes je již tradiční surovinou pro výrobu piva ve všech pivovarských velmocích (Basařová et al., 2010).

Taxonomicky řadíme Ječmen (rod *Hordeum*) do říše rostlin, oddělení semenných (*Spermathophyta*), pododdělení krytosemenných (*Angiospermae*), třídy jednoděložných (*Monocotyledonae*), čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) (Kosař a Procházka, 2003).

V pravěku se používal pro výrobu sladů ječmen šestiřadý (*Hordeum hexastichum*) a ječmen čtyřřadý (*Hordeum tetrastichum*). Ve středověku se upustilo od čtyřřadého ječmene a začal se používat kromě ječmene šestiřadého i ječmen dvouřadý (*Hordeum distichum*). V novověku přišla éra ječmenů dvouřadých nících (*Hordeum distichum* var. *Nutans*). Až do konce 18. století se spíše na území Čech a Moravy ovšem vyráběl slad převážně z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), pro speciální piva se zřídka používal i oves setý (*Avena sativa* L.). František Ondřej Poupě, reformátor českého pivovarství nebyl velkým zastáncem jiných než ječných sladů, protěžoval zásadu „pšenice na koláče, oves koňům a ječmen na pivo“ a tak se od 18. století v Českých zemích vyráběl slad hlavně z ječmene a nastal velký rozmach spodně kvašených ležáků (Basařová et al., 2010).

V dřívějších dobách měl každý pivovar i vlastní sladovnu. V polovině 19. století s rozvojem průmyslové výroby v tzv. strojních pivovarech zaznamenala i výroba sladu velkou revoluci. Začaly se zakládat samostatné obchodní sladovny, které dodávaly slad tuzemským i zahraničním pivovarům. V pivovarském průmyslu vzniklo nové odvětví – sladovnictví či výroba sladu (Basařová et al., 2010).

3.1.2.3 Výroba sladu

Výroba sladu je řízený proces klíčení a hvozdění, během kterého dochází ke hromadění enzymů v zrnech ječmene. Sladování ovlivňuje i aromatické a barevné látky.

Pelikán a Sáková (2001) rozdělují proces sladování do pěti výrobních fází:

1. Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene
2. Máčení ječmene
3. Klíčení ječmene
4. Hvozdění a odkličování sladu
5. Skladování, leštění a expedice sladu

3.1.2.3.1 Druhy pivovarských sladů

Jednotlivé druhy sladů se získávají technologickými úpravami během máčení a klíčení ječmene při sladování. Tvorbu barevných a aromatických sloučenin u barevných sladů lze ovlivnit dalšími úpravami při hvozdní sladu. Z technologického hlediska výroby piva i jeho kvality je výhodné používat jednodrůdový nebo dvouodrůdový slad (Basařová et al., 2010).

Ve světě se vyrábějí převážně světlé slady plzeňského typu pro světlá piva a tmavé slady mnichovského typu pro tmavá piva. Další druhy speciálních sladů se využívají pro zvýraznění určitých kvalitativních a specifických vlastností světlých a tmavých piv či pro různá speciální piva (Basařová et al., 2010).

Obrázek 1 - Druhy pivovarských sladů



Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/1915570/>

3.1.2.4 Chmel a chmelové produkty

Chmel, latinsky *Humulus lupulus* je nejvyšší kulturně pěstovaná liána na severní a jižní polokouli. Taxonomickým zařazením se jedná o rostlinu z čeledi konopovitých (*Cannabaceae*), řádu kopřivovitých (*Urticaceae*). Chmel je rostlinou dvoudomou, na jedné rostlině najedeme buď samičí, nebo samčí květy. Pivovarsky významná je pouze samičí rostlina tvořící hlávky, které obsahují zlatožlutý prášek, lupulin (Vent, 2002).

Obrázek 2- Chmelová hlávka s listem



Zdroj: <http://www.grapesandgrainsnyc.com/wp-content/uploads/2009/05/drawing1.gif>

3.1.2.5 Chemické složení chmele

Usušené chmelové hlávky obsahují pivovarsky významné sloučeniny, balastní látky, ale i látky nežádoucí. Pro výrobu piva jsou velmi důležité polyfenoly, extrahující se do horké vody, které ovlivňují průběh výrobního procesu i kvalitativní parametry piva. Dalšími významnými látkami jsou chmelové silice, které lze vyextrahovat vodní parou a dále jsou přítomny chmelové pryskyřice (Basařová et al., 2010).

Obsah jednotlivých složek chmele je různý a různí autoři uvádějí rozdílné hodnoty. Odlišné hodnoty souvisí velkou škálou chmelových odrůd, odlišnými oblastmi pěstování, různým stářím vzorků, rozdílnými metodami stanovení (Tabulka 1).

Tabulka 1 - Chemické složení chmele publikované různými autory

	Burgess (1964)	Pollock (1979)	Rybáček (1980)	Basařová a Čepička (1985)	Moll (1994)	Verzele (1986)
Složka	obsah složky (% hmotnostní)					
Voda	10	8 – 12	9 – 11	10	10 – 11	8 – 12
celkové pryskyřice	15	–	18	15	–	–
α-hořké kyseliny	–	2 – 12	–	–	2 – 12	2 – 12
β-hořké kyseliny	–	2 – 10	–	–	2 – 10	1 – 10
chmelové silice	0,5	0,5 – 1	0,3 – 1,2	0,5	0,5 – 2	0,5 – 1,5
lipidy a vosky	–	–	–	3	2 – 4	0,2 – 0,5
proteiny	15	15	10 – 24	15	12 – 18	15
aminokyseliny	0,1	–	–	–	–	–
polyfenoly	4	2 – 5	4,6	4	2 – 5	2 – 5
celulosa	43,4	40 – 50	–	44,5	40 – 50	40 – 50
Cukry	–	–	–	–	–	–
Pektiny	2	2	–	–	1 – 2	2
minerální látky	8	10	6 – 10	8	7 – 9	10

3.1.2.6 Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky můžeme zařadit mezi nejstarší „domestikované“ organismy. Už ve starém Egyptě se za pomoci kvasinek vyráběl chléb a různé alkoholické nápoje, včetně předchůdců piva. Prvně kvasinky zaznamenal Anton van Leeuwenhoek, který je popsal jako „malé perličky v pivě“ (Kopecká et al., 2012).

Chládek (2007) zařazuje pivovarské kvasinky do říše houby (*fungi*), dále do oddělení hub vřeckovýtrusných (*Ascomycota*), čeledi *Saccharomycetaceae* a rodu *Saccharomyces*.

Pivovarské kvasinky lze rozdělit do dvou skupin:

- Kvasinky pro svrchní kvašení (*Sacharomyces cerevisiae*, var. *cerevisiae*) se používají pro kvašení piv typu „ale“, „porter“, „stout“. Na konci kvašení jsou kvasinky vynášeny na hladinu vznikajícím oxidem uhličitým, kde vytvářejí „deku“. Kvasinky svrchního kvašení mají vyšší tepelnou odolnost, kvašení probíhá v teplotním rozmezí 20 – 24 °C,
- Kvasinky pro spodní kvašení (*Sacharomyces carlsbergensis*) se využívají pro piva plzeňského typu. Po ukončení procesu kvašení se kvasinky usazují na dně kvasných nádob. Teplota pro spodní kvašení je v rozmezí 8 až 14 °C.

Pivovarské kvasinky jsou buňky eukaryotní, oválného tvaru o délce 6 – 10 μm a šířce 5 – 8 μm . Právě rozměry a tvar buněk determinují transportní a metabolické možnosti kvasničné kultury (Basařová et al., 2010). Existují i pivovarské kvasinky, které mají protáhlý tvar (Dickinson, 2008).

Chemické složení pivovarských kvasinek jsou závislé na jejich typu, fyziologickém stavu buněk, kultivačních podmínkách, živných médiích a stáří kultury. Nejvíce je zastoupena voda, koncentrace se pohybuje mezi 65 – 80 %. Sušina pivovarských kvasinek se skládá z dusíkatých sloučenin (50 – 60 %), cukrů (15 – 37 %), lipidů (2 – 12 %), dále se v kvasinkách nacházejí růstové látky a vitamíny (Bendová a Kahler, 1981).

3.1.3 Postup výroby piva

Výrobu piva lze rozdělit na několik částí: šrotování, rmutování, scezování sladiny, přípravu mladiny, separaci horkých kalů, chlazení mladiny, provzdušňování mladiny, hlavní kvašení a ležení piva v ležáckém sklepě (Chládek, 2007). Velké průmyslové pivovary pivo ještě pasterují a filtrují před plněním do lahví, plechovek či sudů, u minipivovarů nejsou tyto úpravy zvykem.

3.1.3.1 Šrotování sladu

Před šrotováním sladu je nutno vybrat surovinu vhodnou pro daný výrobek, pro lepší kvalitu piva je vhodné použít jednodrůdový slad či odrůdy s podobnými genetickými vlastnostmi. Vybraný slad je před mletím vyčištěn na čističkách s vytrásadlem a sítí, zbaven prachu pomocí aspirátoru a také magnetickým přístrojem zbaven feromagnetických nečistot (Basařová et al., 2010).

Vyčištěný slad se mele na dvou či víceválcových šrotovnicích na sladový šrot nebo odborněji na sladovou tluč a dále se zpracovává na varně (Chládek, 2007).

3.1.3.2 Vystírání a rmutování

Cílem vystírky je dobře smíchat našrotovaný slad či škrobnaté náhražky sladu (surogáty) s varní vodou (Basařová et al., 2010). Teplota na začátku vystírání by se měla pohybovat okolo 37 °C.

Vzniklá směs neboli vystírka se začne pomalu zahřívat. Škrobnatá zrna z rozemletého sladu bobtnají a při teplotě asi 52 °C začínají mazovatět. Po dalším zvýšení teploty na 65 °C, což je nižší cukrotvorná teplota dojde ke ztekucování škrobového mazu. Za vyšší cukrotvorné

teploty 72 – 75 °C dochází ke zcukřování. Tento základní proces rmutování lze provést buď dekokčně nebo infuzně. Oba typy rmutování vyžadují odlišný technologický postup a i rozdílné strojní vybavení varny (Chládek, 2007). Po ukončení procesu rmutování získáme takzvanou sladinu.

Při dekokčním rmutováním se považují dílčí rmuty na technologicky významné teploty a dle počtu rmutů rozdělujeme dekokční rmutování na jednormutové, dvourmutové a třírmutové. Nejčastěji je používán dvourmutový způsob, kterým se vaří ležáky (Basařová et al., 2010).

Infuzní způsob rmutování je jednodušší než dekokční, lze jej totiž provádět jen v jedné varné nádobě. Tento způsob je využíván především ve Velké Británii (Chládek, 2007).

3.1.3.3 Scezování sladin

Scezování je oproti rmutování spíše fyzikálním procesem. Proces lze rozdělit na dvě části, scezování předku a vyslazování mláta. V první fázi se pomocí vrstvy mláta, která zároveň slouží i jako filtr, oddělí kapalný podíl sladin (předku) a ve druhé fázi se mláto promyje horkou vodou. Promytím nebo-li vyslazováním se získají výstřelky, což je vlastně zředěná sladina. Po dosažení požadovaného objemu a výstřelků o chtěné hodnotě, se proces scezování ukončí. Sladina se poté dále zpracovává. Získané mláto se využívá jako krmivo pro hospodářská zvířata (Kosař a Procházka, 2000).

3.1.3.4 Chmelovar

Chmelovar je proces, kdy probíhá vaření sladin s chmelem. Během chmelovaru dochází k velkému množství fyzikálních, chemických i biochemických reakcí za působení fyzikálních vlivů, jejichž výsledné produkty ovlivňují celkové složení mladiny a ovlivňují tak další technologický proces a vlastnosti piva (Hough et al., 1982).

Po scezení se sladina smíchá v mladinové pánvi a začne chmelovar. Během chmelovaru se postupně přidává chmel, nejčastěji na začátku procesu, poté v polovině a pak na konci. Po povaření sladin s chmelem vzniká mladina. V dnešní době se většinou využívá chmele v podobě pelet, z velkých pivovarů používá hlávkový chmel pouze Budějovický Budvar n. p., který má nainstalovaný chmelový cíz na separaci povařených a vylouhovaných chmelových hlávek. Chmelovar trvá zpravidla 90 minut a hlavním cílem je převedení hořkých látek z chmele a jejich modifikace, odstranění nežádoucích těkavých látek z vařící se mladiny, inaktivace enzymů, sterilování mladiny, koagulování bílkovin a odpaření přebytečné vody,

kvůli dosažení požadované stupňovitosti. Po ukončení procesu chmelení se odebere vzorek mladiny, změří se výsledná stupňovitost a sleduje se, zdali došlo k vysrážení bílkovin (Chládek, 2007).

3.1.3.5 Chlazení mladiny a separace kalů

Vyrobená mladina se po chmelovaru musí ochladit na zákvasnou teplotu. Při ochlazování se navíc provzdušní a dojde k vyloučení horkých neboli hrubých kalů a z části jemných neboli chladových kalů. Proces chlazení mladiny začíná u teploty okolo 100 °C a cílem je teplotu snížit na 5 až 6 °C pro spodní kvašení, na teplotu 10 až 15 °C pro urychlené kvašení či na 12 až 18 °C pro kvašení svrchní. Během chlazení mladiny je nutno vyloučit biologické znečištění aby nedošlo k mikrobiální infekci (Basařová et al., 2010)

3.1.3.6 Hlavní kvašení mladiny

Hlavní kvašení mladiny je proces, kdy kontrolovaně kvasí vyrobený cukerný roztok, v podstatě vyrábíme z nealkoholické mladiny mladé pivo, které pak díky činnosti kvasnic, obsahuje alkohol a také oxid uhličitý (Chládek, 2007).



Proces hlavního kvašení probíhá v železobetonových kvasných kádích, ocelových kádích či v cylindrokónických tancích. Místo, kde probíhá hlavní kvašení, se nazývá spilka (Pelikán a Sáková, 2011). Existují tři základní druhy kvašení, spodní, svrchní a nejméně používané spontální.

3.1.3.7 Dokvašování a zrání piva

Cílem dokvašování a zrání piva je pomalé zkvašování cukrů při nízkých teplotách okolo 0 °C, sycení a fixace oxidu uhličitého, vyčeření a zajištění požadovaných organoleptických zralostí piva (Basařová et al., 2010).

3.1.3.8 Filtrace

Filtrace jako taková je ve výrobě piva zejména ve velkých pivovarech velmi důležitá. První část filtrace probíhá už během scezování sladiny ve scezovací kádi či její filtrace přes sladinové filtry. Hlavním důvodem je získání čistého piva na dokvašování, případně stabilizační filtraci. Při konečné filtraci dokvašeného piva se odstraňují kalící látky, tím se docílí

požadované čirosti piva a vyšší biologické a koloidní trvanlivosti. Čirost a stabilita vyrobeného piva jsou základní požadavky spotřebitelů spolu s ostatními kvalitativními znaky piva. Při filtraci se nesmí snížit pěnivost piva, zvýšit koncentrace kyslíku a iontů kovů, které by mohly katalyzovat oxidační reakce při skladování piva (Basařová et al., 2010).

Tradiční dokvašování piva probíhá v ležáckých tancích v podzemních sklepích nebo v chlazených budovách. U moderních postupů dokvašování se využívá velkoobjemových tanků ve volném prostoru či v „odlehčených“ budovách. Tradiční technologie počítá s dobou zrání 21 dnů pro desítku, 70 dnů pro dvanáctku. Doba a podmínky kvašení jsou pro každý pivovar specifické (Basařová et al., 2010).

3.1.3.9 Pasterace

Pasterace je tepelná úprava piva, která má za úkol zajistit biologickou trvanlivost (stabilitu) výsledného produktu. Pasterace je tepelná inaktivace mikroorganismů, které se podílí na kažení piva. Tím se liší od sterilace, což je inaktivace všech mikroorganismů pomocí tepla (Basařová et al., 2010).

3.1.4 Chemické složení piva

3.1.4.1 Anorganické látky

Nejvíce zastoupenou látkou v pivu je voda, která slouží jako rozpouštědlo všech ostatních složek. Obsah vody v pivu se pohybuje v rozmezí 88 a 96 % (Kosař a Procházka, 2000).

Mezi další anorganické látky, obsažené v pivu, patří minerální látky pocházející převážně ze sladu a varní vody. Nejvíce je zde zastoupen draslík, sodík, hořčík, vápník, fosforečnany, chloridy, sírany a dusičnany. Dále je přítomen oxid uhličitý, který je přirozeným produktem kvašení a jeho obsah se pohybuje v rozmezí 0,35 – 0,55 % hm. Oxid uhličitý se podílí na řízu piva. Dalším z oxidů je oxid siřičitý, který je doprovodným produktem kvašení a v pivu bývá v množství 2 – 20 mg/l. Kyslík do piva lze vpravit během filtrace či stáčení do lahví. Pokud je obsažen v koncentraci vyšší než 0,5 mg/l výrazně poškozuje senzorycké vlastnosti piva, proto je snahou vyvarovat se jeho styku s pivem (Kosař a Procházka, 2000).

3.1.4.2 Těkavé látky

Mezi těkavé složky, obsažené v pivu, můžeme zařadit zejména ethanol. Množství ethanolu závisí na koncentraci původní mladiny a stupni prokvašení piva. Obsah alkoholu v pivu se podílí na plnosti piva.

Dále se v pivu vyskytují vyšší alkoholy, z větší části alifatické s počtem uhlíků mezi 5 a 10, jejich koncentrace v pivu se pohybuje v rozmezí 60 – 100 mg/l. Vyšší alkoholy výrazně ovlivňují sensorické vlastnosti piva.

Z aldehydů je v pivu zastoupen acetaldehyd neboli ethanal v koncentraci 2 až 20 mg/l, který ve vyšším množství může negativně ovlivňovat chuť piva.

V pivu nalezneme i estery, které výrazně ovlivňují sensorické vlastnosti piva. Jejich koncentrace se pohybuje mezi 10 – 30 mg/l.

Z organických kyselin je v pivu zastoupena kyselina octová, mimo ní se v pivu nacházejí i méně těkavé nižší a vyšší mastné kyseliny.

Při kvašení vzniká 2,3-butandion (diacetyl), který pokud není dostatečně odbourán, výrazně negativně ovlivňuje chuť piva.

Z dalších těkavých látek pivo obsahuje těkavé aminy, sirné sloučeniny a některé heterocyklické sloučeniny (Kosař a Procházka, 2000).

3.1.5 Prospěšné látky v pivu

Pivo má vyvážené nutriční složení, minimální obsah cizorodých látek a malý obsah alkoholu. Díky těmto vlastnostem řadíme pivo ke zdravím prospěšným nápojům, pokud je ovšem konzumováno s mírou. Pravidelná konzumace alkoholu v dávkách 20-30 g/den pro muže a 10-15 g/den pro ženy působí proti řadě onemocnění, hlavně kardiovaskulárním, chrání před aterosklerózou, omezuje shlukování krevních destiček a pozitivně působí na metabolismus lipidů, protože zvyšuje hladinu cholesterolu HDL a snižuje hladinu cholesterolu LDL (Caorao et al., 2000, Poli et al., 2013).

Pivo obsahuje zdravím prospěšné sacharidy, bílkoviny, minerály, rozpustnou vlákninu, vitamíny skupiny B a řadu polyfenolických látek, které mají antioxidační, antikarcinogení a antimikrobiální účinky (Gordon, 1996).

Flavonoidy jsou zdravím prospěšné látky, které se do piva dostávají z chmele a sladu. Jedná se o přírodní antioxidanty s protinádorovými a antimikrobiálními účinky na lidský organismus. Xanthohumol je inhibitorem různých typů rakovinových nádorů, má antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky (Olšovská et al., 2014).

V pivu nalezneme především vitaminy rozpustné ve vodě, tedy vitaminy skupiny B. Tyto vitaminy se účastní metabolismu sacharidů, bílkovin, tuků, cholesterolu a nukleových kyselin. Nezbytné jsou při tvorbě červených krvinek, ovlivňují stav lidské pokožky, vlasů a nehtů, mají vliv na správnou činnost nervového a imunitního systému, podporují spánek, ovlivňují paměť a koncentraci člověka. Vitaminy skupiny B se do piva dostávají ze sladu a z části z kvasinek během fermentace mladiny (Olšovská et al., 2014).

3.1.6 Cizorodé látky v pivu

Cizorodé látky v pivu nejsou přirozenou složkou tohoto nápoje. Do piva se dostávají se surovinami či vznikají během procesu výroby, případně mohou pocházet z pomocných látek nebo technologického zařízení (Basařová et al., 2010).

Mezi nejškodlivější látky v pivu se řadí N-nitrosaminy, což jsou látky vznikající reakcí oxidu dusíku s aminosloučeninami během hvozdění sladu a označují se jako těkavé nitrosaminy (Gastl et al., 2009). Nejvíce jsou sledovány těkavé nitrosaminy a netěkavé ATNC (apparent total nitrosamine content). Významnými producenty N-nitrosaminů jsou bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a rod *Bacillus* (Olšovská et al., 2014).

Dalšími cizorodými látkami v pivu jsou těžké kovy a další látky. Těžké kovy jako kadmium, rtuť či olovo pocházejí ze surovin nebo z vody, která se koncentruje v mlátu. Maximální povolené množství těžkých kovů udává legislativa (Basařová et al., 2010).

Mykotoxiny jsou látky toxické, které vznikají činností plísní, například rodu *Fusarium* a vyskytují se převážně ve sladu. Snadno přežívají technologické operace a mohou přejít do hotového piva, takže už při příjmu suroviny pro sladování se musí dbát, aby jejich výskyt byl co nejmenší. Mezi nejvíce nebezpečné se řadí aflatoxiny a ochratoxiny, které jsou silně karcinogenní (Basařová et al., 2010).

V pivu lze nalézt i alifatické halogenové uhlovodíky, které vznikají hlavně při úpravě vody chlorací či bromací. Jejich koncentrace se musí pohybovat pod 0,07 mg/kg. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) mohou pocházet již ze sladu, zatímco polychlorované bifenyly se do piva dostávají z nátěrů technologického vybavení. Jejich koncentrace by měla být nižší než 0,5 mg/kg (Basařová et al., 2010).

Nežádoucími látkami v pivu jsou i biogenní aminy a polyaminy, které se v pivu objevují v důsledku mikrobiální kontaminace mléčnými bakteriemi. Patří mezi ně především tyramin, histamin, putrescin, kadaverin a tryptamin (Basařová et al., 2010).

3.1.7 Nežádoucí mikroorganismy v pivu

Pivo nepředstavuje příznivé prostředí pro růst mikroorganismů kvůli nízkému pH, anaerobním podmínkám, obsahu alkoholu, postupně klesající koncentraci cukrů a hořkým chmelovým látkám. V tomto selektivním prostředí mnoho organismů nepřežívá, některé mikroorganismy se vyskytují v pivu v latentní formě a vůbec h neovlivňují. K bakteriím, které takto přežívají, řadíme tepelně rezistentní bakterie tvořící endospory, převážně bacily a klostridie. Proto může být pivo tepelně ošetřeno krátkodobým záhřevem či pasterací v lahvích (Kosař a Procházka, 2000).

K nežádoucím mikroorganismům v pivu řadíme dle Backa (1994):

- Latentní zárodky – jejich výskyt je vzácný. Jedná se o rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus* a křísovité kvasinky. V pivu nedochází k jejich rozvoji. Produkty jejich metabolismu jsou toxické, významné jsou hlavně mykotoxiny, které produkují plísně vyskytující se na surovinách. Na surovinách, hlavně sladu, jsou přítomny *Fusaria*, produkující mykotoxiny deoxynivalenol (DON) a nivalenon (NIN). Dalšími plísněmi, které se vyskytují na ječmenu, jsou *Aspergillus* a *Penicillium* jejichž produktem jsou aflatoxin a ochratoxin A (OTA).
- Indikátorové mikroorganismy – nejsou škodlivé, pokud není kontaminace velká. Jedná se o *Acetobacter pasteurianus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Debaromyces hansenii*, *Sacharomyces chevalieri*.
- Pivu nepřímě škodící mikroflóra – mikroorganismy mohou škodit, ale v hotovém pivu se nepomnožují. Jedná se o *Enterobacter agglomerans*, *Obesumbacterium proteus*, *Candida kefyr*, *Hansenula anomala*.
- Pivu potenciálně škodící mikroflóra – k pomnožení mikroorganismů dochází pouze za určitých podmínek, pokud je přítomen kyslík, pH je zvýšeno nad 4,7 a chmeleno je v menší míře. K těmto organismům patří *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Micrococcus kristinae*, *Zymomonas mobilis*, *Sacharomyces cerevisiae pastorianus*.
- Pivu škodící mikroflóra – obligátně škodlivé mikroorganismy se v pivu pomnožují a tvoří sedlinu a zákal. Negativně ovlivňují sensorické vlastnosti piva (vznik zápachu, tvorba diacetylu atd.). Jedná se o *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Sacharomyces diastaticus*.

3.1.7.1 Mléčné bakterie

Mléčné bakterie jsou producenty kyseliny mléčné. Během homofermentativního procesu se molekula glukosy mění glykolýzou na dvě molekuly kyseliny pyrohroznové, která později přechází na kyselinu mléčnou. Mléčné bakterie lze rozdělit na laktobacily a pediokoky. Některé druhy mléčných bakterií jsou producenty biacetylu (Basařová et al., 2010).

Laktobacily způsobují nejobávanější kontaminace v pivovarském procesu. Laktobacily se vyskytují už v počáteční fázi výroby a mohou kazit pivo i za anaerobních podmínek při dokvašování piva v ležáckých tancích. V malém množství lze tyto bakterie nalézt ve většině pivovarů. Laktobacily lze rozdělit na dvě skupiny. Homofermentativní, kteří produkují kyselinu mléčnou jako hlavní produkt a heterofermentativní, kteří tvoří kromě kyseliny mléčné, ethanolu a oxidu uhličitého i kyselinu octovou, mravenčí a glycerol. K jejich pomnožování dochází ve sladině, mladině i v hotovém pivu. Optimální teplota růstu je 20 až 30 °C, pH 4 až 7. Jejich schopnost množení je ovlivněn i přítomným množstvím hořkých látek z chmele, které mají antimikrobiální účinky. Mezi druhy, které jsou často i rezistentní k hořkým látkám, řadíme *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus linderi*. Méně časté jsou *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus coryneformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus delbrueckii* (Basařová et al., 2010).

Pediokoky představovaly dříve vážné nebezpečí v pivovarském provozu, současná sanační technologie toto nebezpečí výrazně omezila. Pro růst těchto bakterií je optimální pH okolo 6. Ideální teplota je okolo 28 °C, ale mohou růst i při teplotách blízkých nule. Přítomnost pediokoků v pivu poukazuje na zvýšenou teplotu při dokvašování v ležáckém sklepě. Pediokoky produkují biacetyl a pivo má poté chuť a vůni po čerstvém másle nebo po medu. Nejčastěji se vyskytující druhy jsou *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus parvulus* (Basařová et al., 2010).

3.1.8 Druhy pív

Basařová a Hlaváček (1999) rozdělují piva dle barvy na piva světlá, polotmavá a tmavá, případně jejich směsi, poté se jedná o piva řezaná.

Piva ovšem můžeme rozdělit dle typu kvašení:

- Spodně kvašená piva
 - Ležáky
- Svrchně kvašená piva

- Pšeničná piva
- Ale
- Stout
- Porter
- Německá svrchně kvašená
- Francouzská svrchně kvašená
- Spontánně kvašená piva
 - Lambic
 - Lambic
 - Gueuze

3.1.9 Průmyslové pivovary

V České republice se nachází více jak 40 velkých průmyslových pivovarů. Můžeme je rozdělit na velké s výstavem nad 500 tisíc hl., na střední s výstavem od 200 až 500 tisíc hl. a na malé pivovary s výstavem do 200 tisíc hl. Pouze jediný z nich, Budějovický Budvar n.p., je státním podnikem. Ostatní velké pivovary spadají většinou pod nadnárodní společnosti jako například SABMiller, Molson Coors Brewing Company, Heineken, Lobkowicz a další.

Velké pivovary se především soustředí na produkci pasterovaného a filtrovaného piva, dodržují stabilní výtěžnost, trvanlivost a sensorické vlastnosti. Občas se na trhu objeví nový inovativní výrobek, ale většinou v limitované edici.

3.1.10 Minipivovary

Do kategorie minipivovarů zařazujeme pivovary s ročním výstavem 500 až 3 000 hl, nejvyšší možný výstav je pak 10 000 hl ročně. Zpravidla je minipivovar propojený s restaurací, pak jej lze označit jako restaurační minipivovar. Většina produkce minipivovaru je spotřebována v restauraci, menší část je pak prodávána v PET či skleněných lahvích a v KEG sudech (Basařová et al., 2010).

V současné době najdeme v České republice asi 300 minipivovarů, z toho 27 minipivovarů je jen v Praze. Jejich počet neustále roste, jen za poslední rok přibylo na trhu okolo 50 minipivovarů.

Pivo z minipivovarů je pro konzumenty zajímavé, v nabídce jsou často piva ovocná, různě kořeněná, s příchutěmi a velmi často také svrchně kvašená. Sládků vaří rozmanitou škálu pív, od klasické desítky až po velmi silná piva s obsahem alkoholu přes 20 %.

V minipivovaru je pivo navíc čerstvé, velmi často jde přímo z ležáckého tanku na čep (Večerková a Kiss, 2007).

Minipivovary, piva také zpravidla nefiltrují a nepasterizují. Riziko kontaminace a přítomnosti je tedy mnohem vyšší než u velkých průmyslových pivovarů. Minipivovary navíc nemají svou vlastní laboratoř kvality, kde se piva analyzují, vzorky si tak nechávají kontrolovat na jiných pracovištích. Kontrola, jako taková, není tak komplexní jako u velkých pivovarů, kde se s odběrem vzorků začíná už u primárních surovin a končí se u konečného výrobku.

3.2 Biogenní aminy

3.2.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou aminy, které se přirozeně vyskytují, obsahují aminoskupiny, které jsou odděleny aromatickým jádrem nebo alifatickým řetězcem. Putrescin, spermin, spermidin a kadaverin mají alifatickou strukturu. Histamin a tryptamin má heterocyklickou chemickou strukturu, u tyraminu a 2-fenyletylaminu se setkáme se strukturou aromatickou (Smit et al., 2008; Crea et al., 2010).

Biogenní aminy jsou přítomny v živočišných tkáních a rostlinných pletivech, kde mají své specifické funkce. Biogenní aminy ze skupiny auxinů jsou stavebními látkami pro biosyntézu fytohormonů, hordenin a gramin jsou protoalkaloidy rostlin, histamin v živočišných tkáních má funkci tkáňových hormonů a katecholaminy jsou prekurzory hormonů nadledvinek živočichů (Hajšlová a Velíšek, 2009).

3.2.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin. Dekarboxylace je proces, kdy dochází k odštěpování oxidu uhličitého ze substrátu, proces štěpení je katalyzován dekarboxylázami. Každý z biogenních aminů má vlastní prekurzorovou aminokyselinu (Tabulka 2).

Působením dekarboxyláz vzniká z argininu agmatin, z histidinu histamin, z fenylalaninu 2-fenylethylamin, z tyrosinu tyramin, z lysinu kadaverin, z 3,4-dihydroxyalaninu DOPA, z tryptofanu tryptamin a z ornithinu putrescin (Hajšlová a Velíšek, 2009).

Tabulka 2 - Biogenní aminy, jejich prekurzorové aminokyseliny a biologický význam.

Biogenní amin	Aminokyselina	Biologický význam
Histamin	Histidin	lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, ovlivňuje sekreci žaludeční šťávy, účastní se anafylaktického šoku a alergických reakcí
Kadaverin	Lysin	stabilizuje makromolekuly a subcelulární struktury, stimuluje diferenciaci buněk, hormone
Putrescin	Arginin	stabilizuje makromolekuly a subcelulární struktury, stimuluje diferenciaci buněk, rostlinný hormone
Tyramin	Tyrosin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, zvyšuje krevní tlak, ovlivňuje kontrakce hladkého svalstva
Tryptamin	Tryptofan	lokální tkáňové a rostlinné hormony, vliv na krevní tlak, peristaltiku střev a psychické funkce
Dopamin	DOPA	mediátor sympatických nervů (norepinefrin, epinefrin)
Agmatin	Arginin	stabilizuje makromolekuly a subcelulární struktury, stimuluje diferenciaci buněk, rostlinný hormone
2-fenylethylamin	Fenylalanin	

Zdroj: Velíšek a Hajšlová, 2009

3.2.3 Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů

Množství a vznik biogenních aminů může být ovlivněno mnoho různými faktory, jako jsou teplota, pH či přítomnost dalších látek jako například ethanol (Buňka et al., 2012).

Hodnota pH je faktor ovlivňující aktivitu dekarboxylas. Vyšší aktivita enzymů nastává při kyselejších pH mezi 4 a 5,5. V kyselém prostředí jsou bakterie produktivnější a vytvářejí více dekarboxylas. Pokud je pH sníženo, dochází k inhibici růstu mikroorganismů, hlavně ze skupiny *Enterobacteriaceae*. Pokud je pH zvýšeno, bakterie mnohonásobně zvýší produkci biogenních aminů (Pollaková, 2010).

Bakterie produkující aminy jsou výrazně ovlivňovány teplotou. Teplota mezi 20 °C a 37 °C je optimální pro bakterie produkující dekarboxylázy, snížením teploty je růst zastaven (Karovičová a Kohajdová, 2005).

3.2.4 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Biogenní aminy jsou produktem činnosti mikroorganismů, které se mohou vyskytovat v potravině přirozeně či mohou být do potraviny zaočkovány jako například startovací kultura. Mikroorganismy mohou významně ovlivnit tvorbu biogenních aminů při výrobě fermentovaných výrobků (Pollaková, 2010).

Mikroorganismy mohou produkovat biogenní aminy při výrobě či skladování potraviny. Množství a druh biogenního aminu je závislé na typu výrobku a druhu mikroorganismů. Mezi dekarboxyláza-pozitivní bakterie se řadí zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, *Bacillus macerans*, *Propionibacterium* a také někteří zástupci ušlechtilých startovacích kultur pro fermentované výrobky jako *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* a *Micrococcus* (Pollaková, 2010).

3.2.4.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) řadíme do skupiny grampozitivních, nesporulujících anaerobních bakterií. Vyskytují se ve formě koků a tyčinek. Během mléčného kvašení spotřebovávají zkvasitelné cukry a produkují kyselinu mléčnou. K bakteriím mléčného kvašení řadíme okolo 20 druhů jako *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* (Pollaková 2010).

Bakterie mléčného kvašení patří k mezofilním bakteriím, ale růst mohou i při teplotách 5 °C až 45 °C. Preferují spíše kyselé prostředí, ale mohou fungovat i v prostředí alkalitickém. BMK jsou slabě proteolytické a lipolytické. Pro své fungování vyžadují bakterie mléčného kvašení v prostředí volné aminokyseliny, dusík a vitaminy (Trias Mansila, 2008).

Bakterie mléčného kvašení, které se používají v potravinářství jsou netoxické a nepatogenní. Existují ovšem kmeny jako *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*, které jsou producenty biogenních aminů (Pollaková, 2010).

Nejvýznamnějším biogenním aminem, který je produkován kmeny *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*, je tyramin. Některé bakterie z kmenu *Leuconostoc* mohou produkovat histamin (Suzzi et Gardini, 2003).

3.2.5 Vliv biogenních aminů na lidský organismus

Biogenní aminy jsou podstatné látky pro lidský organismus. Na druhou stranu jejich nadměrný příjem může zapříčinit mnoho zdravotních problémů jako bolesti hlavy, kolísání krevního tlaku, dýchací problémy a zvracení. Histamin a tyramin jsou známy především pro své psychoaktivní a vasoaktivní účinky (Buňka et al., 2012).

Pro lidi se zažívacími potížemi jako zánět žaludku, Crohnova choroba, syndrom dráždivého tračníku a žaludeční vředy jsou biogenní aminy velmi nebezpečné. Činnost oxidáz v organismu je nižší a detoxikační systém v zažívacím traktu není schopen metabolizovat biogenní aminy přijaté v potravě (Karovičová a Kohajdová, 2005).

Biogenní aminy společně s alkoholem představují velký problém. Alkoholová intoxikace samotná způsobuje vasodilataci, která způsobuje bolesti hlavy. Alkohol má vliv na neurotransmitery a některé hormony spojované s bolestmi hlavy jako serotonin či prostaglandiny. Bolesti hlavy však mohou způsobovat právě i výskyt biogenních aminů v alkoholickém nápoji, pivu, jejich přítomnost poukazuje na kontaminaci potravin bakteriemi mléčného kvašení (Kalač et al., 2002).

3.2.5.1 Detoxikace organismu

V trávicím traktu se nachází detoxikační systém, který je schopen odbourat malé množství biogenních aminů, které konzument přijal s potravou. Při příjmu malého množství jsou exogenní aminy z potravin rychle detoxifikovány činností aminooxidáz a konjugací. Důležitou funkci v detoxikačním mechanismu hrají enzymy monoaminoxidáza (MAO) a diaminoxidáza (DAO), které se vyskytují ve střevním epitelu. Pokud konzument přijme velké množství biogenních aminů, je alergik či je aktivita monoaminoxidázy a diaminoxidázy nedostatečná, tak se biogenní aminy neeliminují a hromadí se v organismu (Pollaková, 2010).

3.2.6 Biogenní aminy v potravinách

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přítomny v různých potravinách a nápojích, pokud je jejich koncentrace vysoká, tak je přítomnost biogenních aminů toxická pro organismus. Psychoaktivní aminy ovlivňují centrální nervový systém, vasoaktivní aminy mají negativní účinek na vaskulární systém. Jejich toxicita je přímo závislá na účinnosti detoxikace, pokud konzument požil například ethanol, který snižuje aktivitu monoaminoxidázy, je odbourávání biogenních aminů inhibováno. U citlivých jedinců pak

vede konzumace nápojů a potravin s vyšší koncentrací biogenních aminů k bolestem hlavy, zvracení, hypertenzi, alergickým záchvatům, vyrážkám a v kritických případech k šoku a ztrátě vědomí (Olšovská et al., 2014).

Zákon č.110/1997 o potravinách a tabákových výrobcích uvádí maximální koncentraci histaminu v potravinách 100 mg/kg a pro tyramin 100 mg/kg.

Při konzumaci histidinu v množství 8 – 40 mg dochází ke slabé otravě, při 40 – 100 mg se jedná o střední otravu a nad 100 mg jde už o otravu silnou. U tyraminu při požití více než 100 mg může nastat silná migréna (Anli et al., 2004).

3.2.6.1 Biogenní aminy ve víně

Biogenní aminy vznikají během celého výrobního procesu, hlavně při fermentaci vína z aminokyselin za působení enzymů ze skupiny dekarboxyláz nebo mohou být produkty enzymově katalyzované aminace. Mezi kontrolované biogenní aminy ve víně patří histamin, tyramin, tryptamin, spermin, spermidin, kadaverin a putrescin. Biogenní aminy mohou být zastoupeny již v moštu. Putrescin je jako jediný přítomný v hroznech. Vliv na množství biogenních aminů má i stupeň vyzrálости hroznů, hygiena rmutu, odrůda a klimatické podmínky. Dalším faktorem je i pH a obsah oxidu siřičitého. K největšímu rozvoji biogenních aminů dojde hlavně během fermentace. Nejvíce se na tvorbě podílí *Brettanomyces bruxellensis* a bakterie mléčného kvašení (Otrřisal a Stávek, cit. 1. 3. 2016).

3.2.6.2 Biogenní aminy v sýrech a mléčných výrobcích

Sýry jsou potraviny, které obsahují poměrně vysoké množství biogenních aminů, hlavně tyraminu a histaminu. V menším množství v sýrech nalezneme tryptamin, putrescin, β -fenyletylamin a kadaverin (Halász et al., 1994).

Množství biogenních aminů v sýrech není ovlivněno pouze druhem sýru, ale také výrobním procesem daného výrobku. Záleží na typu mléka (kravské, kozí, ovčí), tepelném opracování pomocí pasterace, době zrání, mikroflóře a velikosti sýra (Lorencová et al., 2012).

Mezi mikroorganismy produkující biogenní aminy v sýrech patří *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*. Biogenní aminy jsou přítomny v sýrech ementál, gouda, čedar, plísňové a tavené sýry (Pollaková, 2010).

3.2.6.3 Biogenní aminy ve fermentovaných masných výrobcích

Fermentované masné výrobky jsou vyráběny ze syrového, často mēlněného masa a tuku. Směs masa, tuku, solí, koření a dalších přísad je zaočkována startovací kulturou mikroorganismů. Během fermentace dochází k významné tvorbě histaminu a tyraminu. V průběhu prvních tří dnů zrání masného výrobku dojde ke zvýšení koncentrace histaminu desetkrát. Startovací kultury jsou převážně tvořeny více kmeny bakterií mléčného kvašení (Pollaková, 2010).

3.3 Biogenní aminy v pivu

Pivo patří mezi alkoholické nápoje a z hlediska příjmu biogenních aminů ho můžeme zařadit do rizikové skupiny. Biogenní aminy v pivu lze rozdělit do dvou skupin. V první skupině najdeme aminy, které pocházejí ze sladu a dalších surovin a lze je tak považovat za složku piva. Do první skupiny zařazujeme putrescin, agmantin, spermin a spermidin. V druhé skupině se nachází histamin, tyramin a kadaverin, jejichž výskyt v hotovém pivu poukazuje na aktivitu kontaminujících bakterií mléčného kvašení během procesu výroby piva (Kalač, P. a Křížek, M., 2003).

Druh a množství biogenních aminů v pivu závisí na kvalitě surovin pro vaření piva, technologie vaření a na hygienických podmínkách v pivovaru (Tang et al., 2009).

Koncentrace histaminu se pohybuje v rozmezí 0,2 – 22 mg/kg, kadaverinu 0,2 – 49 mg/kg, putrescinu 0,3 – 31 mg/kg, spermidinu 0,2 – 7 mg/kg, sperminu 0,2 – 15 mg/kg, agmantinu 0,5 – 47 mg/kg, 2-fenylethylaminu 0,2 – 8 mg/kg, tyraminu 0,3 – 68 mg/kg a tryptaminu 0 – 10 mg/kg (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Kalač a Křížek (2003) zjistili, že obsah alkoholu či extrakt původní mladiny (EPM) nemá vliv na přítomnost biogenních aminů. Biogenní aminy byly nalezeny v pivech alkoholických i nealkoholických. Na koncentraci má ovšem vliv pH piva, u piv kyselejších bylo aminů více, vyšší kyselost indikovala zvýšenou aktivitu bakterií mléčného kvašení.

Dle legislativy se musí pH piva pohybovat v rozmezí 4,0 – 4,9. Pro bakterie produkující biogenní aminy je toto prostředí ideální, nejvyšší aktivity dosahují totiž v podmínkách, kde je hodnota pH mezi 4 a 5,5.

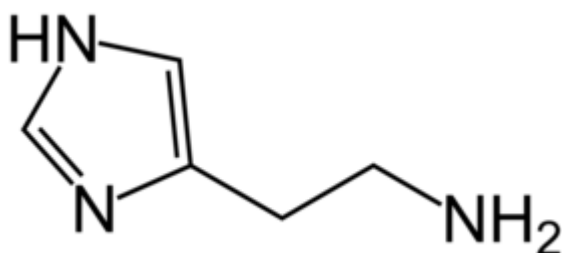
3.3.1 Histamin

Histamin řadíme do druhé skupiny biogenních aminů, jejichž přítomnost v hotovém pivu poukazuje na přítomnost kontaminujících bakterií zejména mléčného kvašení (Kalač a Křížek, 2003). Ze skupiny mléčných bakterií jsou to hlavně *Lactobacillus* a *Pediococcus*, které se velké míře podílejí na produkci histaminu (Olšovská et al., 2014).

Histamin způsobuje nejčastější otravy způsobené biogenními aminy. Vyskytuje se v makrelovitých rybách, sýrech, víně, masných výrobcích a pivu. Toxikologické účinky histaminu závisí na přijatém množství, přítomnosti jiných aminů, aktivitě aminooxidáz a zdravotním stavu trávicí soustavy jedince. Pro citlivé jedince je škodlivý příjem i malého množství histaminu, konkrétně mezi 5 až 10 mg. K nepatrné otravě histaminem dojde při příjmu 8 až 40 mg histaminu, ke střední otravě dojde při příjmu 40 až 100 mg histaminu,

vyšší příjem než 100 mg histaminu zapříčiňuje intenzivní otravu. Maximální množství histaminu v potravinách je v rozmezí 50 až 100 mg/kg (Silla Santos, M. H., 1996; Ōnal, A., 2007; Crea et al., 2010). Dle zákona č. 110/1997 sb. o potravinách a tabákových výrobcích je maximální koncentrace histaminu v pivu 20 mg/kg.

Obrázek 3- Struktruní vzorec histaminu



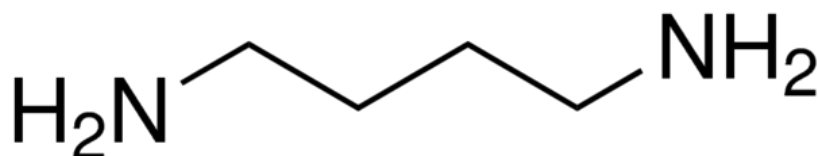
Zdroj: <https://histaminovakasulka.files.wordpress.com/2012/08/300px-histamine.png>

Nejběžnější příznaky otravy histaminem se projevují u kardiovaskulárního systému. Histamin může přímo ovlivňovat činnost srdce díky uvolnění adrenalinu a noradrenalinu z nadledvinek, navíc histamin může podráždit děložní hladké svalstvo, střeva, dýchací cesty, podílí se na stimulaci senzoričkých i motorických neuronů a kontroluje sekreci žaludečnich kyselin. Otravy histaminem se projevují mnoha symptomy, například na různých vyrážkami, kopřivkou, otokem či zánětem. U trávicího ústrojí se setkáváme s nevolnostmi, zvracením, průjmem a křečemi v břišní dutině. Dále se může objevit hypotenze, bolesti hlavy, bušení srdce a návaly horka (Shalaby, A.R., 1996; Marino et al., 2008).

3.3.2 Putrescin

Putrescin patří do skupiny biogenních aminů pocházejících ze sladu používaného při vaření piva. Mimo to je putrescin produkován bakteriemi *Enterobacter* a *Escherichia coli* (Olšovská et al., 2014) Je to amin s alifatickou chemickou strukturou.

Obrázek 4- Strukturní vzorec putrescinu



Zdroj: <http://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/02100441.png>

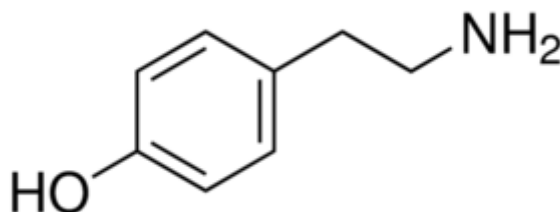
Putrescin vzniká dekarboxylací aminokyseliny ornitinu či agmantinu. Biochemickou reakcí putrescinu s přidáním aminopropylových skupin získáme jiné biogenní aminy jako spermin a spermidin (Erzetti et al., 2009).

U putrescinu není přímo nebezpečná jeho toxicita, ale spíše synergický vztah ostatními biogenními aminy. Putrescin výrazně umocňuje farmakologické účinky mnohem nebezpečnějšího histaminu (Křížek a Hlavatá, 1995).

3.3.3 Tyramin

Tyramin je stejně jako histamin, biogenní amin, který vzniká činností kontaminujících bakterií mléčného kvašení (Kalač a Křížek, 2003). Prekurzorem tyraminu je aminokyselina tyrosin.

Obrázek 5- Strukturní vzorec tyraminu



Zdroj:http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure7/183/mfcd00008193.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00008193-medium.png

Tyramin způsobuje zvýšení krevního tlaku a srdeční frekvence. Mimo jiné může zapříčinit rozšíření zorniček, oční tkáň, slzení a slinění, navýšení obsahu cukru v krvi a zrychlení dýchání (Pollaková, 2010).

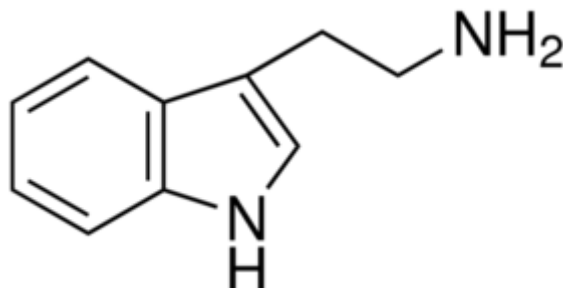
Velký rozvoj tyraminu nastává při hlavním kvašení mladiny, nejvíce se to projevuje u spontánně kvašených belgických speciálů jako jsou Lambic, Kriek a u svrchně kvašených piv. U spodního kvašení se rozvoj tyraminu neprojevil. Pokud je mladina ovšem kontaminovaná bakteriemi mléčného kvašení jako jsou *Pediococcus* spp. tak se může koncentrace tyraminu zvyšovat (Kalač a Křížek, 2003).

3.3.4 Tryptamin

Dekarboxylací aminokyseliny tryptofan vzniká tryptamin, ze kterého vzniká oxidací hormon serotonin. Jedná se o biogenní amin s heterocyklickou chemickou strukturou. Tryptamin se v potravinách vyskytuje v malých koncentracích a není příliš spojován

s nežádoucím působením a lidský organismus. V pivu ho najdeme nejčastěji v koncentracích 0 až 10 mg/kg (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Obrázek 6- Strukturní vzorec tryptaminu



Zdroj:http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure0/061/mfcd00005661.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00005661-medium.png

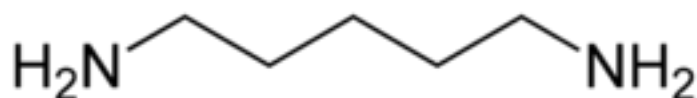
3.3.5 Kadaverin

Kadaverin je biogenní amin s alifatickou chemickou strukturou, vzniká dekarboxylací aminokyseliny lysin. Patří do druhé skupiny biogenních aminů v pivu spolu s histaminem a tyraminem. Kadaverin vzniká při hlavním kvašení mladiny jako metabolit kontaminujících bakterií mléčného kvašení (Kalač et al., 2002).

Za produkci kadaverinu v pivě jsou především zodpovědné bakterie *Enterobacter* a *E.coli* (Olšovská et al., 2014).

Zvýšený obsah kadaverinu může také poukazovat na nedostatky v technologii zpracování a skladování potraviny. V pivu najdeme kadaverin nejčastěji v množství 0,2 až 49 mg/kg (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Obrázek 7- Strukturní vzorec kadaverinu



Zdroj:<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c2/Cadaverine-2D-skeletal.png/280px-Cadaverine-2D-skeletal.png>

3.3.6 Biogenní aminy v pivech z minipivovarů

Biogenní aminy nalezneme téměř ve všech tuzemských pivech i pivech ze zahraničí. Piva z minipivovarů jsou rizikovější, jejich technologie není většinou tak propracovaná jako u pivovarů středních a velkých. V následující tabulce, nalezneme výsledky testování piv z minipivovarů, které bylo prováděno pracovníky VÚPS v Praze. Modře zvýrazněné hodnoty poukazují na mikrobiální kontaminaci testovaných piv. Červeně zvýrazněné hodnoty označují piva, která lze klasifikovat jako zdravotně závadná (Olšovská et al. 2014).

Tabulka 3 - Obsah biogenních aminů v pivech z minipivovarů (monitoring 2011).

Vzorek	Extrakt mladiny (% hm.)	Alkohol (% hm.)	Histamin (mg/l)	Tyramin (mg/l)	Trypamin (mg/l)	Putrescin (mg/l)	Kadaverin (mg/l)
1	12,58	4,25	0	85,83	0,25	1,96	0,47
2	11,94	4,94	1,97	2,21	0,32	2,21	0,29
3	13,28	5,3	0,04	82,77	0,55	3,95	3,53
4	12,51	4,15	0,02	64,75	0,46	2,39	0,44
5	12,73	4,26	0,03	57,7	0,16	2,6	0,22
6	12,48	2,76	0,02	2,77	0,3	2,43	0,55
7	12,07	5,16	0,03	58,67	0,16	3,04	0,42
8	13,34	4,1	2,94	67,76	0,23	4,41	44,46
9	9,97	3,05	0,1	84,03	0,18	4,63	26,71
10	12,04	3,6	0,09	104,71	0,26	5,34	38,77
11	13,59	4,55	0,51	76,79	0,17	4,3	10,28
12	11,17	4,25	1,95	54,09	0,16	4,25	23,68
13	10,83	4,17	0,07	3,64	0,18	2,71	21,36
14	16,62	5,56	0,01	56,94	0,21	4,11	2,25
15	10,95	3,9	0,02	52,57	0,22	2,04	0,76
16	11,97	4,25	0,01	67,4	0,27	4,43	9,11
17	12,63	4,55	0,01	38,94	0,15	1,73	6,15
18	11,32	3,71	0,02	14,69	0,13	2,17	29,07
19	11,17	4,38	0,02	0,26	0	2,64	0,22
20	11,56	4,04	0	0,18	0	2,39	0,06
21	13,97	5,26	0	1,1	0,3	2,4	0,11
22	16,86	6,57	0	1,99	0,26	2,22	0,22
23	14,16	5,44	0	1,15	0,09	1,88	0,41
24	14	5,27	0,03	2,1	0,17	2,18	0,47

Zdroj: Olšovská et al. 2014

3.4 Metody stanovení biogenních aminů

Pro stanovení biogenních aminů byla vytvořena velká škála analytických postupů. Jednotlivé metody jsou na míru vytvářeny pro jednotlivé potraviny, ve kterých se aminy mají stanovit. V potravinářství se nejvíce využívají postupy na stanovení aromatických a heterocyklických biogenních aminů (Macora et al., 2010).

Biogenní aminy se nejčastěji analyzují chromatograficky, využívá se chromatografie tenkovrstvá (TLC), plynová (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Huang et al., 2010).

Stanovení biogenních aminů je náročné vzhledem k obvyklým požadavkům na citlivost a přesnost stanovení. V dnešní době se příliš nepoužívají metody založené na přímém fotometrickém stanovení aminů v potravinách, převážně kvůli malé selektivitě stanovení. Stále se využívá TLC, jejichž předností je rychlost a cenová dostupnost. Pro rychlou analýzu v potravinářství lze TLC doporučit. Ovšem i u této metody je předseparace a derivatizace aminů nezbytná. Nearomatické biogenní aminy nejsou schopny absorbovat záření v oblasti UV/VIS a bez derivatizace a předseparace nelze provést detekci kapalinovou chromatografií (Veverka, 2012).

Nejčastěji se aminy separují ze vzorku vzhledem k jejich bazicitě kyselinou chloristou nebo trichloroctovou. U mléčných výrobků se využívá i extrakce methanolem za zvýšené teploty. Můžeme se setkat i s extrakcemi roztokem citranu sodného, okyselení vzorku kyselinou trichloroctovou a následnou centrifugací pro oddělení bílkovin (Önal, 2007).

3.4.1 HPLC

HPLC (High performance liquid chromatography) neboli Vysoko účinná kapalinová chromatografie je technika nejvíce využívaná pro determinaci biogenních aminů v potravinách pro její vysoké rozlišení, citlivost, univerzálnost a jednoduchou přípravu vzorků. Biogenní aminy nelze vystavit přímo ultrafialovému záření či fluorescenčnímu záření, proto je třeba vzorky před analýzou zderivatizovat například pomocí benzoyl chloridu (Tao et al., 2009).

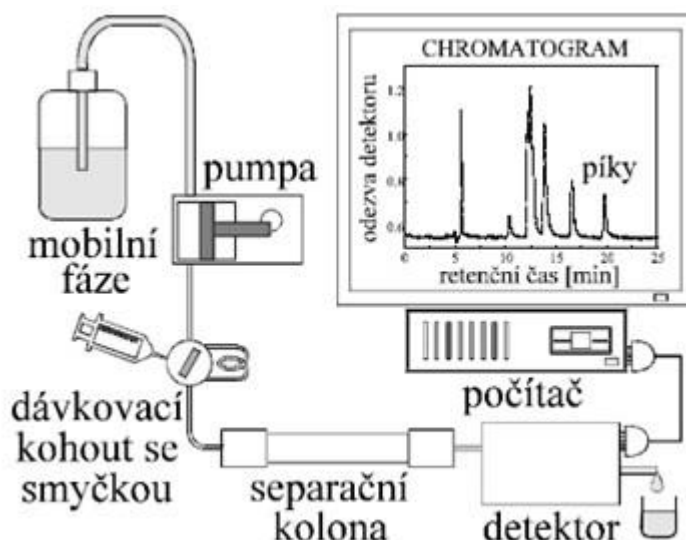
Chromatografii řadíme mezi separační metody, u kterých se oddělují složky v analyzovaném vzorku. Jedná se o metodu kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Během analýzy se vzorek vnáší mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Analyzovaný vzorek je pohybem mobilní fáze unášen přes stacionární fázi. Složky analytu jsou zadržovány na stacionární fázi. Na konec stacionární fáze se rychleji dostanou složky

vzorku, které jsou málo zadržované. U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina. Při separaci se analyzovaný vzorek rozděluje mezi fází mobilní a fází stacionární. Doba, kterou stráví analyt v jedné či druhé fází je závislá na afinitě jednotlivých fází (Veverka, 2012).

Nováková a Douša (2013) popisují kapalinový chromatograf takto:

- Zásobníky mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo: slouží k uchování a transportu mobilní fáze.
- Autosampler a manuální dávkovací ventil: jejich úkolem je dávkování vzorku.
- Chromatografická kolona a termostat kolony: slouží k separaci látek.
- Detektor: jeho úkolem je detekce látek.
- Počítač a software: zaznamenávají a vyhodnocují výsledky.

Obrázek 8- Schéma HPLC



Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/2510619/>

3.4.1.1 Kolony

V dnešní době se kolony pro HPLC připravují komerčně a uživatel nemůže příliš ovlivnit konstrukci, rozměry a tvar chromatografické kolony. Uživatel si může vybrat druh sorbentu a velikost částic (Nováková a Douša, 2013).

Plášť kolony se vyrábí z nerezové oceli (typ 316), která je vysoce antikorozi. Nicméně pokud se používá mobilní fáze, která obsahuje chloridy, organická rozpouštědla, jako acetonitril a dichlormethan, existuje riziko vyluhování železa z nerez ocelí. Materiál pro výrobu kolony by měl také odolávat vysokým tlakům, chemickému působení mobilní fáze a

povrch by měl být dokonale hladký. Pro analytické účely se používají analytické kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm a plněné jsou náplněmi o velikosti částic 1 až 100 μm (Nováková a Douša, 2013).

3.4.1.2 Nastavení teploty

Separace HPLC probíhají většinou při laboratorní teplotě a nevyžadují termostatování. U některých separací je výhodné zvýšit teplotu, účinnost separace se tím zlepší. Funkci regulace teploty většina nových chromatografů má, programová změna teploty se ovšem v HPLC nevyužívá (Klouda, 2003).

3.4.1.3 Detektory v kapalinové chromatografii

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie by detektory měly být dostatečně selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a zůstat utěsněná. Nejvíce se využívají detektory fotometrické, refraktometrické a fluorescenční (Klouda, 2003).

V kapalinové chromatografii lze využít několik různých typů detektorů.

- Fotometrický detektor: nejvíce používaný detektor. Měří absorbanci eluátu, který vychází z kolony. Pro dosažení optimální citlivosti detektoru musí být zajištěna dostatečná dráha průtočné kvyety, kterou prochází paprsek. Jednodušší detektory tohoto typu měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, u složitějších lze vlnovou délku nastavit pomocí monochromátoru (Klouda, 2003).
- Fluorescenční detektor: využívá principu fluorescence, tedy schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor je vysoce selektivní a lze ho kombinovat s fotometrickým detektorem (Klouda, 2003).
- Refraktometrický detektor: měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Pokud je složka přítomna v eluátu, objeví se výchylka. Tento detektor není příliš citlivý, ale je univerzální. Při používání je nutné udržovat stálou teplotu (Klouda, 2003).
- UV/VIS spektrofotometrický detektor: je selektivní, nedestruktivní detektor, který měří absorbanci eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 800 μm (Cvačka, 2010). Kvantitativní vyhodnocení analýzy je založeno na Lambert-

Beerově zákoně, který vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce (A) (Nováková et al., 2013).

4 Praktická část

4.1 Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu

Experimentální část diplomové práce je zaměřená na stanovení vybraných biogenních aminů v pivu. Srovnávány byly vzorky piv nepasterovaných a nefiltrovaných z minipivovarů s pivy pasterovanými a filtrovanými z velkých průmyslových pivovarů. V první analýze byl stanovován putrescin, kadaverin a tryptamin. V druhé analýze byl analyzován histamin a tyramin.

Základní část postupu analýzy byla převzatá z metodiky stanovování biogenních aminů na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích a byla adaptována na možnosti laboratoře Katedry chemie na České Zemědělské univerzitě v Praze.

4.2 Analyzované vzorky

Všechny analyzované vzorky byly vzorky piva z pivovarů a minipivovarů v České republice. Všechna analyzovaná piva byla spodně kvašená, světlá výčepní či ležáky s obsahem alkoholu 3,5 % až 5,6 %. Piva byla vařena z ječného sladu či jeho surogátů a chmelena převážně českým chmelem. Jednotlivé receptury piv ovšem nejsou známy, jedná se o výrobní tajemství pivovarů.

Vzorky lze rozdělit na dvě části. U první sady se jednalo o piva pasterovaná a filtrovaná z velkých průmyslových pivovarů, druhá skupina byla piva nepasterovaná a nefiltrovaná z minipivovarů.

Vzorky byly označeny číslem, analýza byla tak zcela anonymní, v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty pro jednotlivá piva, obsah alkoholu, EPM a zda bylo pivo filtrované a pasterované či nikoliv.

Vzorky z velkých průmyslových pivovarů byly ze skleněných pivních půllitrových lahví. Vzorky z minipivovarů byly odebrány buď přímo v daném minipivovaru, buď se jednalo o vzorky přímo natočené z pípy či o vzorky stočené pod tlakem do pivních PET lahví. Některé vzorky z minipivovarů pocházely také ze skleněných pivních lahví, které byly zakoupeny ve specializovaných pivotkách.

Tabulka 4 - Anonymní seznam vzorků piv z minipivovarů a velkých pivovarů

Číslo vzorku	EPM	Obsah alkoholu	Pasterované	Filtrované
1	11°	4,50%	Ne	Ne
2	10°	4,10%	Ano	Ano
3	12°	4,40%	Ano	Ano
4	10°	3,50%	Ano	Ano
5	10°	4,00%	Ano	Ano
6	11°	4,70%	Ano	Ano
7	10°	4,00%	Ano	Ano
8	11°	4,50%	Ne	Ne
9	12°	5,00%	Ne	Ne
10	11°	4,10%	Ne	Ne
11	13°	4,80%	Ne	Ne
12	12°	5,00%	Ano	Ano
13	Nezjištěno	5,00%	Ano	Ano
14	11°	4,90%	Ano	Ano
15	10°	4,20%	Ano	Ano
16	11°	4,50%	Ano	Ano
17	10°	4,70%	Ano	Ano
18	11°	4,80%	Ne	Ne
19	14°	5,60%	Ne	Ne
20	12°	5,20%	Ne	Ne
21	13,5°	5,10%	Ne	Ne
22	12°	5,00%	Ne	Ne
23	12°	5,20%	Ne	Ne
24	12°	5,00%	Ne	Ne
25	10°	4,10%	Ano	Ano
26	10°	3,80%	Ano	Ano
27	11°	4,70%	Ano	Ano
28	10°	4,20%	Ano	Ano
29	12°	4,60%	Ano	Ano
30	10°	4,10%	Ano	Ano
31	12°	5,00%	Ne	Ne
32	12°	5,20%	Ne	Ne

4.3 Materiál

K analýze byly použity následující chemikálie:

- Putrescin dihydrochlorid pur.
- Kadaverin dihydrochlorid pur.
- Histamin dihydrochlorid pur.
- Tyramin hydrochlorid pur.
- Tryptamin hydrochlorid pur.
- 1,6-diaminohexan pur. (2000 mg/l)
- 1,7-diaminoheptan (2000 mg/l) pur.
- NaOH p. a. (9,8 mol/l)
- NaCl p. a.
- Benzoylchlorid p. a.
- Diethylether p. a.
- Methanol HPLC
- KH_2PO_4 č.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ č.
- HClO_4 p. a.
- Destilovaná a demineralizovaná voda

4.3.1 Tlumivý roztok pro analýzu histaminu a tyraminu

Na přípravu tlumivého roztoku bylo použito 12,50 g KH_2PO_4 a 16,34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, tyto dvě látky byly za horka rozpuštěny v 50 ml destilované vody. Roztok byl vysoce nasycen a tak velmi snadno krystalizoval. Bylo proto nutné před použitím vyloučené krystaly rozpustit v horké vodní lázni.

4.3.2 Vnitřní standardy 1,6-diaminohexan a 1,7-diaminoheptan

Pro analýzu bylo třeba namíchat vnitřní standardy, 1,6-diaminohexan pro analýzu 1 a 1,7-diaminoheptan pro analýzu 2. V metodice bylo uvedeno množství 2 g/l, pro naše účely nebylo třeba tak velkého množství, proto bylo přepočtem určeno množství 0,1 g/50ml. Vnitřní standardy poté byly přidávány do analyzovaných vzorků dle metodiky.

4.4 Laboratorní pomůcky a přístroje

4.4.1 Laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Mikro pipety
- Odpařovací baňky
- Injekční stříkačky
- Mikrofiltry SF 9011-10, 4 mm, nylon 0,22 μm Syringe filtre
- Vialky 300 μl

4.4.2 Laboratorní přístroje

- Ultrazvuková lázeň (Příloha 9)
- Analytické váhy (Příloha 10)
- Třepačka
- Rotační vakuová odparka (Příloha 11)
- HPLC (Příloha 8)
- Kolona HPLC Zorbax SB-C18 solvent saver 3,0 x 150 mm 5-Micron P.N.

4.5 Příprava standardů na analýzu

Pro pozdější vyhodnocení výsledků byla použita metoda vnějšího standardu neboli metoda kalibrační křivky. U této metody byly připraveny standardy předem vybraných biogenních aminů.

Nejdříve byly připraveny směsné standardy. Pro analýzu 1 směs obsahovala putrescin, kadaverin a tryptamin a pro analýzu 2 to byla směs histaminu a tyraminu.

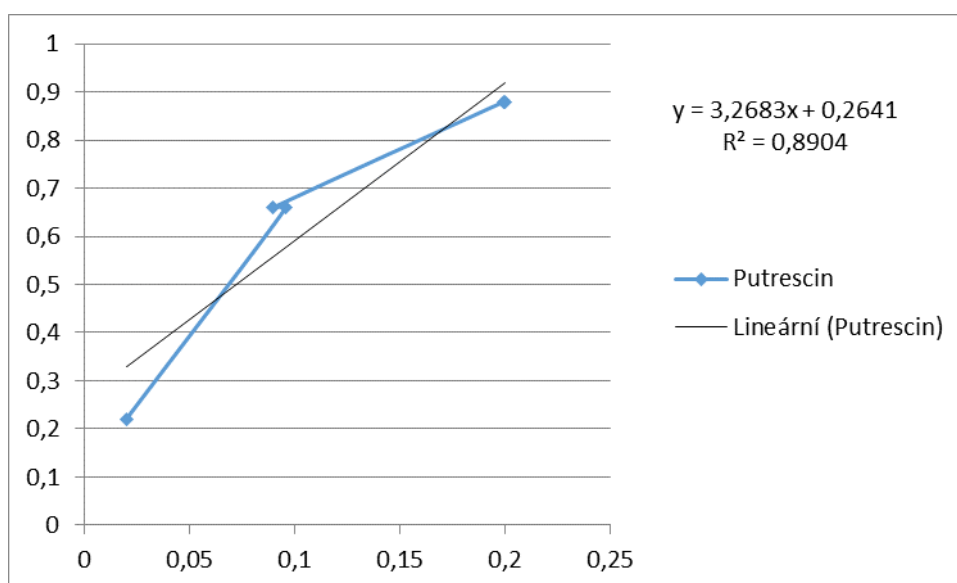
Následně byly připraveny jednotlivé standardy pro každý ze stanovovaných biogenních aminů. Navážka jednotlivých biogenních aminů se pohybovala okolo 0,1 g na 100 ml demineralizované vody (Tabulka 5). Následně bylo třeba připravit standardy v koncentracích 0, 2, 4, 6, 8 a 10 ml a doplnit je demineralizovanou vodou do objemu 40 ml v první analýze a do 35 ml ve druhé analýze.

Standardy byly připravovány stejnou metodou jako později analyzované vzorky piva. Pro putrescin, kadaverin a tryptamin to byla analýza jedna a pro histamin a tyramin se jednalo o metodiku analýzy dva. Obě metodiky jsou uvedeny níže.

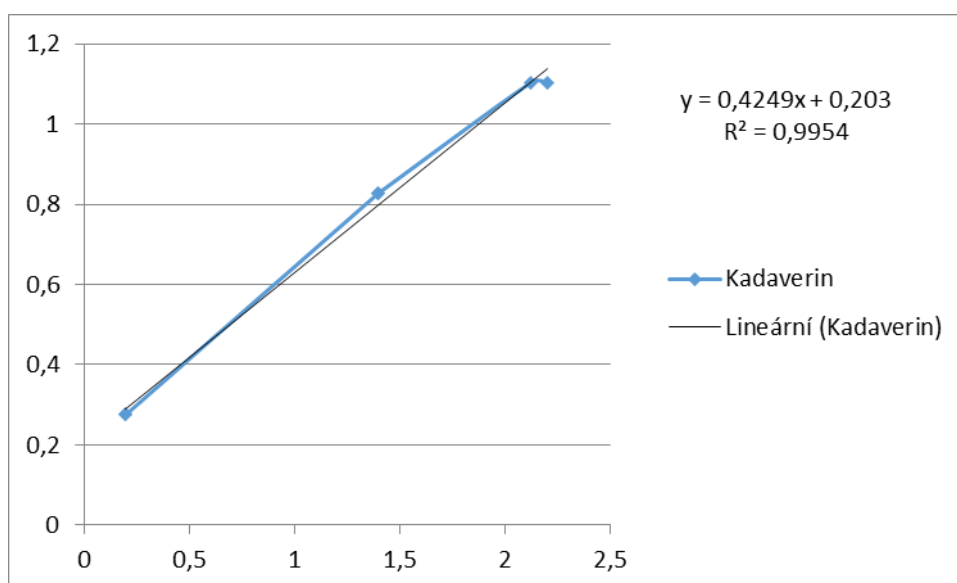
Tabulka 5 - Navážky jednotlivých aminů pro přípravu standardů

Sloupec1	Putrescin g/100ml	Kadaverin g/100ml	Tryptamin g/100ml	Histamin g/100ml	Tyramin g/100ml
Navážka	0,011	0,0138	0,0124	0,01008	0,0108

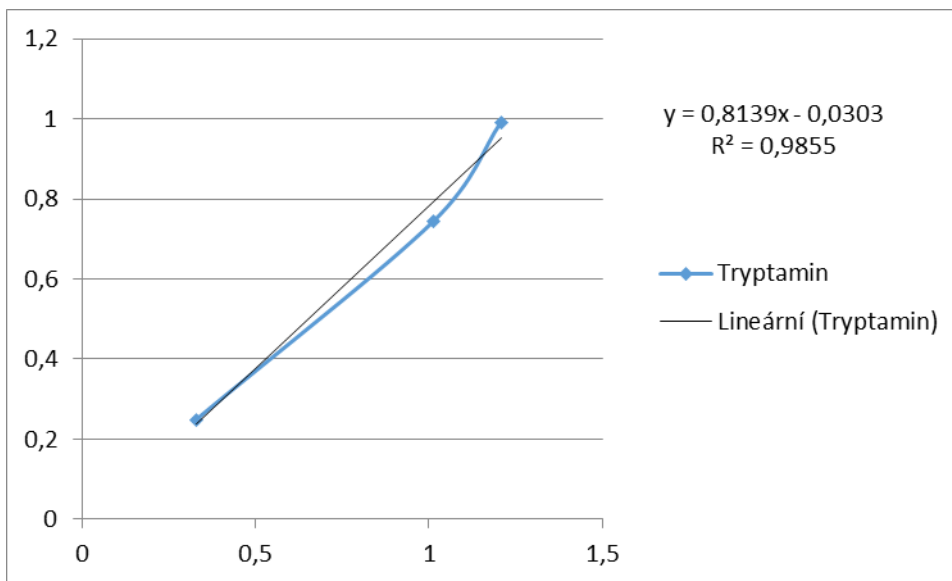
Graf 1 - Kalibrační křivka pro putrescin



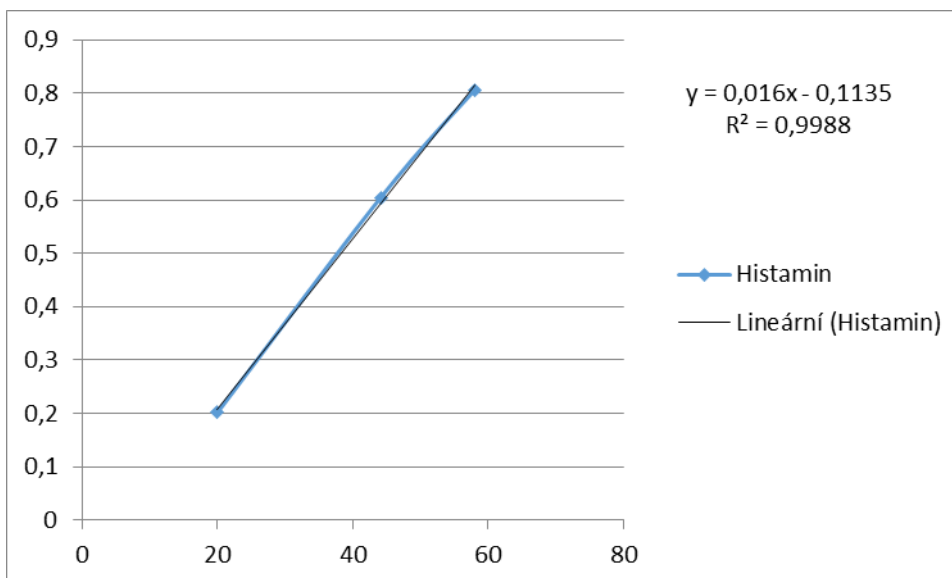
Graf 2 - Kalibrační křivka pro kadaverin



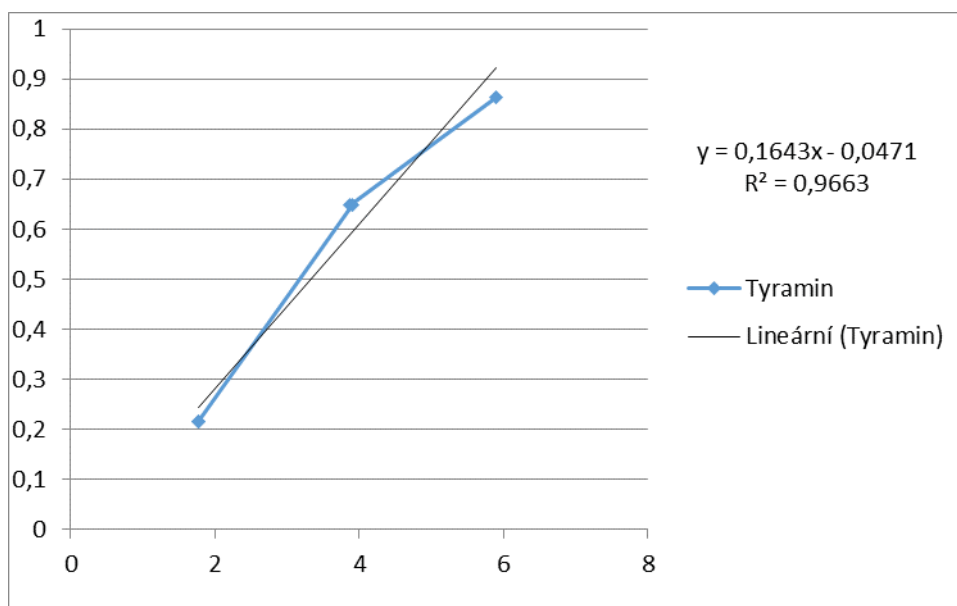
Graf 3 - Kalibrační křivka pro tryptamin



Graf 4 - Kalibrační křivka pro histamin



Graf 5 - Kalibrační křivka pro tyramin



4.6 Stanovení putrescinu, kadaverinu a tryptaminu

Prvním krokem bylo odplynění použitých vzorků piva v kádinkách v ultrazvukové lázni (Příloha 1), k jedné analýze bylo třeba 40 ml piva a vždy byl připravován vzorek ve dvou opakováních.

K 40 ml odplyněného piva bylo přidáno 0,25 ml vnitřního standardu 1,6-diaminohexanu, 2 ml NaOH a 0,3 ml benzoylchloridu. Míchání vzorku bylo prováděno v digestoři a se zvýšenou opatrností, kvůli benzoylchloridu, který je těkavý a žíravý.

Následně byl roztok vystaven intenzivnímu třepání, dle typu použitého laboratorního skla byl vzorek třepán na třepačce nebo ručně, v případě odměrné baňky se zábrusem byla použita třepačka, v případě odměrného válce se zábrusem bylo třepáno ručně, vždy po dobu 2,5 minut. Po vytřepání byl roztok umístěn do ultrazvukové lázně průměrně po dobu 5 minut.

Reakční směs, která prošla ultrazvukovou lázní, je nasycena 16 g NaCl (nadbytek). Po nasycení solí bylo přidáno 10 ml diethyletheru. Po vyčerení etherové fáze (Příloha 3 a 4) byl mikropipetou odebrán 1 ml etherového extraktu, který byl napipetován do odpařovací baňky pro rotační vakuovou odparku. Následně byl vzorek odpařován do sucha na rotační vakuové odparce, kdy byla vodní lázeň o teplotě 40 °C.

Každý odparek byl rozpuštěn v 300 µl mobilní fáze pro HPLC (Příloha 5) (63% [v/v] methanol v demineralizované vodě). Mobilní fáze byla pomocí injekční stříkačky přes mikrofiltr vstříknuta do vialky o objemu 300 µl a uzavřena víčkem (Příloha 6 a Příloha 7).

Následně byly vzorky zanalyzovány na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu, průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. UV/VIS detektor byl nastaven na 256 nm.

4.7 Stanovení histaminu a tyraminu

U druhé analýzy bylo třeba, stejně jako u první, odplynit vzorky piva v ultrazvukové lázni (Příloha 1). Pro druhou analýzu bylo třeba pouze 35 ml vzorku piva a každý vzorek byl připravován ve dvou opakováních.

Ke 35 ml vzorku piva bylo do odměrné baňky či válce přidáno 0,25 ml vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu, 2 ml NaOH a 0,3 ml benzoylchloridu. Míchání vzorku bylo prováděno v digestoři a se zvýšenou opatrností, kvůli benzoylchloridu, který je těkavý a žíravý.

Následně byl roztok vystaven intenzivnímu třepání, dle typu použitého laboratorního skla byl vzorek třepán na třepačce nebo ručně, v případě odměrné baňky se zábrusem byla použita třepačka, v případě odměrného válce se zábrusem bylo třepáno ručně, vždy po dobu 2,5 minut. Po vytřepání byl roztok umístěn do ultrazvukové lázně průměrně po dobu 5 minut.

Dále byl vzorek nasycen 16 g NaCl. Dle metodiky z Jihočeské univerzity bylo nutné upravit pH vzorku na hodnotu 6 přidáním koncentrované HClO₄. U každého vzorku bylo proto změřeno pH na pH-metru (Příloha 2), pH vzorků se pohybovalo v rozmezí 10,42 a 11,82. Vzorky byly jednotlivě přelity do kádinky, do vzorku byla ponořena elektroda pH metru, následně byla kádinka se vzorkem postavena na magnetickou míchačku a za stálého míchání magnetického míchadla byla do vzorku mikropipetou přidávána HClO₄, průměrná spotřeba potřebná k hodnotě pH 6 byla 950 µl.

Po dosažení požadovaného pH 6 byl vzorek kvantitativně převeden do odměrného válce se zábrusem či baňky se zábrusem a bylo přidáno 10 ml diethyletheru. Po vyčerpání etherové fáze (Příloha 3 a 4) bylo odebráno pipetou 5 ml etherového extraktu do odpařovací baňky. Vzorek byl odpařen, na rotační vakuové odparce o teplotě lázně 40 °C, do sucha. Následně byl odparek rozpuštěn ve 400 µl mobilní fáze pro HPLC, tentokrát o koncentraci 71 % methanolu v demineralizované vodě. Odparek byl odebrán injekční stříkačkou a poté přes mikrofiltr zfiltrován do vialky (Příloha 5 a Příloha 6). Vialka byla uzavřena víčkem (Příloha 7).

Následně byly vzorky zanalyzovány na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu, průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. UV/VIS detektor byl nastaven na 256 nm.

5 Výsledky

5.1 Výsledky stanovení putrescinu, kadaverinu a tryptaminu

Výsledné hodnoty z chromatografu bylo nutno přepočítat v závislosti na koncentraci připravených standardů.

Výsledné koncentrace putrescinu, kadaverinu a tryptaminu jsou uvedeny v následující tabulce. Zároveň můžeme vidět srovnání jednotlivých koncentrací biogenních aminů pro analyzované vzorky. V první analýze bylo měřeno celkem 32 vzorků pív, z toho 14 nepasterovaných a nefiltrovaných z minipivovarů a 16 vzorků pív pasterovaných a filtrovaných z velkých pivovarů.

Legislativa povoluje pro potraviny maximální množství putrescinu, kadaverinu a tryptaminu 100 mg/l. Velíšek a Hajšlová (2009) uvádějí hodnoty maximální hodnoty pro pivo, hodnoty jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 6 - Limitní hodnoty putrescinu, kadaverinu a tryptaminu pro pivo

Putrescin mg/l	Kadaverin mg/l	Tryptamin mg/l
31	49	10

V tabulce jsou modře zvýrazněny vzorky nepasterované a nefiltrované z minipivovarů. Barevně zvýrazněné hodnoty v tabulce poukazují na hodnoty, kde daný biogenní amin překročil maximální koncentraci v pivu, které uvádí Velíšek a Hajšlová (2009). Pouze u putrescinu byla jednou překročena maximální povolená koncentrace 100 mg/l, která je dána legislativou.

Tabulka 7 - Obsah putrescinu, kadaverinu a tryptaminu v analyzovaných pivech.

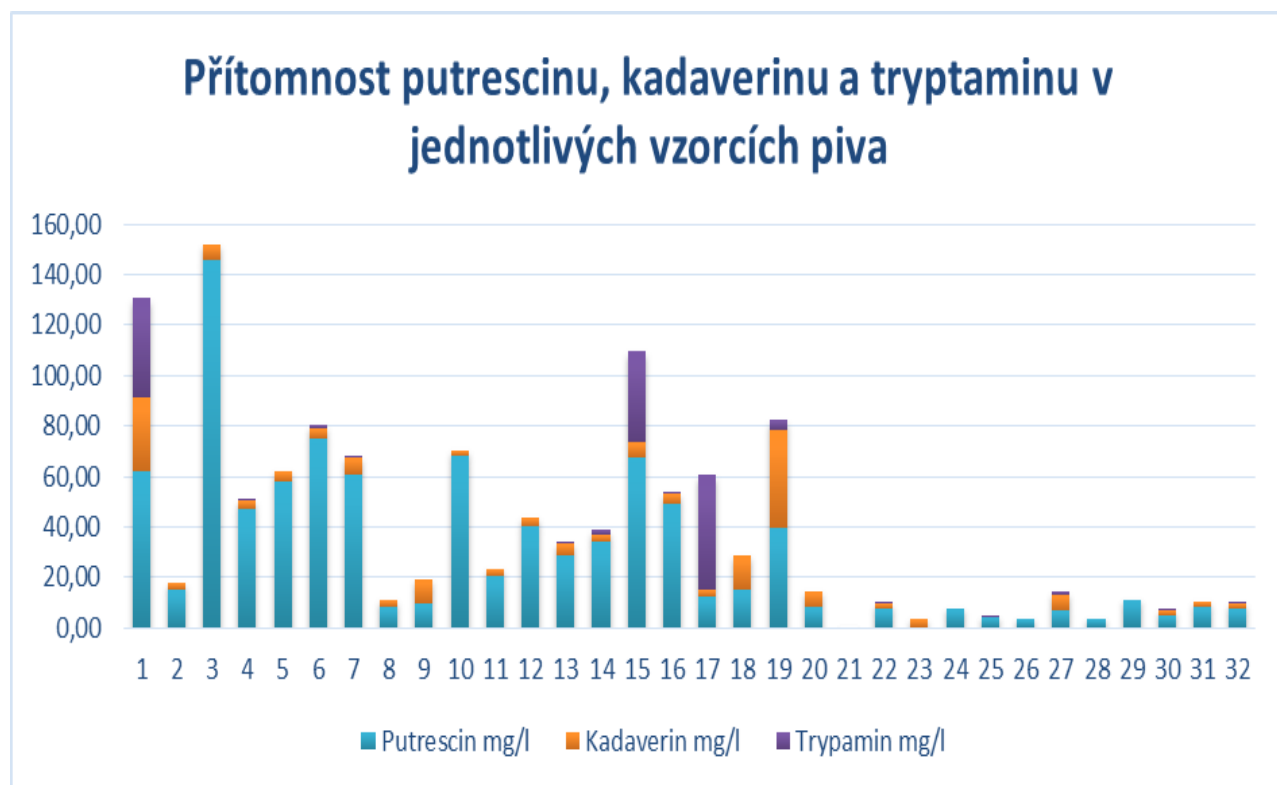
Vzorek	Putrescin mg/l	Kadaverin mg/l	Tryptamin mg/l
1	61,90	29,58	39,53
2	14,98	2,56	0,00
3	145,91	6,00	0,00
4	47,41	3,24	0,04
5	58,22	3,80	0,00

6	74,74	4,26	1,15
7	60,72	6,45	0,14
8	8,51	2,75	0,00
9	9,53	9,55	0,00
10	68,10	2,14	0,00
11	20,87	2,43	0,00
12	40,45	3,12	0,00
13	28,70	4,94	0,23
14	34,10	2,72	2,29
15	67,40	6,19	35,77
16	48,98	4,26	0,55
17	12,33	3,06	45,49
18	14,98	14,02	0,00
19	39,58	39,02	3,77
20	7,99	6,54	0,00
21	0,00	0,00	0,00
22	7,47	2,19	0,86
23	0,00	3,53	0,00
24	7,35	0,00	0,00
25	3,93	0,00	0,18
26	3,81	0,00	0,00
27	6,99	5,92	1,44
28	3,61	0,00	0,00
29	10,95	0,00	0,00
30	4,69	2,43	0,30
31	8,06	2,23	0,00
32	7,38	2,29	0,51
Průměr	29,05	5,48	4,13
Min	0,00	0,00	0,00
Max	145,91	39,02	45,49

Jak je vidět v tabulce a také v následujícím grafu, pouze u vzorku číslo 21 nebyl detekován ani jeden z biogenních aminů, jednalo se o vzorek nepasterovaný a nefiltrovaný

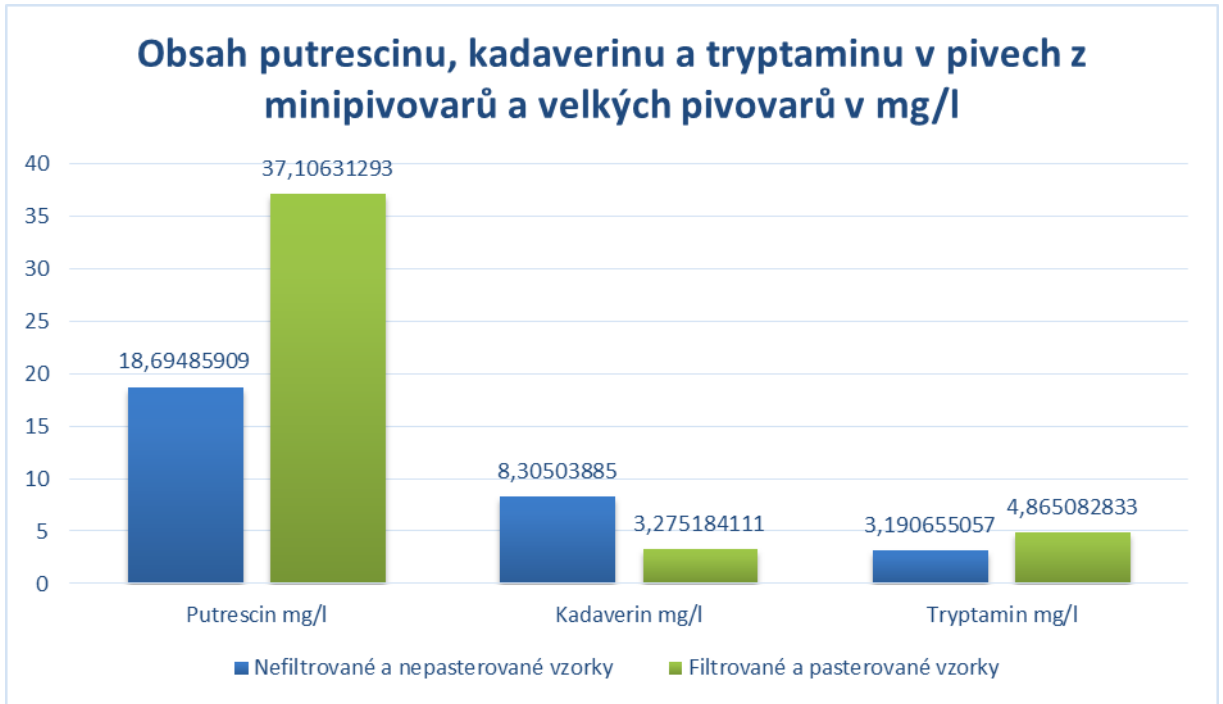
z minipivovaru, můžeme si být tedy jisti, že u tohoto minipivovaru používají prvotřídní suroviny na vaření piva, právě putrescin se primárně vyskytuje ve sladu. V ostatních analyzovaných vzorcích byl nalezen vždy alespoň jeden biogenní amin. Ve většině vzorků byl detekován putrescin, který poukazuje na kontaminaci sladu biogenními aminy.

Graf 6 - Obsah putrescinu, kadaverinu a tryptaminu v analyzovaných vzorcích piva

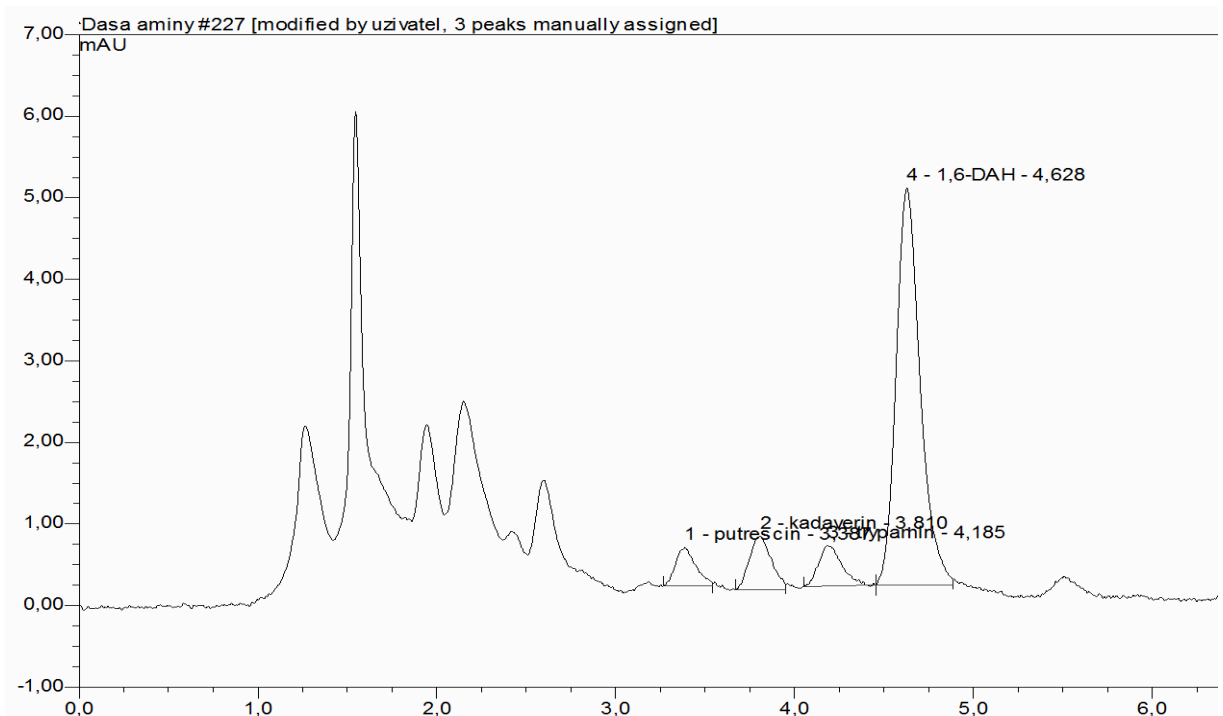


V následujícím grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty pro jednotlivé biogenní aminy z první analýzy. Je zde vidět srovnání mezi nepasterovanými a nefiltrovanými vzorky z minipivovarů se vzorky filtrovanými a pasterovanými z velkých pivovarů.

Graf 7 - Průměrné hodnoty putrescinu, kadaverinu a tryptaminu v pivech z minipivovarů a velkých pivovarů v mg/l



Obrázek 9- Ukázkový chromatogram z první analýzy (vzorek č. 30)



5.2 Výsledky stanovení histaminu a tyraminu

Ve druhé analýze byl stanovován histamin a tyramin. Tyto dva biogenní aminy byly hledány celkem ve dvaceti vzorcích, osm vzorků reprezentovalo piva nefiltrovaná a nepasterovaná z minipivovarů, zbylých dvanáct vzorků pocházelo z velkých průmyslových pivovaru a jednalo se o filtrovaná a pasterovaná piva.

Legislativa povoluje maximální koncentraci tyraminu 100 mg/l, u histaminu je pro pivo povoleno maximální množství 20 mg/l. Velíšek a Hajšlová (2009) také uvádějí maximální koncentrace pro pivo, hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 8 - Limitní hodnoty histaminu a tyraminu pro pivo

Histamin mg/g	Tyramin mg/l
22	68

V tabulce jsou modře zvýrazněné vzorky piv nepasterovaných a nefiltrovaných z minipivovarů. Pokud se podíváme na hodnoty v tabulce, můžeme si všimnout, že u žádného z analyzovaných piv nepřekročila maximální povolené hodnoty uváděné v literatuře.

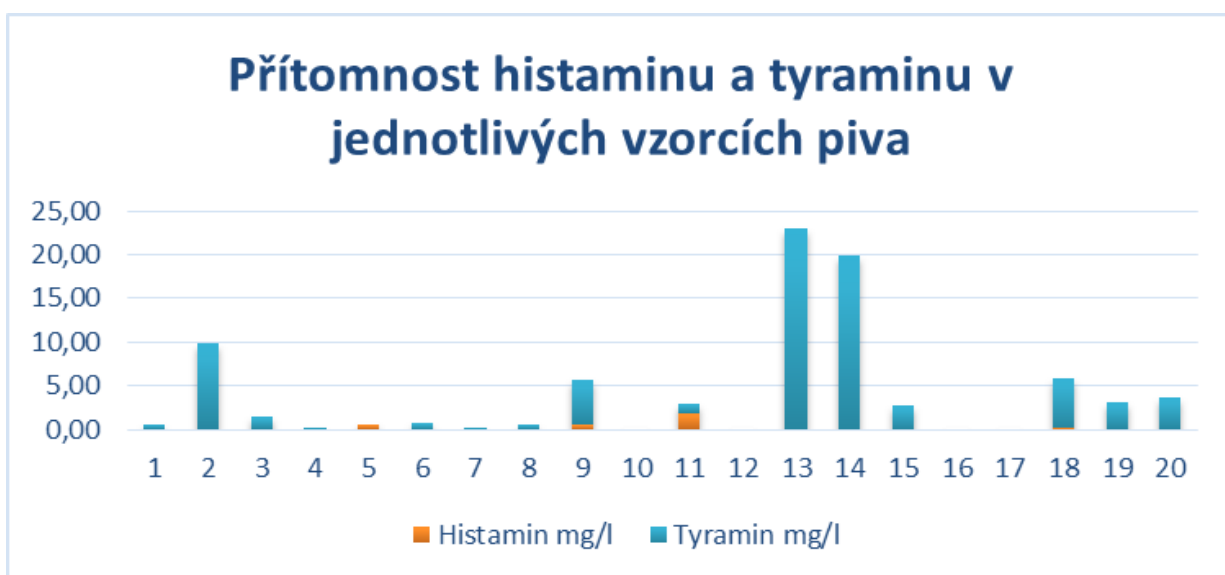
Tabulka 9 - Obsah histaminu a tyraminu v analyzovaných pivech

Vzorek	Histamin mg/l	Tyramin mg/l
1	0,00	0,59
2	0,00	9,85
3	0,00	1,50
4	0,00	0,24
5	0,66	0,00
6	0,00	0,74
7	0,00	0,21
8	0,00	0,57
9	0,63	5,01
10	0,00	0,00
11	1,82	1,20
12	0,00	0,00
13	0,00	23,06

14	0,00	19,86
15	0,00	2,77
16	0,00	0,00
17	0,00	0,00
18	0,19	5,69
20	0,00	3,12
21	0,00	3,75
Průměr	0,17	3,91
Min	0,00	0,00
Max	1,82	23,06

V tabulce a i následujícím grafu lze vidět, že histamin byl detekován pouze ve čtyř vzorcích piva. Pouze jeden ze vzorků, u kterých byl histamin nalezen, pocházel z velkého průmyslového pivovaru.

Graf 8 - Obsah histaminu a tyraminu v analyzovaných vzorcích piva



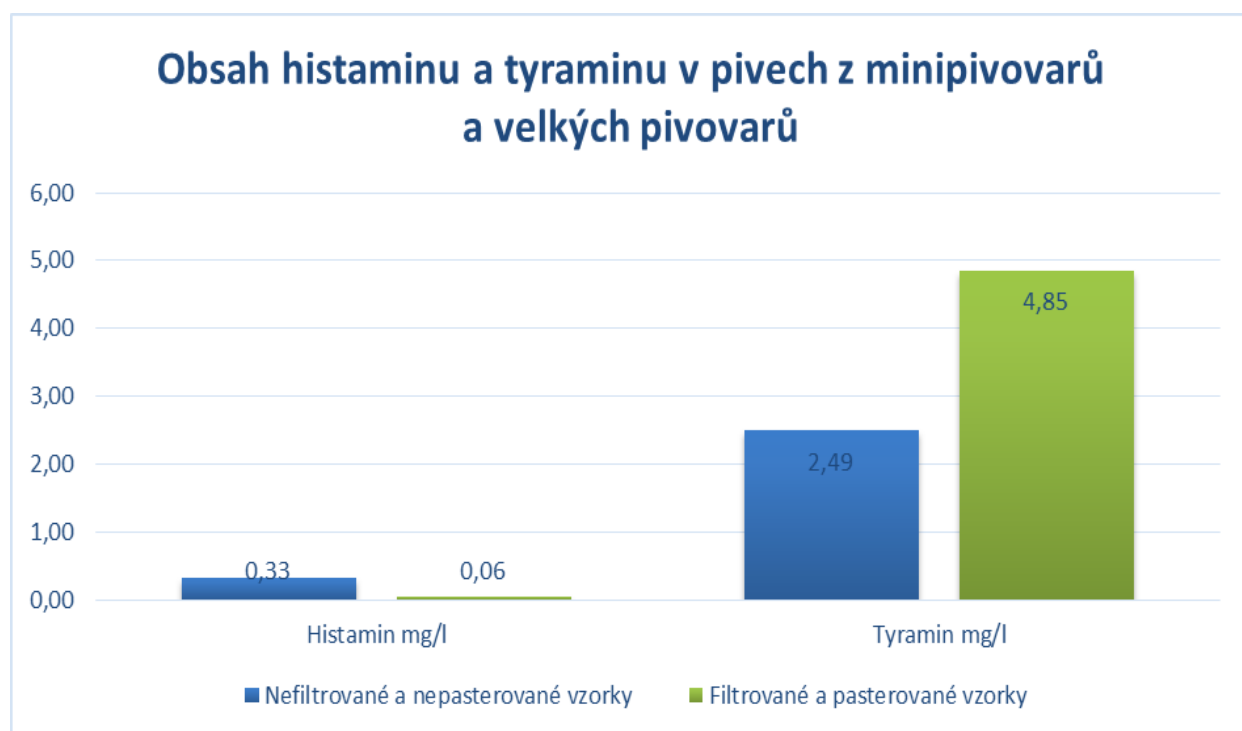
V následujícím grafu jsou vyobrazeny průměrné hodnoty histaminu a tyraminu, které byly stanovovány ve druhé analýze.

Histamin se v analyzovaných pivech vyskytoval ve velmi malých koncentracích, většinou nebyl ve vzorku ani detekován. Průměrná hodnota histaminu u piv nepasterovaných a nefiltrovaných z minipivovarů poukazuje na mírně vyšší kontaminaci histaminem než u piv

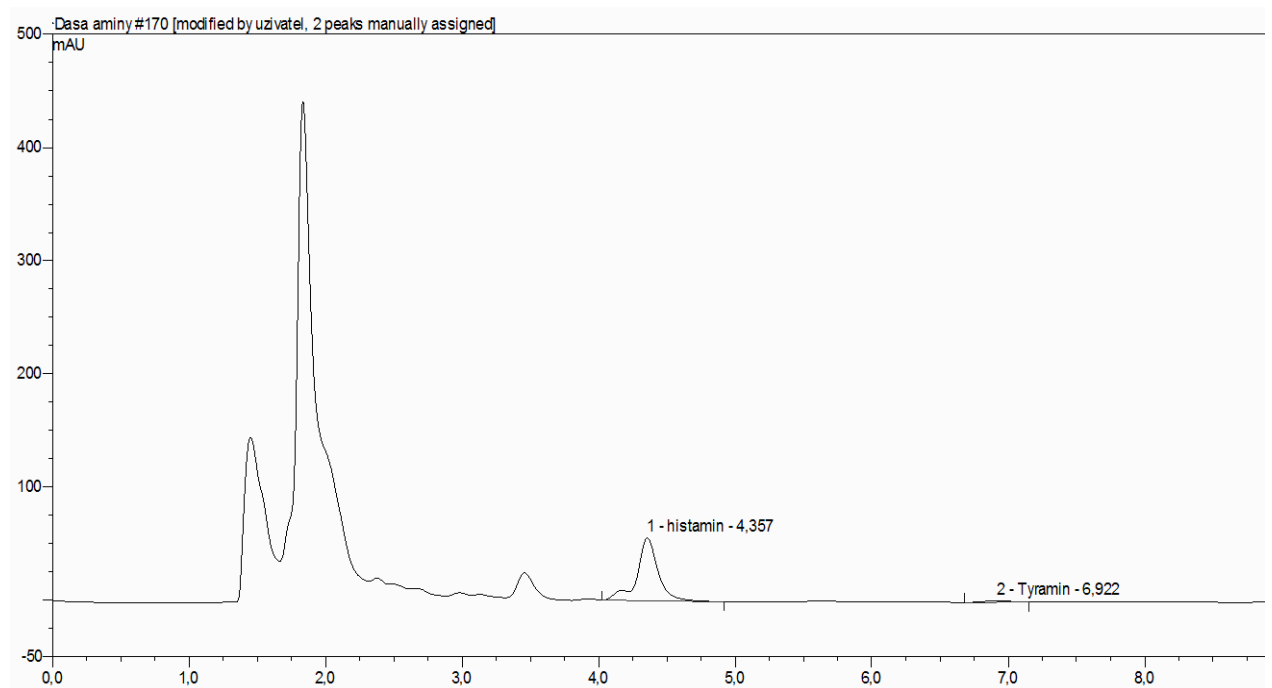
pasterovaných a filtrovaných z minipivovarů. U histaminu se tedy předpokládá, že v pivech z minipivovarů bude tohoto aminu více, potvrdil.

Tyramin se v analyzovaných vzorcích vyskytoval ve větším množství. Tyramin byl detekován ve více pivech než histamin. Průměrná hodnota tyraminu byla téměř o polovinu vyšší u vzorků pasterovaných a filtrovaných z velkých pivovarů oproti pivům nepasterovaným a nefiltrovaným z minipivovarů.

Graf 9 - Průměrné hodnoty histaminu a tyraminu v pivech z minipivovarů a velkých pivovarů v mg/l



Obrázek 10 - Ukázkový chromatogram z druhé analýzy (vzorek č. 4)



6 Diskuze

Získané hodnoty biogenních aminů byly srovnány s hodnotami uváděnými v literatuře. Dále byly porovnány průměrné hodnoty piv nepasterovaných a nefiltrovaných z minipivovarů s průměrnými hodnotami piv pasterovaných a filtrovaných z velkým průmyslových pivovarů.

U první analýzy se hypotéza, že bude vyšší obsah biogenních aminů u piv nepasterovaných a nefiltrovaných z minipivovarů potvrdila pouze u kadaverinu. U putrescinu byla průměrná hodnota poměrně vyšší, u tryptaminu se hodnoty příliš nelišily, ale stejně byla koncentrace vyšší u piv pasterovaných a filtrovaných z velkých pivovarů.

U druhé analýzy se hypotéza, že bude vyšší obsah biogenních aminů u nepasterovaných a nefiltrovaných piv z minipivovarů, potvrdila u histaminu. U tyraminu se předpoklad nepotvrdil, více byla kontaminována piva filtrovaná a pasterovaná z velkých průmyslových pivovarů.

Z hlediska negativních biologických účinků na lidský organismus je nejnebezpečnějším biogenním aminem histamin. Velíšek a Hajšlová uvádí maximální hodnotu pro histamin 22 mg/l, Kalač et al. (2003) uvádí maximální nalezenou koncentraci histaminu 21 mg/l. Obě tyto hodnoty přesahují množství povolené legislativou, která je 20 mg/l. Ve dvaceti analyzovaných vzorcích, osmi nepasterovaných a nefiltrovaných a dvanácti pasterovaných a filtrovaných, byl histamin detekován pouze u čtyř vzorků. Tři vzorky pocházely z tuzemských minipivovarů, pouze jeden byl z velkého průmyslového pivovaru. Žádná hodnota nepřekročila výše uvedené maximální hodnoty ani množství povolené legislativou. Nejvyšší naměřená hodnota byla 1,82 mg/l, jednalo se o vzorek z minipivovaru.

Srovnáme-li průměrné hodnoty piv nepasterovaných a nefiltrovaných s druhou skupinou piv pasterovaných a filtrovaných (Graf 9) je hodnota u první skupiny vyšší, to poukazuje na, i když malou, tak na aktivitu kontaminujících bakterií mléčného kvašení.

Dalším biogenním aminem, který představuje riziko pro lidský organismus, je tyramin. Maximální koncentrace tyraminu, kterou uvádí Velíšek a Hajšlová (2009) je 68 mg/l. Ani jeden ze vzorků nepřesáhl maximální uváděnou hodnotu. Nevyšší detekované množství (23,06 mg/l) patřilo vzorku z velkého pivovaru, stejně tak i druhá nejvyšší hodnota (19,86 mg/l).

Pokud srovnáme průměrné hodnoty (Graf 9), vidíme, že u analyzovaných piv pasterovaných a filtrovaných z velkých pivovarů je průměrná koncentrace tyraminu téměř dvakrát vyšší než u první skupiny. U piv z velkých pivovarů je kontaminace bakteriemi mléčného kvašení, které produkují tyramin, vyšší.

Putrescin je biogenní amin, který se vyskytuje ve sladu a dalších surovin. Na výrobu pív, které obsahovaly putrescin, byl použit zřejmě kontaminovaný slad. Dále mohlo dojít i k produkci putrescinu kontaminujícími bakteriemi jako *Enterobacter* a *Escherichia coli*. V analyzovaných vzorcích piva byl putrescin detekován ve třiceti případech. Ve dvanácti případech množství putrescinu překročilo maximální hodnotu, kterou uvádí Velíšek a Hajšlová (2009). Maximální přípustné množství udávané legislativou překročil pouze jeden vzorek. Jednalo se o pivo pasterované a filtrované z jednoho z největších tuzemských pivovarů. Srovnáme-li průměrné hodnoty pív nepasterovaných a nefiltrovaných s pivy pasterovanými a filtrovanými, vidíme velký rozdíl.

Průměrná hodnota pro piva filtrovaná a pasterovaná je téměř dvakrát větší než průměrná hodnota pro piva z minipivovarů (Graf 7). Velké průmyslové pivovary zřejmě používaly k výrobě těchto pív kontaminovaný slad.

Kadaverin byl detekován u dvaceti šesti vzorků. U žádného z vzorků nebyla překročena maximální hodnota, kterou uvádí Velíšek a Hajšlová (2009) a Kalač a Křížek (2003). Maximální přípustné množství udávané legislativou nepřekročil žádný ze vzorků. Přítomnost kadaverinu v pivu poukazuje na kontaminaci kvasnic nebo mladiny enterobakteriemi. Nejvyšší koncentrace kadaverinu byla detekována ve vzorku číslo devatenáct. Nefiltrované a nepasterované pivo z minipivovaru obsahovalo 39,02 mg/l kadaverinu. V tomto minipivovaru stále využívají tradiční dřevěné kvasné kádě. Sanitace těchto kádí je složitější a ne vždy je po vyčištění kád' úplně čistá. Je tedy možné, že právě v kvasných kádích dojde ke kontaminaci enterobakteriemi a tudíž k rozvoji kadaverinu. I když jsou dřevěné kvasné kádě tradiční, tak je jejich používání rizikové.

Průměrné množství kadaverinu v nepasterovaných a nefiltrovaných pivech z minipivovarů bylo více jak dvakrát větší než u pív filtrovaných a pasterovaných (Graf 7). Tento výsledek poukazuje na horší sanitaci kvasných kádí, kontaminaci mladiny a kvasnic v minipivovarech.

Posledním stanovovaným biogenním aminem byl tryptamin. Tento biogenní amin byl detekován pouze v patnácti vzorcích. Pouze u třech vzorků byla naměřeno větší množství tryptaminu. Všechny tři hodnoty výrazně převýšily maximální hodnotu, kterou udává Velíšek a Hajšlová (2009). U dvou vzorků se jednalo o piva z velkých průmyslových pivovarů. Jeden vzorek pocházel z minipivovaru. Pivo z tohoto minipivovaru mělo prošlou dobu minimální trvanlivosti, je tedy možné, že tato skutečnost ovlivnila množství tryptaminu detekované v tomto pivu.

Průměrná hodnota tryptaminu v pivech nepasterovaných a nefiltrovaných byla jen mírně nižší než u piv filtrovaných a pasterovaných (Graf 7). Pro obě skupiny piv byla průměrná hodnota méně než poloviční oproti hodnotě, kterou uvádí Velíšek a Hajšlová (2009). Tryptamin se v potravinách a v pivu celkově příliš nevyskytuje ve velkém množství, proto tyto hodnoty nejsou příliš překvapující.

7 Závěr

Pivo by se dalo považovat za tradiční tuzemský nápoj a jeho pití přináší bezesporu řadu pozitiv. Konzumenti pitím piva „hasí žízeň“, obsahuje totiž více jak 90 % vody. Díky obsahu hořkých látek z chmele má pivo uklidňující účinek. Pivo má také vysokou nutriční hodnotu vzhledem k obsahu sacharidů, aminokyselin, vitamínů a polyfenolických látek. V dietetice má tento nápoj význam, stimuluje chuť k jídlu, trávení a podporuje diuretiku. Pití piva v umírněném množství má příznivé účinky na lidský organismus.

Vedle příznivých účinků může pivo i škodit lidskému organismu. Je proto nutné kontrolovat množství cizorodých látek, které se v pivu mohou vyskytovat. Sledování biogenních aminů v pivu je velmi důležité z toxikologického a i z technologického hlediska.

V praktické části této diplomové práce bylo analyzováno třicet dva světlých spodně kvašených piv z minipivovarů a velkých průmyslových pivovarů. Stanovováno bylo pět vybraných biogenních aminů, histamin, tyramin, tryptamin, kadaverin a putrecin. Ukázalo se, že nepasterovaná a nefiltrovaná piva z minipivovarů se kvalitativně mohou rovnat pivům pasterovaným a filtrovaným z velkých průmyslových pivovarů, které jsou podrobovány důkladnější kontrole a mají i lepší technologické vybavení. U piv z minipivovarů bylo nalezeno průměrně méně biogenních aminů než u piv z velkých průmyslových pivovarů. Tato piva jsou tedy, z hlediska výskytu biogenních aminů, pro lidský organismus méně toxická. Technologie, sanitace a i výběr surovin v minipivovarech je tedy na dobré úrovni.

8 Seznam použité literatury a zdrojů

ANLI, R. E., VURAL, N., YILMAZ, S., VURAL, H., 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 53 – 62

BACK, W., 2009. *Brauerei und Getränke Rundschau*. Firemní materiály firmy Döhler Quality Service, GmbH, SRN.

BASAŘOVÁ, G., HLAVÁČEK, I., 1999. *České pivo*, 2. vydání., Praha: Nuga. ISBN 80-85903-08-3

BASAŘOVÁ G., ŠAVEL J., BASAŘ P., LEJSEK T., 2010. *PIVOVARSTVÍ: Teorie a praxe výroby piva*. Vydavatelství VŠCHT Praha, Technická 5, 166 26 Praha 6. ISBN 987-80-7080-734-7

BENDO VÁ, O., KAHLER, M., 1989. *Pivovarské kvasinky*, SNTL

BUŇKA, F., BUDINSKÝ, P., ČECHOVÁ, M., DRIENOVSKÝ, V., PACHLOVÁ, V., MATOULKOVÁ D., KUBÁŇ, V., BUŇKOVÁ, L., 2012. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(2): 213 – 216.

CORRAO, C., RUBBIATI, L., BAGNARDI V., ZAMBON, A., POIKOLAINE, K., 2000. Alcohol and coronary heart disease: a meta analysis. *Addiction*, 95(10): 1505 – 1523.

CREA, F., DE STEFANO, C., MANFREDI, G., SAMMARTANO, S., 2010. Sequestration of some biogenic amines and poly(allyl)amine by high molecular weight polycarboxylic ligands in aqueous solution, *Journal of Molecular Liquids*, 151, 138 – 144

DICKINSON, J. R., 2008. Filament formation in *Sacharomyces cerevisiae* – a review, *Folia Microbiology*.

ERZETTI, M., MARCONI, O., BRAVI, E., PERRETTI, G., MONTANARI, L., FANTOZZI, P., 2009. *HACCP IN THE MALTING AND BREWING PRODUCTION*

CHAIN: MYCOTOXIN, NITROSAMINE AND BIOGENIC AMINE RISKS, Italian Journal Food Science. n. 2, vol. 21 - 2009, p. 211-230, CHIRIOTTI EDITORI.

GASTL, M., SCHNEIDER, R., BACK, M., 2009. Minimizing NDMA-contamination in malt and beer. *Brauwelt Int.* 27(5), 282-287.

GORDON, M. H., 1996. Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Products Reports*, 265, 273.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science & Technology*, 5, 42 – 49.

HOUGH, J. S., BRIGGS, D. E., STEVENS, R., YOUNG, T. W., 1982. *Malting and Brewing Science, Vol. 2, Hopped Worth and Beer*. London: Chapman and Hall, ISBN 0-41216590-2.

KALÁČ, P., ŠAVEL, J., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. & PROKOPOVÁ, M., 2002. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food chemistry*, 79, 431 - 434

KALÁČ, P., KŘÍŽEK, M., 2003. A Review of biogenic amines and polyamines in beer; *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2); 123 – 128.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z., 2005. Biogenic amines in Food, *Chemical Papers*, 59, 70 – 79.

KLOUDA, P., 2003. *Moderní analytické metody*. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 132 s., ISBN 80-86369-07-2.

KOPECKÁ, J., MATOULKOVÁ, D., NĚMEC, M., 2012. Kvasinky a jejich využití. *Kvasný Průmysl*. 58(11-12): 326-335.

KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. et al., 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. 3. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. ISBN 80-902658-6-3.

KUNZE, W., 1994. Technologie Bauer und Mälzer, 7. vydání, VLB Berlin, 633 s. ISBN 3-921 690-31-5

LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F., 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer, *International Journal of Food Science and Technology*. 47, p. 2086–2091

MARINO, M., MAIFRENI, M., BARTOLOMEOLI, I., RONDINI, G., 2008. Evaluation of acid-decarboxylative microbiota through the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 540 – 549

MOLL, M., 1994. Beer & Coolers, Andover, Hampshire, Intercept Ltd, 495 s. ISBN 1-898298-2

NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., 2013. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vydání, Praha: Europrint a.s. ISBN 978-80-260-4243-3

OLŠOVSKÁ, J., MATOULKOVÁ, D., ČEJKA, P., JURKOVÁ, M., 2014, Pivo a zdraví, *Kvasný průmysl*, 60 (7-8), p. 174-181

ÖNAL, A., 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, 103, 1475 – 1486

OTŘÍŠAL, P., STÁVEK, J., Je nutné bát se biogenních aminů ve víně?, dostupné na <<http://www.enolog.cz/je-nutne-bat-se-biogennich-aminu-ve-vinech>> (cit. 1. 3. 2016).

PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L., 2001. Jakost a zpracování rostlinných produktů. České Budějovice: Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 235 s. ISBN 80-7040-502-3

POLI, A., MARANGONI, F., AVOGARO, A., BARBA, G., BELLENTANI, S., BUCCI, M., CAMBIERI, R., CATAPANO A. L., CONSTANZO, S., CRICELLI, C., DE GAETANO, G., DI CASTELNUOVO, A., FAGGIANO, P., FATTIROLI, F., FONTANA, L., FORLANI, G., FRATTINI, S., GIACCO, R., LA VECCHIA, C., LAZZARETTO, L., LOFFREDO, L., LUCCHIN, L., MARELLI, G., MAROCCO, W., MINISOLA, S., MUSICCO, M., NOVO, S., NOZZOLI, C., PELUCCHI, C., PERRI, L., PIERALLI, F., RIZZONI, D., STERZI, R., VETTOR, R., VIOLI, F., VISIOLI, F., 2013. Moderate alcohol use and health: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(6): 487 – 504.

POLLAKOVÁ, E., 2010, Vlivy působící na produkci biogenních aminů u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

SHALABY, A. R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International* 7, vol. 29, 675 – 690

SILLA SANTOS, M. H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods; *International Journal of Food Microbiology*, 26, 213 – 231

SMIT, A.Y., du TOIT, W.J., du TOIT, M., 2008. Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache, *South African Journal of Enology & Viticulture*, 109 – 127

SUZZI, G., GARDINI, F., 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41 – 54

TANG, T., SHI, T., QIAN, K., LI, P., LI, J., CAO, Y., 2009. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*. 877, p. 507–512

TRIAS MANSILA, R., 2008. Lactic bacteria as bioprotect agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. Disertační práce, Universitat de Girona, 109 s. ISBN: 987-84-691-5683-4

VEČERKOVÁ, H., KISS, J., 2007. *Abeceda piva*, Edice ČT, Praha. ISBN 978-80-85005-86-8

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., 2009. Chemie potravin II. 3. vydání. Havlíčkův Brod: OSSIS. ISBN 987-80-86659-16-9.

VEVERKA, J., 2012, Biogenní aminy v hroznech révy vinné a ve víně, Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta.

Zákon č. 110/1997 sb. o potravinách a tabákových výrobcích a změně a doplnění některých souvisejících zákonů, v platném znění

9 Seznam zkratek

KEG – válcový transportní sud

PET – polyethylentereftalát

EPM – extrakt původní mladiny

BA – biogenní aminy

HPLC – high performance liquid chromatography

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Chemické složení chmele publikované různými autory.....	8
Tabulka 2 - Biogenní aminy, jejich prekurzorové aminokyseliny a biologický význam.	20
Tabulka 3 - Obsah biogenních aminů v pivech z minipivovarů (monitoring 2011).....	29
Tabulka 4 - Anonymní seznam vzorků piv z minipivovarů a velkých pivovarů.....	35
Tabulka 5 - Navážky jednotlivých aminů pro přípravu standardů	38
Tabulka 6 - Limitní hodnoty putrescinu, kadaverinu a tryptaminu pro pivo.....	42
Tabulka 7 - Obsah putrescinu, kadaverinu a tryptaminu v analyzovaných pivech.	42
Tabulka 8 - Limitní hodnoty histaminu a tyraminu pro pivo	46
Tabulka 9 - Obsah histaminu a tyraminu v analyzovaných pivech	46

11 Seznam grafů

Graf 1 - Kalibrační křivka pro putrescin.....	38
Graf 2 - Kalibrační křivka pro kadaverin.....	38
Graf 3 - Kalibrační křivka pro tryptamin.....	39
Graf 4 - Kalibrační křivka pro histamin.....	39
Graf 5 - Kalibrační křivka pro tyramin.....	40
Graf 6 - Obsah putrescinu, kadaverinu a tryptaminu v analyzovaných vzorcích piva	44
Graf 7 - Průměrné hodnoty putrescinu, kadaverinu a tryptaminu v pivech z minipivovarů a velkých pivovarů v mg/l	45
Graf 8 - Obsah histaminu a tyraminu v analyzovaných vzorcích piva.....	47
Graf 9 - Průměrné hodnoty histaminu a tyraminu v pivech z minipivovarů a velkých pivovarů v mg/l.....	48

12 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Druhy pivovarských sladů	6
Obrázek 2- Chmelová hlávka s listem	7
Obrázek 3- Strukturní vzorec histaminu	26
Obrázek 4- Strukturní vzorec putrescinu	26
Obrázek 5- Strukturní vzorec tyraminu	27
Obrázek 6- Strukturní vzorec tryptaminu	28
Obrázek 7- Strukturní vzorec kadaverinu	28
Obrázek 8- Schéma HPLC.....	31
Obrázek 9- Ukázkový chromatogram z první analýzy (vzorek č. 30).....	45
Obrázek 10 - Ukázkový chromatogram z druhé analýzy (vzorek č. 4)	49

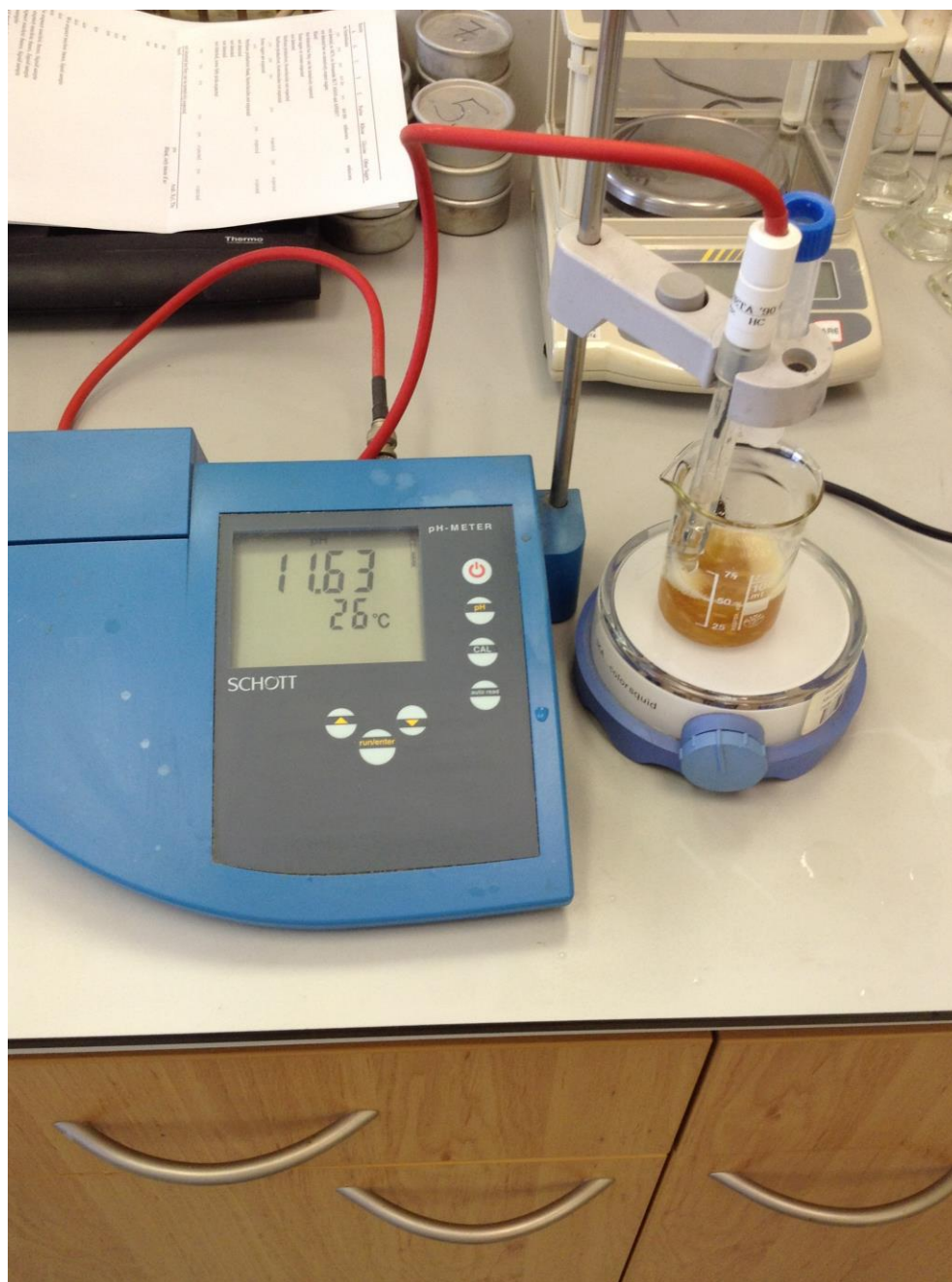
13 Seznam příloh

Příloha 1 - Odplyňování vzorků piva v ultrazvukové lázni	64
Příloha 2 - Měření pH vzorku u druhé analýzy	65
Příloha 3 - Vyčerená etherová fáze v odměrné baňce	66
Příloha 4 - Vyčerená etherová fáze v odměrném válci se zábrusem	67
Příloha 5 - Odběr rozpuštěného odparku z odpařovací baňky	68
Příloha 6 - Filtrace rozpuštěného odparku přes mikrofiltr do vialky	69
Příloha 7 - Vzorek připravený na HPLC analýzu	70
Příloha 8 - Kapalinový chromatograf	71
Příloha 9 - Ultrazvuková lázeň	72
Příloha 10 - Analytické váhy	73
Příloha 11 - Rotační vakuová odparka	74

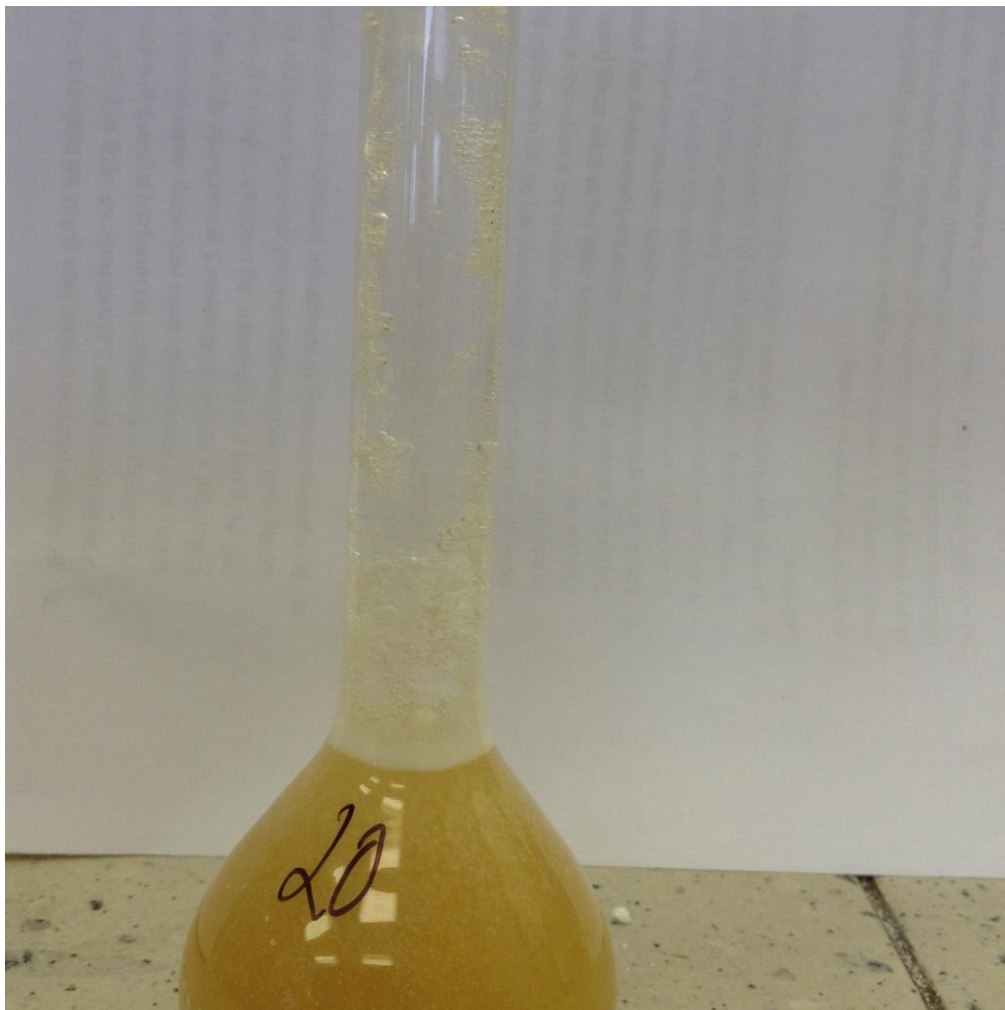
Příloha 1 - Odplyňování vzorků piva v ultrazvukové lázni



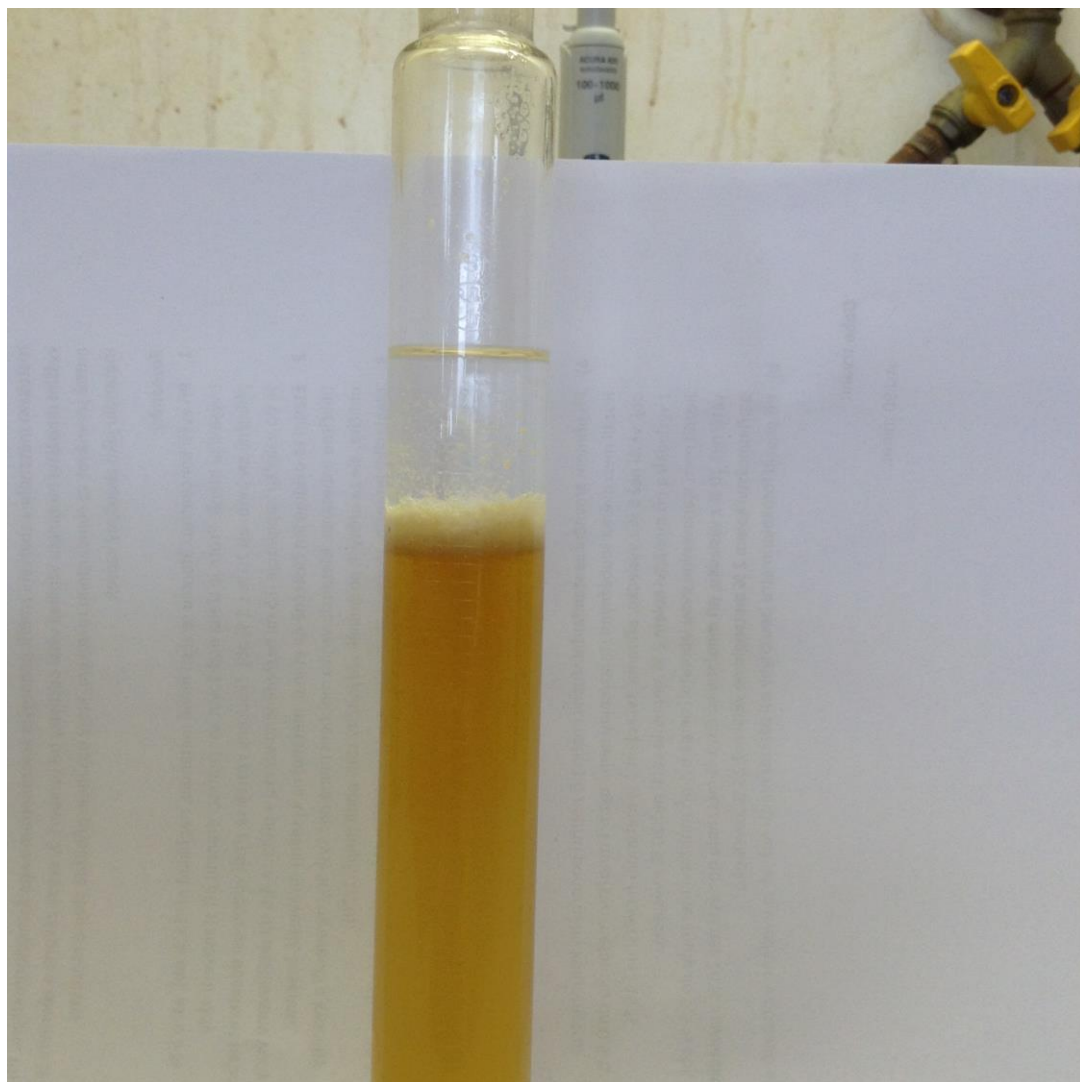
Příloha 2 - Měření pH vzorku u druhé analýzy



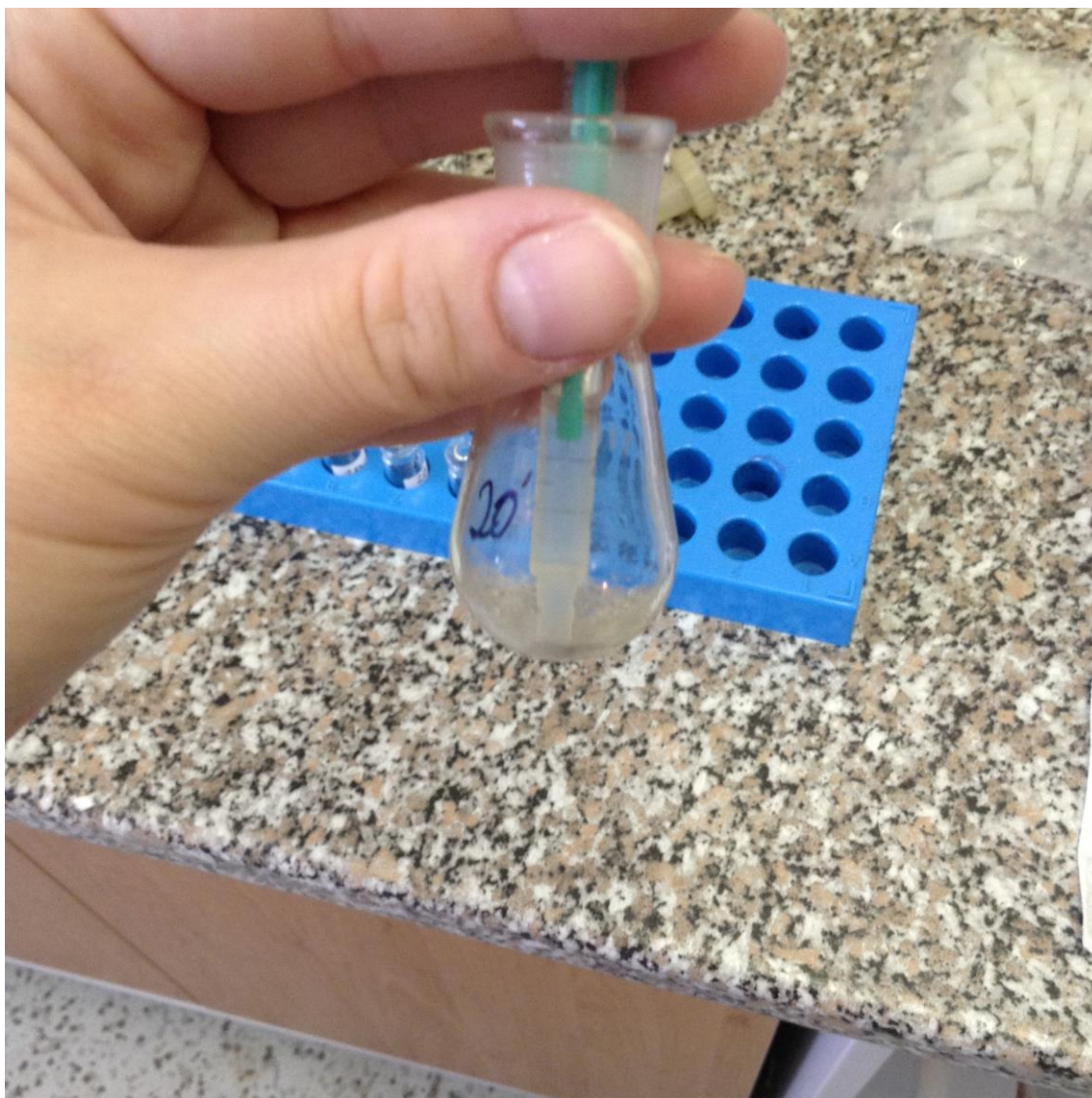
Příloha 3 - Vyčeřená etherová fáze v odměrné baňce



Příloha 4 - Vyčěřená etherová fáze v odměrném válci se



Příloha 5 - Odběr rozpuštěného odparku z odpařovací baňky



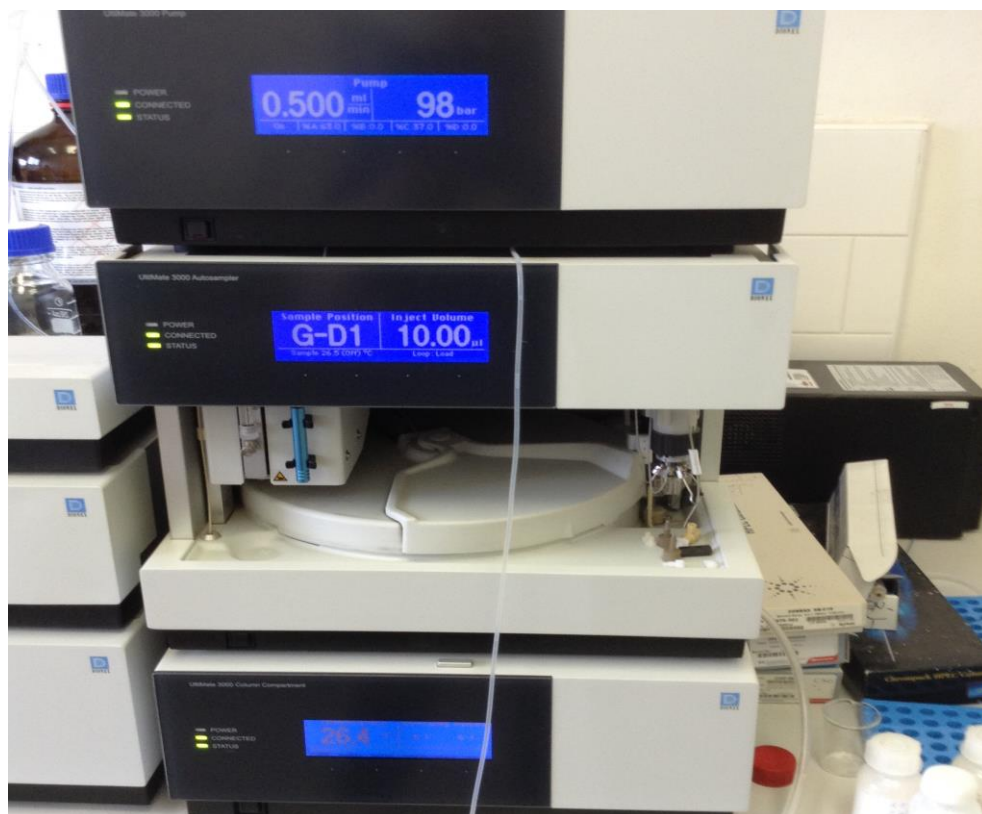
Příloha 6 - Filtrace rozpuštěného odparku přes mikrofiltr do vialky



Příloha 7 - Vzorek připravený na HPLC



Příloha 8 - Kapalinový chromatograf



Příloha 9 - Ultrazvuková lázeň



Příloha 10 - Analytické váhy



Příloha 11 - Rotační vakuová odparka

