



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra aplikované chemie

Bakalářská práce

Biogenní aminy v produktech minipivovarů

Autorka práce: Michaela Symonová

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Kateřina Matějková, Ph.D.

České Budějovice
2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá obsahem biogenních aminů (BA) v pivech vybraných minipivovarů z jižních Čech, kde jsou pro porovnání použita i piva z komerčních pivovarů. Tato práce je rozdělena na dvě části. První, teoretická část, je zaměřena na představení pivovarnictví, postup výroby piva, rozdílu v postupu výroby v minipivovarech a jejich charakteristice. Dále je v ní vysvětleno, co jsou BA a jejich jednotlivé představení. Druhá polovina této práce je zaměřená na experimentální část, kde je představena metodika práce, stanovení a vyhodnocení obsahu BA v jednotlivých vzorcích piv. Dále je také představena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UPLC), kterou byl stanovován obsah jednotlivých BA ve vzorcích piv. Následně jsou uvedeny výsledky experimentu a diskuse s porovnáním výsledků této práce s výsledky jiných studií stejně zaměřených.

Klíčová slova:

pivovarnictví, minipivovar, pivo, fermentované potraviny, biogenní aminy, UPLC, histamin, tryptamin, 2-fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin, spermin.

Abstract

The bachelor thesis deals with biogenic amines (BA) content in beers of selected microbreweries from South Bohemia, where beers from commercial breweries are also used for comparison. This thesis is divided into two parts. The first, theoretical part, is focused on introducing the brewing industry, the process of beer production, the difference in the production process in microbreweries and their characteristics. It also explains what BAs are and their different presentation. The second half of this thesis is focused on the experimental part, where the methodology of the work, determination and evaluation of BA content in different beer samples is presented. The ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method by which the content of individual BAs in beer samples was determined is also presented. Subsequently, the results of the experiment are presented and a discussion with a comparison of the results of this work with the results of other studies of the same focus is presented.

Keywords:

brewing, microbrewery, beer, fermented foods, biogenic amines, UPLC, histamine, tryptamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, tyramine, spermidine, spermine.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. a konzultantce Ing. Kateřině Matějkové, Ph.D. za všestrannou pomoc, množství přínosných rad a doporučení. Za poskytnuté odborné materiály, připomínky a zároveň velkou trpělivost při realizaci experimentu v laboratoři. Hlavně bych chtěla poděkovat za ochotu při konzultacích ke zpracování této práce.

Obsah

Úvod.....	8
1 Pivovarnictví	9
2 Technologie výroby piva.....	10
2.1 Pivovarské slady	10
2.2 Chmel	12
2.3 Voda	13
2.4 Mladina a její příprava	14
2.4.1 Šrotování	14
2.4.2 Vystírání	15
2.4.3 Rmutování	15
2.4.4 Scezování	16
2.4.5 Vaření sladiny s chmelem – chmelovar	16
2.4.6 Zchlazení mladiny a odstranění kalů.....	17
2.5 Pivovarské kvasinky	17
2.6 Kvašení mladiny a dokvašování piva.....	18
2.7 Závěrečné úpravy piva	19
2.8 Stáčení a expedice	20
3 Charakteristika minipivovarů.....	21
4 Biogenní aminy obecně.....	22
4.1 Biologické účinky BA.....	22
4.2 Biogenní aminy a pivo	23
4.3 Vlastnosti vybraných biogenních aminů.....	24
4.3.1 Tryptamin.....	24
4.3.2 2-Fenylethylamin	25
4.3.3 Putrescin.....	26
4.3.4 Kadaverin	27

4.3.5	Histamin	27
4.3.6	Tyramin	28
4.3.7	Spermidin a spermin	29
5	Analytické možnosti pro stanovení biogenních aminů v potravinách	31
5.1	Kapilární elektroforéza.....	31
5.2	Kapalinová chromatografie.....	31
6	Cíle práce	33
7	Experimentální část.....	34
7.1	Použité chemikálie, přístroje a zařízení	34
7.2	Příprava vzorků k měření	35
7.2.1	Výběr a označení vzorků.....	35
7.2.2	Příprava kalibrační řady:	36
7.2.3	Derivatizace.....	36
7.2.4	Stanovení a vyhodnocení obsahu biogenních aminů	38
8	Výsledky a diskuse.....	42
9	Závěr	50
10	Přehled použité literatury	52
	Seznam obrázků	57
	Seznam tabulek	58
	Seznam použitých zkratk.....	59

Úvod

Biogenní aminy (BA) jsou zásadité dusíkaté sloučeniny vznikající při dekarboxylaci aminokyselin, nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Formálně jsou odvozené od amoniaku náhradou jednoho (primární aminy), dvou (sekundární aminy) nebo tří (terciální aminy) vodíků za alkylovou nebo arylovou skupinu. Tyto aminy mají biologický význam v rostlinách, mikrobiálních, a i živočišných buňkách. BA jsou pro lidský organismus nepostradatelné, jelikož jsou pro tělo zdrojem dusíku, jsou prekurzory hormonů nebo působí v organismu jako samostatné hormony. Můžou být zjištěny v syrových, ale i zpracovaných potravinách a nápojích rostlinného i živočišného původu. BA v potravinách a nápojích vznikají v důsledku mikrobiální dekarboxylace aminokyselin, jak je již zmíněno. Dle chemické struktury je lze rozdělit na alifatické, aromatické, heterocyklické aminy a polyaminy (PA). Všeobecně mohou být BA a PA nalezeny v celé řadě druhů potravin a nápojích. Nejvíce však mohou být nalezeny ve fermentovaných výrobcích, jako je pivo, víno, sýry či jiné. Tato práce je však zaměřena na obsah BA v pivech minipivovarů z jižních Čech.

Pivovarnictví je jeden z nejstarších oborů lidské technologie sahající hluboko do historie života u nás. Proces výroby piva se postupem času ustálil na jednotnou formu. Jediný zásadní rozdíl je v postupu výroby piv z minipivovarů. Klasický postup výroby piva zahrnuje šrotování sladu, vystírání, rmutování, scezování, vaření sladiny s chmelem (chmelovar), zchlazení mladiny a odstranění kalů, kvašení mladiny a dokvašování piva a závěrečné úpravy piva jako je filtrace a pasterace. Po dokončení postupu výroby se pivo stáčí a expeduje. Proces výroby piva v minipivovarech je v základu stejný, pouze na konci nedochází k závěrečným úpravám, ale pivo se rovnou stáčí a expeduje.

Ke stanovení obsahu BA v této práci byla použita metoda UPLC s pomocí předchozí derivatizace dansylchloridem. Mezi nejčastěji vyskytované BA ve fermentovaných potravinách patří TRM, PEA, PUT, CAD, HIS, TYM, SPD a SPM. Ovšem v našich vzorcích piv z minipivovarů jižních Čech byly stanoveny pouze PUT, CAD, TYM, SPD a SPM. Obsah TRM, PEA a HIS byl ve všech případech pod mezí stanovitelnosti metody. Průměrné koncentrace stanovených BA se pohybovaly v rozmezí: PUT 2,70–5,05 mg/l, CAD 1,01–2,33 mg/l, TYM 3,67–5,28 mg/l, SPD 0,45–0,95 mg/l a SPM 5,36–7,18 mg/l.

1 Pivovarnictví

Pivovarnictví je jeden z nejstarších oborů lidské technologie sahající hluboko do historie života u nás. V Mezopotámii, zemi považované za kolébku pivovarství, se zhruba již 7 000 let před naším letopočtem pěstovaly různé obiloviny (ječmen, pšenice, proso apod.) pro výrobu chleba, ale zřejmě i kvašených nápojů, jakožto předchůdců dnešního piva.

Výroba piva se rozvíjela od velice primitivních postupů, kdy se využívalo nejen jako nápoj, ale i jako přísada do pokrmů, přes řemeslné výroby až po dnešní novodobé technologie, které sládcí pořád vylepšují a zkoušejí nové metody a přísady.

Velký pokrok v poznání složitých chemických, fyzikálních a biochemických procesů probíhajících při výrobě piva i postupné zdokonalování znalostí mikrobiálních producentech piva (pivovarských kvasinkách) přinesly výsledky vědeckého bádání narůstající od konce 18. století. Tyto poznatky také umožnily přechod pivovarství i přípravy sladu na průmyslovou výrobu. V té době české pivovarství výrazně ovlivňovalo vývoj tohoto oboru v celém světě, a to jak výbornou kvalitou surovin, ale především produkcí piva specifických vlastností, které se v zahraničí snažili napodobit.

V dalších letech i během různých těžkých období se výroba piva velice propracovala až ve velmi moderní průmyslovou velkoprodukcí. Po ukončení socialistické éry v roce 1989, byly české pivovary neuvěřitelně rychle rekonstruovány a modernizovány na světovou úroveň, a přitom si stále udržely vyhraněné specifické analytické a organoleptické vlastnosti českého piva (Basařová *et al.*, 2022).

2 Technologie výroby piva

Pivo je alkoholický nápoj, který se po staletí vyrábí z obilných sladů, vody, chmele za účasti mikroorganismů (pivovarských kvasinek) s velmi složitým procesem vaření. Postupů výroby piva je několik a liší se dle technologického vybavení pivovaru a typu piva. Všechny výrobní procesy vychází ze základního postupu, který se využívá pro výrobu světlého spodně kvašeného piva. Tím je šrotování, vystírání, rmutování, scezování, vaření, odstraňování kalů, zchlazování, kvašení, dokvašování, filtrace, pasterizace, stáčení a expedice (Basařová *et al.*, 2022).

2.1 Pivovarské slady

Slad je za specifických podmínek naklíčená a usušená obilovina. V dávnověku se připravovalo pivo ze sladů z různých obilovin, převážně z ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.), který je dnes základní surovinou pro výrobu sladu v tradičních pivovarských zemích, a tudíž je jednou z nejstarších kulturních plodin. Po pravěkém období přípravy sladu z ječmenů šestiřadých a čtyřřadých nastoupila ve středověku éra výroby sladu z ječmenů dvouřadých, které se udržely až do novověku v Evropě. Původně si každý pivovar pro svou potřebu vyráběl slad vlastní, nebo se prodával a vyvážel surový ječmen, ze kterého byl slad následně vyroben. V polovině 19. století, s nástupem průmyslové výroby, byl zaznamenán ve strojních pivovarech velký modernizační pokrok. Byly zakládány samostatné obchodní sladovny, které prodávaly slad nejen domácím pivovarníkům, ale byl i vyvážen do celého světa. V rámci pivovarského průmyslu vzniklo další odvětví průmyslové výroby, a to výroba sladu.

V dnešní době máme více druhů sladů. Jednotlivé druhy sladů se získávají výběrem odrůd ječmene s určitými sladovnickými vlastnostmi a úpravami technologie máčení a klíčení, kterými lze regulovat biosyntézu a aktivitu sladových enzymů působících na určité složky extraktu. Především jsou vybírány odrůdy dle míry degradace vysokomolekulárních látek, redoxního potenciálu a acidity (kyselost) sladu. Z technologického hlediska výroby piva i jeho kvality je důležité používat partie sladu připravené z jedné odrůdy ječmene nebo pouze ze dvou odrůd, které si jsou geneticky podobné.

Celosvětově se vyrábí především světlé slady plzeňského typu pro světlá piva ležáckého typu a tmavé slady mnichovského typu pro tmavá piva. Můžeme

se ale setkat i s vídeňskými a pšeničnými slady a speciálními slady. Další typy sladů slouží pro zvýraznění určitých kvalitativních a specifických vlastností základních typů světlých a tmavých piv či pro výrobky charakteristicky odlišných vlastností. Pro výrobu piva se používají převážně slady z jarních ječmenů, jelikož vlastnosti odrůd značně ovlivňují kvalitu sladu a následně piva z něj vyrobeného. Tím se liší jednotlivé značky piv. Slady z ozimých ječmenů mohou způsobovat technologické problémy, a proto se dnes používají jen jako alternativa a doplněk při nízké sklizni jarního ječmene (Basařová *et al.*, 2022).

Světlé slady plzeňského typu se používají pro výrobu světlých piv ležáckého typu, což jsou piva spodně kvašená, která kvasí při teplotě 10 °C a po procesu kvašení leží déle než měsíc při nízkých teplotách. Dále slouží k výrobě konzumních piv a speciálních piv s různou koncentrací původní mladiny. Typickými znaky tohoto sladu jsou nízká hodnota barvy kongresní sladiny (extrakt sladu získaný standartním způsobem infuzního rmutování s jemně rozemletým sladem), která by měla být 3,0–4,2 jednotek určující barvu piva (EBC) a barvy po povaření. Velmi důležitými vlastnostmi sladu v moderní velkokapacitní výrobě jsou čistota a vlastnosti odrůdy ječmene použitého pro jeho přípravu, homogenita a stupně modifikace sladu. V současnosti je kladen velký důraz na kvalitu sladu hlavně z hlediska docílení přirozené fyzikálně chemické stability piva.

Vídeňský slad má dvakrát vyšší hodnoty barvy než plzeňský slad a je jakýmsi přechodným typem mezi světlými a tmavými slady. Používá se hlavně pro zvýšení sytosti barvy světlého piva. V dnešní době je jeho spotřeba minimální a používá se pouze pro výrobu speciálních piv.

Tmavé slady mnichovského typu jsou používané pro výrobu tmavých piv, ale můžeme je dnes vidět i pod názvem bavorský slad. Mají vysoké hodnoty barvy kongresní sladiny (11,0–17,3 EBC), vyšší obsah bílkovin, výrazné aroma, nižší extraktivnost, nižší aktivity sladových enzymů, a především širší spektrum a vyšší koncentraci produktů Maillardovy reakce.

Pšeničné slady se používají pro výrobu pšeničných piv, piv typu lambic a podobně. Pšeničné slady se vyrábí podobně jako ječmenné slady, ale klíčí kratší dobu a suší se při nižších teplotách.

Speciální slady se používají pro výrobu tmavých a speciálních piv při použití náhražek sladu a k úpravě určitých kritérií sladiny z běžných sladů. Od běžných světlých a tmavých sladů se liší enzymovými aktivitami nebo redoxní kapacitou,

kyselostí a barvou. Jejich přidáním při výrobě piva se ovlivňuje barva, chuť nebo pěnivost, či zvýšení odolnosti k předčasné tvorbě koloidních zákalů. Mezi speciální slady můžeme zařadit karamelové slady, barvicí slady, nakuřované slady, diastatické slady, proteolytické slady (kyselé slady), slady zvyšující redoxní kapacitu piva a krátké slady.

V dnešní době se ale můžeme setkat i s náhražkami sladu, které se používají hlavně z ekonomických důvodů, aby se snížily náklady na sypání jedné dávky sladu na jednu várku výroby. Nebo se také používají v dobách a místech s nedostatkem sladu pro výrobu piva. Za škrobnaté náhražky sladu, lze považovat všechny suroviny s vysokým podílem škrobu nebo polysacharidů s obdobnými vlastnostmi a praktického zpracování v pivovarském průmyslu. Rozlišují se 3 typy náhražek, a to nesladové obiloviny, škrobnaté výluhy, sirupy a koncentráty a speciální škrobové náhražky. Ve světové produkci je dnes s použitím škrobu z jiných zdrojů, než ze sladu vyráběno 80–90 % pív, to však ale neplatí o tradičních pivovarských zemích Evropy, ve kterých je použití náhražek velmi výjimečné (Basařová *et al.*, 2022).

2.2 Chmel

Chmel (*Humulus lupulus* L.) a přípravky vyrobené z této suroviny jsou doposud nezastupitelnou surovinou dávající pivu typickou hořkost a aroma odlišujících je od jiných alkoholických i nealkoholických nápojů. Rovněž ale ovlivňuje i technologii a další kvalitativní kritéria piva. Nejdůležitějšími složkami chmele jsou chmelové pryskyřice, jakožto nositelé hořkosti, silice a polyfenoly. Ostatní složky nemají tak velký vliv při zpracování. Nejvýrazněji hořkost ovlivňují produkty izomerace α -hořkých kyselin. Tyto kyseliny jsou prekurzory iso- α -hořkých kyselin, které vznikají během procesu vaření a jsou přítomny ve chmelu. Jejich obsah závisí na rostlinném druhu a podmínkách pěstování.

Vypěstované odrůdy chmele se dělí podle zbarvení chmelové révy na červeňáky (Evropa, Čechy, Německo, Polsko, Slovinsko) a zeleňáky (Anglie, USA a Austrálie). Dále se dělí dle délky vegetační doby zrání na rané, polorané a pozdní. Podle obsahu chmelových pryskyřic a chmelového aromatu se odrůdy dělí na jemné aromatické chmele a vysokoobsažné hořké chmele. Při výrobě piva se mohou používat sušené chmelové šišťice, chmelový granulát ve formě pelet různých typů,

nebo chmelové extrakty vyrobené extrakcí hořkých látek z rozemletého chmele (Basařová *et al.*, 2022).

2.3 Voda

Voda pro výrobu piva se dělí na tři druhy, varní vodu, mycí a sterilační vodu a provozní vodu.

Varní voda je jednou ze základních surovin pro přípravu piva. Aby tato voda mohla být použita, musí splňovat zdravotní a hygienické požadavky nezávadnosti pitné vody. Fyzikálně chemické a mikrobiální vlastnosti, jako jsou tvrdost vody, alkalita vody, acidobazické účinky solí a ionty (př.: vápenaté, hořečnaté, manganaté, amonné, síranové, ionty železa a alkalických kovů, dusitanové a mnoho dalších) v ní obsažené, ovlivňují průběh přípravy, základní kvalitu a specifické vlastnosti značky piva. Dle druhů piv je voda obsažena až na 75–80 %.

Mycí a sterilační voda nesmí obsahovat mikroorganismy, chemické kontaminanty a nesmí zapáchat. Voda pro přípravu mycích roztoků a při pasteraci by především měla mít nízký obsah anorganických iontů. Vodu pro výplachy zařízení, transportních lahví a sudů a sterilaci je doporučeno chlorovat a musí být hygienicky nezávadná.

Provozní voda musí odpovídat standardům stanoveným pro jednotlivé operace a zařízení, tudíž musí odpovídat předepsané potravinářské kvalitě. Voda, která se používá na chlazení je někdy chemicky a mikrobiálně upravována.

Mezi nejčastější normované typy pivovarských vod patří Plzeňská voda, Mnichovská voda, Dortmundská voda a Vídeňská voda. Plzeňská voda je měkká, má nízký obsah iontových rozpuštěných látek a je vhodná pro silně chmelená spodně kvašená piva. Mnichovská voda je střední až tvrdá, obsahuje málo chloridů a síranů a více uhličitánů a vápníku. Dortmundská voda je velmi tvrdá a nekarbonátová. Stálá tvrdost převažuje nad karbonátovou. Vídeňská voda se používá pro piva s přechodem ze světlých na tmavá, jelikož je velmi tvrdá s převládající karbonátovou tvrdostí. Samozřejmě každá voda dle lokace je jiná a má své individuální složení, a proto je každé pivo jiné a má své individuální vlastnosti (Basařová *et al.*, 2022).

2.4 Mladina a její příprava

Mladina se připravuje ve varně ze sladu, vody a chmele či chmelových přípravků. Podmínky přípravy se liší dle druhu vyráběného piva. Příprava mladiny probíhá těmito procesy:

- předčištění a zvážení surovin
- rozemletí sladu na sladový šrot
- vystírání, rmutování, scezování (rozdělení sladiny a mláta)
- vyslazování
- vaření sladiny s chmelem nebo jeho přípravky z čehož vzniká mladina
- odstraňování kalů a následné ochlazení a provzdušnění uvařené mladiny pro vznik studené mladiny (Basařová *et al.*, 2022).

2.4.1 Šrotování

Cílem šrotování je dokonalé rozdrcení endospermu sladových zrn na vhodné podíly jemných a hrubých částic při zachování celých obalových pluch. Mechanické rozrušení zrna je potřebné pro zpřístupnění extraktivních látek sladu a urychlení jejich rozpouštění během procesu rmutování a dalších fází přípravy mladiny. Je to v zásadě mechanický proces, na jehož konci nesmí šrot obsahovat žádná celá zrna.

Před mletím sladu se vybere surovina požadované jakosti pro daný výrobek nejlépe z jedné odrůdy ječmene či směsi nejčastěji dvou odrůd podobných genetických vlastností. Slad se ukládá na půdách nebo v silech a před mletím se řádně pročistí v čističkách s vytrásadlem a sítí, aspirátorem prachu a magnetickým přístrojem. Slad je pak svezen na elektronických vahách, aby byly zjištěny hodnoty pro výpočet varního výtěžku a následně je převeden do dávkovacích zařízení.

Základní postupy mletí jsou:

- mletí za sucha
- mletí za sucha s oddělením jednotlivých frakcí
- mletí kondicionováním a zvlhčením sladu tlakovou vodou nebo párou před mletím
- mletí za mokra namočeného sladu a příprava velmi jemného moučnatého šrotu pro speciální vakuové filtry určené k oddělení mláta (Basařová *et al.*, 2022).

2.4.2 Vystírání

Cílem vystírání je dobře smíchat sladový šrot s nálevem varní vody. Výběr surovin, jejich dávka, způsob vystírání a následné rmutování je velmi důležitým prvním předpokladem k docílení správného složení sladiny pro určitý druh piva.

Jelikož slad obsahuje velmi nízké množství ve vodě rozpustných látek, je velmi těžké převést tuhé částice šrotu do roztoku pouhým smícháním s vodou. Rozpustné jsou především cukry, sacharóza, malé množství maltózy, glukózy, fruktózy a gumovité látky a jejich produkty, jakožto neškrobové polysacharidy. Množství rozpuštěných látek závisí na množství nasyceného šrotu a objemu vody v hlavním nálevu.

Pro světlá piva se používá větší nálev pro získání řidšího rmutu, ve kterém se při rmutování urychlují enzymové reakce, podporuje činnost amylolytických enzymů a tím i rychlejší zcukření sladiny.

Pro tmavá piva se naopak používá méně nálevu pro získání hustého rmutu, který zachovává delší dobu působnosti především proteolytických enzymů. Dekokční postup rmutování zvyšuje převod látek z pluch, procesy karamelizace cukrů a zvýšení barvy, která přispívá k příznivé chuti tmavého piva.

V průběhu vystírání dochází ke smíchání rozemletého sladu s hlavním nálevem. Při studené i teplé vystírce je voda rozdělena na dva díly. Na začátku se smíchá slad s prvním dílem, který má teplotu 20 °C pro studenou vystírku nebo 35–38 °C pro teplou vystírku. Následně se přimíchá druhý díl vody, což je horká voda, kterou se provede zapářka. Finální nálev je voda potřebná pro vyslazení mláta v průběhu scezování a pro naředění sladiny na požadovanou koncentraci mladiny.

Podle postupu se doba vystírání pohybuje mezi 10–30 minutami. Při mokřém šrotování probíhá vystírání současně s mletím sladu od 30–40 minut a včetně máčení až 1 hodinu (Basařová *et al.*, 2022).

2.4.3 Rmutování

Cílem rmutování je rozštěpit a převést optimální podíl extraktu sladu do roztoku v potřebném zastoupení jednotlivých látek důležitých pro další technologický postup a kvalitu piva. Především se to týká zkvasitelných cukrů. Při tomto procesu působí mechanické, chemické, fyzikální, a především enzymové děje. Rozhodující je činnost amylolytických, proteolytických, kyselinotvorných a oxidačně–redukčních

sladových enzymů. Nejvýznamnějším procesem rmutování je štěpení škrobu na zkvasitelné sacharidy působením amylolytických enzymů.

Způsoby rmutování ovlivňují kvalitu mladiny a další proces výroby i základní charakteristické a organoleptické vlastnosti. Jednotlivé postupy se liší teplotami vystírky, rychlostmi vyhřívání i prodlevami při určitých teplotách. V zásadě dělíme postupy na dekokční a infuzní rmutování.

Dekokční postup se realizuje postupným vyhříváním jednoho až tří dílů rmutu na technologicky důležité teploty a dále jejich povařením.

Infuzní postup zajišťuje rozpouštění a štěpení extraktu sladu dlouhodobým účinkem sladových enzymů bez mechanického a tepelného působení povaření rmutu (Basařová *et al.*, 2022).

2.4.4 Scezování

Scezování je fyzikální proces filtrace, při kterém dochází k oddělení roztoku obsahující extraktivní látky sladu od mláta. Následuje vyluhování extraktu zachyceného v mlátě horkou vodou tzv. vyslazování. Získané vodní výluhy po spojení se sladinou dávají pohromadě celkový objem sladiny. Na rozdíl od rmutování je tento proces fyzikálně-chemický a je časově velmi náročný. Velký význam v tomto procesu hraje kvalita sladu, složení sladového šrotu, míra degradace vysokomolekulárních látek docílená při rmutování, teplotní podmínky a procesní zařízení (Basařová *et al.*, 2022).

2.4.5 Vaření sladiny s chmelem – chmelovar

Při tomto procesu dochází k řadě fyzikálních, chemických i biochemických reakcí za spolupůsobení vlivu mechanického pohybu. Jejich výsledek se ukazuje ve složení mladiny a ovlivňuje následné procesy a vlastnosti piva. Tento proces je velmi variabilní.

Cílem chmelovaru je:

- odpaření přebytečné vody
- docílení obsahu extraktu mladiny odpovídající typu vyráběného piva
- odpaření těkavých látek
- inaktivace enzymů, které přetrvaly předchozí procesy

-
- determinace složení sacharidů a oxidačně-redukční kapacity mladiny
 - sterilování mladiny a inhibování reziduální mikroflóry z vody, sladu, chmele, surogátů a zařízení
 - zajištění koagulace výšemolekulárních dusíkatých látek působením tepla
 - rozpuštění a izomerace hořkých látek chmele
 - rozpuštění a úprava dalších složek chmele a chmelových produktů, především polyfenolů, dusíkatých látek, lipidů a dusičnanů
 - vytvoření produktů Maillardových reakcí
 - vytvoření redukujících látek a ustavení oxidačně-redukčního potenciálu mladiny
 - zajištění oxidačních reakcí a zvýšení acidity (Basařová *et al.*, 2022).

2.4.6 Zchlazení mladiny a odstranění kalů

Vyrobená mladina ve varně pivovaru musí být před zakvašením ochlazena na zákvasnou teplotu. Při ochlazení dochází současně k provzdušnění a vyloučení horkých neboli hrubých kalů a částečně i jemných chladových kalů. Tyto procesy probíhají při změně teploty ze 100 °C až na 5–6 °C pro tradiční studené kvašení, nebo na teplotu 10–15 °C pro zrychlené kvasné procesy a na 12–18 °C pro výrobu svrchně kvašených piv. Chlazení mladiny musí proběhnout za podmínek, které vyloučí biologické znečištění rozvojem mikrobiální kontaminace.

Při chlazení dochází hlavně k fyzikálním dějům a chemickým reakcím, které závisejí na teplotě a principu použitého zařízení. Z mladiny se vylučují hrubé a jemné kaly a mladina je následně sycena kyslíkem. Doprovodným jevem chlazení je zmenšení objemu a s tím spojené mírné zvýšení extraktu mladiny. Kromě toho dochází při chlazení ke změně koncentrace mladiny odparem (Basařová *et al.*, 2022).

2.5 Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky se obecně řadí mezi jednobuněčné houby. V současné době jsou pod pojem pivovarské kvasinky zahrnovány dva druhy, svrchní pivovarské kvasinky a spodní pivovarské kvasinky. Oba druhy se vzájemně liší svými vlastnostmi, což se pak následně odráží v jejich technologickém použití.

Svrchní pivovarské kvasinky se používají pro svrchně kvašená piva, kde jsou kvasinky ze suspenze v kvasící mladině vynášeny k hladině a vytváří hustou pěnu

tzv. kvasnou deku. Svrchní kvašení probíhá zpravidla při vyšších teplotách 15–23 °C.

Spodní pivovarské kvasinky se používají primárně pro piva spodně kvašená, jelikož se kvasinky v průběhu kvašení aglutinují, sedimentují a na konci kvašení vytváří sediment na dně kvasné nádoby. Spodní kvašení probíhá zpravidla při nižších teplotách 6–9 °C.

Rozdíly mezi spodními a svrchními pivovarskými kvasinkami zobrazuje následující tabulka s konkrétními rozdíly (Basařová *et al.*, 2022).

Tabulka 1. rozdíly mezi spodními a svrchními pivovarskými kvasinkami (Basařová *et al.*, 2022)

Druh aktivity	Spodní pivovarské kvasinky	Svrchní pivovarské kvasinky
zkvašování rafinosy	úplně	částečně
enzym melibiasa	obsahují	neobsahují
shromažďování kvasnic	v sedimentu	v dece
teplota kvašení	6–8 °C	15–25 °C
min. teplota kvašení	0 °C	10 °C
povrchový náboj	záporný	kladný
reakce s bublinkami CO ₂	nereagují	adsorpce
respirační aktivita	nižší	vyšší
optimální teplota sporulace	25 °C	30–35 °C
tvorba spor	obtížná	snadná
produkce sirovodíku	nižší	vyšší
obsah popela	8–10 %	5–9 %

2.6 Kvašení mladiny a dokvašování piva

Tato část procesu je rozdělena na hlavní kvašení, dokvašování a zrání piva. Cílem hlavního kvašení je zkvašení hlavního podílu cukernatých látek za tvorby ethanolu, oxidu uhličitého a vedlejších metabolitů. Podle technologického postupu jsou rozlišovány stacionární, zrychlené a kontinuální postupy kvašení piva. Průběh kvašení má ale důležité faktory. Teplota kvašení je důležitý regulační prvek. Druh a dávka kvasnic mají rozhodující vliv na průběh kvašení i kvalitu piva. Kmen kvasnic je volen dle požadavků na charakteristické vlastnosti piva. Složení mladiny ovlivňuje růst kvasinek, průběh kvašení a kvalitu piva. Mladina musí obsahovat dostatek zkvasitelného extraktu, snadno kvasinkami absorbovatelný dusík

a přiměřené množství minerálních látek. Nemá obsahovat sloučeniny, které kvašení inhibují.

Minerální látky mladiny mají různorodý význam. Sírany jsou zdrojem sirných sloučenin, které se uplatňují v biosyntéze bílkovin. Inositol, biotin a kyselina pantothenová jsou důležité vitamíny pro činnost kvasinek. Dextrin, hořké, polyfenolové a výšemolekulární dusíkaté látky nemají vliv na průběh kvašení. Kalící částičky v množství do 12 mg sušiny ve 100 ml mladiny neovlivňují kvašení. Nasycení zakvašované mladiny kyslíkem je důležité především pro pomnožení kvasnic, které závisí na dostatečné syntéze ergosterolu z glukózy za účasti kyslíku.

Cílem dokvašování a zrání piva je pomalé zkvašování zbylých sacharidů při nízkých teplotách s docílením nasycení a fixací oxidu uhličitého se současným zajištěním vyčerení a organoleptické zralosti piva. Tento proces probíhá v ležáckém sklepě v ležáckých nádobách, sudech nebo tancích. Tyto prostory jsou dnes velmi dobře izolované a chlazené na teploty 0–4 °C. K docílení optimální kvality piva při klasickém způsobu dokvašování a zrání je nutné dodržet určité podmínky, kterými jsou pozvolný pokles teploty, pozvolné zkvašování zbylého extraktu, čiření piva, zrání chuti a vůně piva, oxido-redoxní potenciál piva a sycení piva oxidem uhličitým (Basařová *et al.*, 2022).

2.7 Závěrečné úpravy piva

Po ukončení dokvašování a zrání je pivo považováno z organoleptického hlediska za hotové. Závěrečné úpravy jsou prováděny pouze za cílem vyhovět spotřebitelským a komerčním požadavkům na vzhled, trvanlivost a obchodovatelnost piva. Pouze u piv minipivovarů k závěrečným úpravám nedochází, jelikož je stáčeno čerstvé pivo rovnou z ležáckých tanků.

Cílem filtrace je odstranit zbytky neusazených mikroorganismů a koloidních částic tak, aby pivo získalo jiskrnou čírost. V dnešní době se používají nejmodernější technologie jako je membránová filtrace, pomocí které lze nahradit pasteraci a tím negativní působení tepla na chuťovou a koloidní stabilitu piva.

Pasterace je finální proces před stáčením piva a jedná se o tepelné ošetření piva s cílem zvýšit jeho biologickou trvanlivost (Kadlec *et al.*, 2009).

2.8 Stáčení a expedice

Stáčení a následná expedice k zákazníkovi je posledním krokem hodnototvorného řetězce souvisejícího s výrobou, expedicí, prodejem a spotřebou piva probíhajícího v samostatném pivovaru. Cílem těchto velice důležitých technicky náročných operací je dostat hotové pivo do přepravních či spotřebitelských obalů tak, aby pivo neutrpělo ztrátu kvality při stáčení ani při další manipulaci s ním (přeprava a skladování). Zachování kvality piva spočívá především v zajištění optimálních podmínek stáčení odpovídajících jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem, aby se zamezilo nežádoucí výměně plynů a často těkavých, sensoricky aktivních látek utvářejících charakteristický chuťový profil piva. V dnešní době jsou nejčastěji používané ke stáčení transportní sudy, výčepní tanky, party-soudky, skleněné láhve z tmavého (zeleného či hnědého) skla, které nepropouští světlo, tmavé plastové láhve z kvalitního plastu či plechovky (Basařová *et al.*, 2022).

3 Charakteristika minipivovarů

Minipivovar je malý pivovar, jehož celková roční produkce piva nesmí přesáhnout 10 000 hl. Minipivovary vyrábí převážně speciální nebo sezónní piva, která jsou specifická tím, že jsou nefiltrovaná a nepasterovaná. Tato piva se vyznačují jasnou chutí, sladovostí a kořenitým chmelem, nebo naopak jedinečnými chutěmi, které u piva běžně nejsou čekány, jelikož jsou při výrobě dodržovány tradiční postupy a je zde velký podíl ruční práce. Největší rozdíl ve výrobě piva mezi minipivovary a pivovary je ve vaření. U minipivovarů se používá infuzní vaření, kdy se celá várka zahřeje na cukrotvorné teploty a dál se nepovaňuje a rovnou se zcedí.

Co se týče skladování, piva z minipivovarů jsou většinou, jak již bylo zmíněno, nefiltrovaná a nepasterizovaná, tudíž musejí být skladována trochu jinak. Ideální teplota pro skladování tohoto typu piv je 5–10 °C v místnostech k tomu uzpůsobených. Pokud jsou tato piva v sudech, měly by být skladovány dnem vzhůru kvůli obsahu kvasinek a tvorbě typické usazeniny, díky které jsou tato piva nevšední. Pokud jsou tato piva v lahvích, měla být spotřebována do data určeného na obalu, jelikož je pivo pořád „živé“ (obsahuje kvasinky, jelikož nebylo přefiltrováno) a tudíž má mnohem kratší trvanlivost než piva z velkopivovarů, která prošla filtrací i pasterizací (Choi *et al.*, 2012, Borowie a Titzlová, 2017) [online; Dostupné z: www.drink-drink.ru].

4 Biogenní aminy obecně

Biogenní aminy (BA) jsou zásadité dusíkaté sloučeniny vznikající při dekarboxylaci aminokyselin, nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Formálně jsou odvozené od amoniaku náhradou jednoho (primární aminy), dvou (sekundární aminy) nebo tří (terciální aminy) vodíků za alkylovou nebo arylovou skupinu. Tyto aminy mají biologický význam v rostlinách, mikrobiálních, a i živočišných buňkách. Můžou být zjištěny v syrových, ale i zpracovaných potravinách a nápojích rostlinného i živočišného původu. BA v potravinách a nápojích vznikají v důsledku mikrobiální dekarboxylace aminokyselin, jak je již zmíněno (Křížek, Kalač, 1998).

Dle chemické struktury lze biogenní aminy rozdělit do skupin, které jsou alifatické, aromatické, heterocyklické a polyaminy. Do alifatické skupiny řadíme putrescin a kadaverin. Do aromatické skupiny řadíme tyramin a 2-fenyletylamin. Mezi heterocyklické BA řadíme histamin a tryptamin (Křížek, Kalač, 1998).

Mezi biogenní polyaminy se řadí agmatin, spermidin a spermin. Polyaminy jsou nepostradatelnými složkami živých buněk a jsou důležité pro regulování funkce nukleových kyselin, syntézy bílkovin a stabilizaci membrán (Křížek, Kalač, 1998).

BA můžou být nalezeny v celé řadě druhů potravin a nápojů, jako jsou rybí, masné, mléčné a fermentované výrobky. Proto mohou být prakticky nalezeny ve všech potravinách, které obsahují bílkoviny nebo volné aminokyseliny a podléhají podmínkám umožňující mikrobiální nebo biochemickou aktivitu. Celkové množství vznikajících aminů silně závisí na povaze potravin a přítomných mikroorganismech (Santos, 1996).

4.1 Biologické účinky BA

BA jsou pro lidský organismus nepostradatelné, jelikož jsou pro tělo zdrojem dusíku a jsou prekurzory hormonů nebo samy působí jako hormony podílející se na syntéze nukleových kyselin. Ve vysokých koncentracích však mohou mít negativní vliv na organismus, a to psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní vliv se může projevit na přenašečích v centrální nervové soustavě (CNS) – ovlivňování emocí a myšlení. Vazoaktivní vliv se projevuje působením přímo či nepřímo na vaskulární systém – působí na cévy, jejich průsvit a tím i průtok krve v zasažené oblasti. Každý z BA má jiné příznaky, které popíší v jednotlivých kapitolách jim věnovaných. U zdravého člověka nemusí být projevy tak výrazné, ale u osob trpících migrénami,

alergiků, uživatelů psychofarmak a alkoholiků představuje příjem vysokého množství BA riziko (Wójcik *et al.*, 2021).

Zdravý člověk se s vysokým množstvím BA vyrovnává pomocí účinného detoxikačního systému. Ten tvoří systém enzymů aminooxidáz s prostetickou flavinadeninukleotidovou (FAD) skupinou. Nejdůležitějšími jsou monoaminoxidázy (MAO) a diaminoxidázy (DAO). Při detoxikaci, probíhající v tenkém střevě a játrech, jde o dehydrogenace aminu přes imin, ze kterého se hydrolyzou uvolňuje amoniak a vzniká aldehyd, který je pak oxidován na karboxylovou kyselinu. Detoxikační aktivita je však velmi individuální, jelikož ji negativně ovlivňuje např. příjem alkoholu nebo některých léčiv ze skupiny psychofarmak, antialergik a mukolytik apod. Toxické působení BA je tedy ovlivněno aktivitou enzymů detoxikačního systému. Vysoké koncentrace však nejsou schopny enzymy eliminovat, a i neovlivněný detoxikační systém pak selhává [online; Dostupné z:

https://is.muni.cz/el/1411/podzim2007/BVMI0322p/um/Biogenni_aminny_2007_MU.pdf].

4.2 Biogenní aminy a pivo

Při přípravě fermentovaných potravin a nápojů lze očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, které mohou být schopny produkovat BA. Většina produktů, ve kterých dochází k růstu bakterií mléčného kvašení, obsahují značné množství putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu. Během alkoholového kvašení se tvoří ve větším množství agmatin, kadaverin, etanolamin, histamin, putrescin a tyramin (Santos, 1996).

Tvorba BA v pivu je především ovlivněna druhy surovin, úrovní mikrobiální kontaminace, podmínkami skladování a surovinami, jako je slad a chmel (Papageorgiou *et al.*, 2018), (Halász *et al.*, 1999). Během kvašení může být pivo znehodnoceno mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou aminokyselin, jako jsou bakterie mléčného kvašení, zástupců *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas*. Tato aktivita vede k abnormálnímu kvašení což způsobuje vysoké hladiny biogenních aminů, které jsou zjištěny až při skladování. Oproti tomu piva z minipivovarů, jelikož jsou nefiltrovaná a nepasterizovaná, mohou obsahovat vyšší hladiny BA, která představují vyšší bezpečnostní a zdravotní rizika než piva z velkopivovaru.

Vysoké koncentrace BA mohou působit psychoaktivně nebo vazoaktivně. Mezi typické příznaky konzumace vysokých dávek BA jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypo/hypertenze a migrény [online; Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2007/BVMI0322p/um/Biogenni_aminu_2007_MU.pdf], (Hayden & Perkins, 2022, Li *et al.*, 2023).

Histamin a tyramin jsou nejdůležitější BA objevující se ve fermentovaných výrobcích a mohou způsobovat závažné potíže, jako jsou bolesti hlavy nebo těžké formy alergie. Sekundární BA se mohou podílet také na syntéze nitrosaminů v žaludku. Některá speciální piva jako jsou například kyseláč a piva vyráběná ze smíšených kultur, se vyznačují podstatnou přítomností biogenních aminů v důsledku metabolismu typicky zúčastněné mikroflóry (Gasarasi *et al.*, 2003).

4.3 Vlastnosti vybraných biogenních aminů

Tato kapitola je věnovaná popisu vybraných biogenních aminů a polyaminů, které vznikají mikrobiální aktivitou.

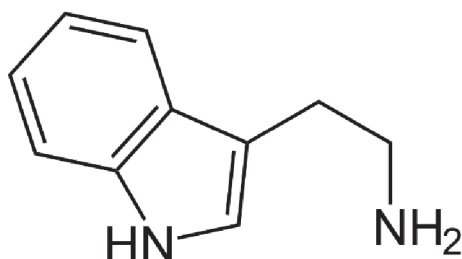
Ve fermentovaných nápojích vznikají BA až během procesu fermentace, jelikož jejich obsah je v surových složkách velmi nízký. V evropských pivech se celkový obsah BA pohybuje v jednotkách až maximálně desítkách mg/l (Komprda, 2004).

4.3.1 Tryptamin

Tryptamin (TRM), 2-(1H-indol-3yl)ethan-1-amin, se řadí mezi heterocyklické biogenní aminy. Jedná se o aminoalkylindol tvořený indolem s 2-aminoethylovou skupinou v poloze 3. Je to důležitý obecný metabolit (Chen *et al.*, 2022).

Obsah tohoto biogenního aminu v alkoholických nápojích, jako je pivo, je důležitým parametrem jak z toxikologického, tak z technologického hlediska. V nízké koncentraci je TRM nezbytný pro mnoho fyziologických funkcí člověka, které jsou obecně buď psychoaktivní (mění duševní procesy) nebo vazoaktivní (působí na cévy, tj. vliv na jejich průsvit a následný průtok krve), zatímco ve vysoké koncentraci mohou způsobovat celou řadu chorobných příznaků. Samozřejmě úroveň toxicity závisí na jeho množství v konzumovaných potravinách a na přítomnosti dalších biogenních aminů (Choi *et al.*, 2012).

Druhy a obsahy biogenních aminů v pivu jsou ovlivněny především surovinami, technikou vaření a hygienickými podmínkami. Obecně je dáno, že TRM vzniká během fermentace (Ramon-Marquez *et al.*, 2016).

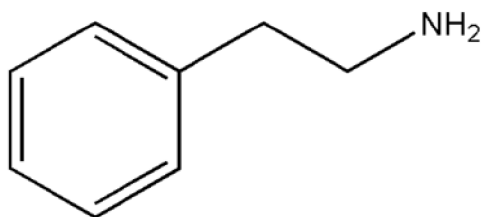


Obrázek 1: Tryptamin

4.3.2 2-Fenylethylamin

2-fenylethylamin (PEA), 2-fenylethan-1-amin, je biogenní aromatický amin, jenž je jednou z fyziologických složek nacházejících se v mozku savců. Působí v CNS, kde se může chovat jako neuromodulátor podporující zvýšení nálady. Tento amin může fungovat především jako endogenní amfetamin a zároveň je posilující látkou, která usnadňuje uvolňování neurotransmiterů katecholinu a serotoninu. Tyto neurotransmitery souvisejí s regulací nálady, fyzické energie a pozornosti (Marcobal *et al.*, 2012).

Tento aromatický amin vzniká ve fermentovaných potravinách působením dekarboxylázy fenylalaninu u fermentačních bakterií, jako jsou bakterie rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus*. Mezi nejtypičtější fermentované potraviny, ve kterých může být nalezen, patří sýry, víno, čokoláda a pivo. Samozřejmě může být detekován a v jiných tradičně fermentovaných potravinách. Ačkoli se tento amin také podílí na negativních účincích pro organismus, jako jsou hypertenze a migréna, tak se odborné studie shodují na jeho pozitivních funkcích jako je působení na hTAAR (lidské receptory pro stopové aminy), zejména na receptor hTAAR1 vyskytující se v žaludku (Ohta *et al.*, 2017).

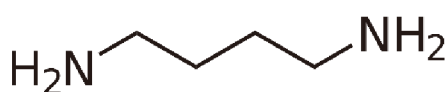


Obrázek 2: 2-Fenylethylamin

4.3.3 Putrescin

Putrescin (PUT), butan-1,4-diamin, je biogenní polyamin příbuzný kadaverinu. Vzniká dekarboxylací argininu a ornitinu v živých i mrtvých organismech. Ve velkých dávkách je velmi toxický a je zodpovědný za nepříjemný zápach hniljícího masa. V malém množství je syntetizován zdravými živými buňkami působením ornitindekarboxylázy. Má úlohu základního metabolitu a antioxidantu v organismu (Wunderlichová *et al.*, 2014; online Dostupné z: <https://ecmdb.ca/compounds/M2MDB000378>, online; Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Diaminobutane].

PUT a další polyaminy jsou nepostradatelnými složkami živých buněk. Tento polyamin můžeme nalézt ve fermentovaných, ale také i v nefermentovaných potravinách. V nefermentovaných potravinách se zvyšuje jeho hladina hlavně během kažení masa a syrových masných produktů. Putrescin najdeme primárně u výrobků, ve kterých jsou aktivní bakterie mléčného kvašení. Tím jsou například sýry a mléčné výrobky. Dále jej ale můžeme detekovat při výrobě fermentované zeleniny, jako je kysané zelí apod. Jen v nízkém množství jej můžeme nalézt i ve fermentovaných masných výrobcích. Oproti tomu ve vysokém množství jej nalezneme v alkoholických nápojích, jelikož se tvoří během alkoholového kvašení (Santos, 1996).

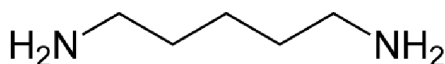


Obrázek 3: Putrescin

4.3.4 Kadaverin

Kadaverin (CAD), pentan-1,5-diamin, je velmi zápachající biogenní diamin, který vzniká bakteriální dekarboxylací lysinu. K té dochází během hydrolýzy bílkovin při hnilobných procesech živočišné tkáně. Tento diamin není spojován pouze s rozkladným procesem, ale také je v malém množství produkován savci. Dále se vyskytuje v rostlinách, jako je sója. Ve vysokých dávkách je CAD velmi toxický. Má roli důležitého rostlinného a živočišného metabolitu (Ma *et al.*, 2017).

Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) je CAD společně s PUT považován za jeden z nejběžnějších bazických nejtoxičtějších aminů, které se vyskytují v potravinách. Kadaverin se může ve vysokých koncentracích akumulovat v sýrech, rybách, rybích výrobcích a fermentovaných uzeninách. Ačkoli se farmakologická aktivita CAD zdá být méně intenzivní ve srovnání s účinkem histaminu (HIM) a tyraminu (TYM), konzumace tohoto vazoaktivního biogenního aminu souvisí s akutními patologickými poruchami. Mezi nejtypičtější projevy patří zvýšená srdeční aktivita, paréza čelistí a končetin, dilatace cévního systému, hypotenze a bradykardie (to může vést k srdečnímu selhání a krvácení do mozku). Největším toxickým účinkem je však to, že zvyšuje toxicitu jiných biogenních aminů (Del Rio *et al.*, 2019).



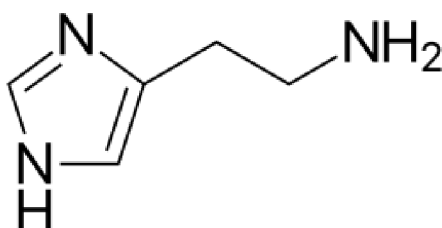
Obrázek 4: Kadaverin

4.3.5 Histamin

Histamin (HIM), 2-(1H-imidazol-4-yl)ethan1-amin, patří do skupiny biogenních aminů a je syntetizován z aminokyseliny histidinu prostřednictvím enzymu L-histidin dekarboxylázy. Histamin je jedna ze základních aminokyselin v těle, která se podílí na stavbě proteinů. Považuje se za esenciální aminokyselinu, kterou si člověk nedokáže sám syntetizovat a musí ji přijímat v potravě. HIM je syntetizován žírnými buňkami, bazofily, krevními destičkami, histaminergními neurony a enterochromafinnými buňkami. Je uchováván intracelulárně ve vakuolech nebo granulích a po stimulaci (např. alergeny) je uvolňován ven. Kromě známého spouštění degranulace žírných buněk je také silným mediátorem četných

biologických reakcí. HIM působí na čtyři receptory cílových buněk v různých tkáních. Způsobuje kontrakci buněk hladkého svalstva, vazodilataci, zvýšenou cévní propustnost a sekreci hlenu, tachykardii, změny krevního tlaku a arytmií. Dále také stimuluje sekreci žaludečních kyselin a nocicepci nervových vláken. Navíc HIM hraje velkou roli v neurotransmisi, imunomodulaci, hematopoéze, hojení a rovnováze mezi denním a nočním rytmem (Maintz a Novak, 2007).

Při vysokých koncentracích je HIM rizikovým faktorem při intoxikaci jídlem, zatímco střední hladiny množství tohoto BA mohou vést pouze k intoleranci daného jídla. Osoby citlivé na HIM, které mají nedostatečnou aktivitu diaminooxidázy (DAO), trpí četnými, již zmíněnými zdravotními problémy po požití potravin s vyšším obsahem popisovaného BA. Zkažené potraviny, hlavně fermentované potraviny mají tendenci obsahovat vysoké množství histaminu. Jeho vysoký obsah v potravinách a nápojích je způsoben mikrobiální kontaminací (Bodmer *et al.*, 1999).

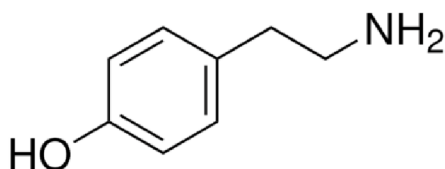


Obrázek 5: Histamin

4.3.6 Tyramin

Tyramin (TYM), 4-(2-aminoethyl)fenol, je biogenní stopový amin, který vzniká dekarboxylací aminokyseliny tyrosinu. V piko- až nanomolárních koncentracích může ovlivňovat řadu fyziologických mechanismů a vykazovat neuromodulační vlastnosti, jakožto i kardiovaskulární a imunologické účinky. Mezi nejčastějšími projevy při konzumaci potravin s vysokým obsahem tyraminu, je vyvolání migrény nebo hypertenze, proto tento amin způsobuje silné bolesti hlavy. U lidí je strava hlavním zdrojem fyziologicky účinných koncentrací tyraminu, které jsou ovlivňovány velkým počtem vnitřních i vnějších faktorů. Mezi tyto faktory patří dostupnost tyrosinu v potravinách, přítomnost bakterií produkující tento amin, pH

prostředí a obsah soli v potravinách. Také sem patří látky, které ovlivňují aktivitu enzymu tyrosin-dekarboxylázy. Obzvláště vydatným zdrojem tyraminu v lidské stravě jsou fermentované potraviny (Andersen *et al.*, 2019).



Obrázek 6: Tyramin

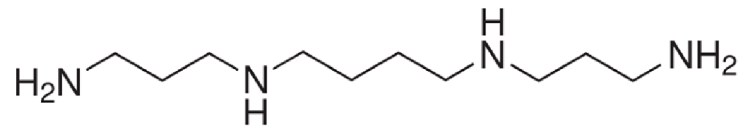
4.3.7 Spermidin a spermin

Spermidin (SPD), N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin, je biogenní triamin vytvořený z putrescinu a zároveň je prekurzorem sperminu (SPM). SPD má roli základního metabolitu, geroprotektoru a induktoru autofagie. Vyskytuje se téměř ve všech tkáních ve spojení s nukleovými kyselinami. Dále je také řazen jako uremický toxin. Jelikož je SPD řazen mezi uremické toxiny může jeho příjem ve vysoké koncentraci vést k chronickému onemocnění ledvin a kardiovaskulárnímu onemocnění (Madeo *et al.*, 2018).

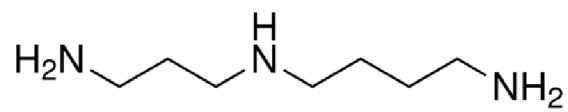
Spermin (SPM), N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin, je endogenní polyamin. Vyskytuje se v metabolismu všech eukaryotických buněk. Často působí jako základní růstový faktor u některých druhů bakterií. Dále je také spojován s nukleovými kyselinami a předpokládá se, že stabilizuje jejich šroubovicovou strukturu, zejména u virů (Yuan, Li, 2017).

Tyto biogenní polyaminy se podílí na různých biologických procesech, zejména na buněčné proliferaci a diferenciaci a mají také antioxidační účinky. Antioxidační a protizánětlivé účinky mohou také hrát důležitou roli v prevenci chronických onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární choroby. Kromě endogenní syntézy jsou důležitým zdrojem i potraviny. Lze je nalézt přirozeně v potravinách živočišného i rostlinného původu ve volné i konjugované formě. Na jednu stranu pochází ze syrových rostlin, ale bylo také zjištěno, že mohou mít částečně bakteriální původ, a to hlavně u fermentovaných výrobků. Proto mohou podmínky zpracování a skladování ovlivnit jejich celkové množství v produktu. Ačkoli neexistují žádná doporučení na denní dávku příjmu těchto polyaminů, tak je známo, že ve fázích

rychlého růstu buněk jsou požadavky na jejich množství vysoké (Munoz-Esparza *et al.*, 2019).



Obrázek 7: Spermin



Obrázek 8: Spermidin

5 Analytické možnosti pro stanovení biogenních aminů v potravinách

5.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří do skupiny elektroforetických metod, které slouží k separaci látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. V případě CE tato separace probíhá v kapiláře naplněné roztokem základního elektrolytu, kterým je zpravidla roztok pufru [online; Dostupné z: <https://www.amedis.cz/laboratorni-technika/kapilarni-elektroforeza/>].

CE je hodnocena jako výkonná analytická separační technika, která přináší rychlost, kvantifikaci, reprodukovatelnost a automatizaci do přirozeně vysoce rozlišujících, ale pracných metod elektroforézy. CE byla prosazena jako důležitá a široce využívaná technika pro rutinní analytickou separaci (Grassman, Colburn, 1992).

Hlavními důvody pro používání CE byly rychlost, použití malého množství vzorků a činidel, a všestrannost, jelikož dokáže oddělit velké i malé analyty, ačkoli jsou neutrální nebo nabitě (Petersen *et al.*, 2003).

5.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z technik chromatografie, jenž je jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod (Křížek, Šíma, 2015).

Jedná se o separační a současně analytickou techniku, která slouží k rozdělení jednotlivých složek vzorku na základě jejich povahy a k následné identifikaci a kvantifikaci. HPLC pro separaci využívá distribuce látek mezi dvě fáze, mobilní/pohyblivou a stacionární/nepohyblivou [online; Dostupné z: <https://hpst.cz/hplc-vysokocinna-kapalinova-chromatografie-zaklady-principy>].

HPLC zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná. S ohledem na experimentální uspořádání lze hovořit o HPLC v otevřeném a uzavřeném systému (Křížek, Šíma, 2015).

V dnešní době již existuje účinnější separační technika kapalinové chromatografie, a to ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC). UPLC se stala rozšířenou díky chromatografické účinnosti, lepšímu rozlišení a citlivosti, snížení

spotřeby rozpouštědel a zkrácení doby zpracování vzorků. UPLC pracuje při vyšším tlaku a umožňuje práci s menší velikostí částic v kolonách [online; Dostupné z: <https://dyadlabs.com/hplc-vs-uplc/>].

6 Cíle práce

- Provedení literární rešerše na téma pivovarnictví, biogenních aminů a používaných analytických metod.
- Osvojení si analytické metody pro zkoumanou matrici, pořízení souboru vzorků (vybraných produktů minipivovarů a komerčních pivovarů), provedení analýz biogenních aminů.
- Zpracování získaných dat a diskuse získaných výsledků s literárními údaji.

7 Experimentální část

7.1 Použité chemikálie, přístroje a zařízení

Chemikálie:

- 1,7-heptandiamin, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Aceton, Penta, Chrudim, ČR
- Acetonitril pro HPLC (gradient grade), Merk, Německo
- Dansylchlorid, Sigma-Aldrich, Německo
- Destilovaná voda, Premier, Phoenix, AZ, USA
- Dusík (UN 1066), Linde Technoplyn, ČR
- Fenylethylamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Histamin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Hydrogenuhličitan sodný, Lach-Ner, Neratovice, ČR
- Kadaverin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Kyselina chloristá, Acros, Geel, Belgie
- n-Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Putrescin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Tyramin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Tryptamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Uhličitan draselný, Penta, Chrudim, ČR
- Uhličitan sodný, Penta, Chrudim, ČR

Přístroje a zařízení:

- standardní laboratorní vybavení
- analytické váhy B 204, Kem Německo
- pH-metr pH 700, Eutech Instruments, Sigapore
- magnetická míchačka MR Hei-Mix S, Heidolph, Německo
- skleněné vialky (V = 5 ml) s černým plastovým uzávěrem, Fisher Scientific, Česká republika
- skleněné vialky (V = 2 ml) s modrým uzávěrem se septem, Fisher Scientific, Česká republika

-
- skleněný filtrační papír (typ Z-7, velikost pórů 1,7 μm), papírna Pernštejn, Česká republika
 - injekční filtrační zařízení, Fortuna Optima, Německo
 - přístroj pro odpařování Termovap, Ecom s.r.o., Česká republika
 - automatické pipety: Transferpette 20-200 μl , Transferpette S 1000 μl , Brand, Německo
 - třepačka LT 2, Kavalier, Česká republika
 - kapalinový chromatograf UPLC Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC systém, Agilent Technologies, USA
 - chromatografická kolona Zorbax Eclipse XDB – C18 (50 mm x 4,6 mm ID, 1,8 μm velikost částic), Agilent Technologies, USA

7.2 Příprava vzorků k měření

7.2.1 Výběr a označení vzorků

Pro tento výzkum bylo použito sedm vzorků piva. Pět piva bylo z jihočeských minipivovarů a další dvě z komerčních pivovarů pro porovnání. Jelikož tyto pivovary není možné jmenovat, dále budou nazývány jako vzorek P1–7.

1. Označení vzorků piva: pivo P1–7. Od každého druhu piva byly připraveny 3 paralelní vzorky s označením P1-1, P1-2, P1-3.
2. Vyčerení piva
 - a. Do velké odsávací lahve (1 l) bylo odlito cca 50 ml vzorků.
 - b. Odsávací nádoba byla připevněna na vývěvu a pustila se voda. Ústí nádoby bylo uzavřeno pryžovou zátkou, tak aby se v průběhu čerení mohla zátka uvolňovat, jelikož by vzorek piva mohl pod tlakem vypěnit a přetéct do odpadu.
 - c. Tento postup byl opakován tak dlouho, dokud daný vzorek piva obsahoval oxid uhličitý.
 - d. Vyčerené pivo bylo přelito do skladovacích a předem označených nádob (P1–7, datum přípravy, iniciály laboranta/ky), bylo pečlivě uzavřeno a uchováno při nízké teplotě v lednici maximálně 1 až 2 dny.

7.2.2 Příprava kalibrační řady:

- Slepý vzorek (blank) a 6 vzorků kalibrační řady bylo připraveno dle tabulky 2.

Tabulka 2: Tabulka pro přípravu kalibrační řady

kalibrační vzorek	roztok HClO ₄ [μl]	roztok směsného standardu [μl]	koncentrace c [μg/ml]
0	1000	–	0
CAL 1	975	25	1
CAL 2	950	50	2
CAL 3	875	125	5
CAL 4	750	250	10
CAL 5	500	500	20
CAL 6	–	1000	40

Kalibrační řada byla připravena zároveň s testovacími vzorky (ve stejný den) a stejný je i postup derivatizace při následné přípravě vzorků k měření.

7.2.3 Derivatizace

- Byl pipetován 1 ml vzorku do plastových kyvet $V = 10$ ml s uzávěrem.
- Přidalo se 100 μl vnitřního standardu (roztok 1,7-heptandiaminu v 0,6M HClO₄, 400 ppm).
- K neutralizaci byl přidán 1,5 ml uhličitánového roztoku, který byl připraven předem dle tabulky 3.

➤ Příprava uhličitánového roztoku:

- Uhličitánový roztok byl pipetován dle následující tabulky 3 a celkového počtu 21 vzorků.
- Příprava roztoku AB:
A: Na₂CO₃ 2,65 g ad 50 ml
B: NaHCO₃ 4,2 g ad 100 ml

pH pufru roztoku B bylo nastaveno pomocí roztoku A na hodnotu 9,2 na pH-metru.

Tabulka 3: Množstevní tabulka pro přípravu uhličitanového roztoku

počet vzorků	1	2	4	5	6	8	10	30
K ₂ CO ₃ (g)	0,666	1,332	1,998	2,664	3,33	4,664	5,328	15,984
AB (ml)	2	4	6	8	10	14	16	48

- d. Přidaly se 2 ml derivatizačního činidla dansylchloridu (Dns-Cl, 0,3020 g/ 60 ml acetonu). Tento roztok musí být vždy čerstvý.
- e. Všechny vzorky byly pečlivě uzavřeny a uloženy na třepačku, kde se nechaly třepat ve tmě a při laboratorní teplotě 20 hodin.
- f. Přidalo se 200 µl roztoku prolinu (0,1 g/1 ml H₂O) a ještě hodinu byly nechány se třepat ve tmě. Roztok prolinu nemusí být čerstvý. Připraven předem a uložen v lednici.
- g. Extrakce do heptanu: do všech vzorků byly přidány 3 ml heptanu, vzorky byly uzavřeny a v ruce protřepány převrácením nahoru a dolů po dobu 2,5 minuty.
- h. Vzorky se ponechaly chvíli ustát, aby se rozdělily polární a nepolární vrstvy (vytvoří se rozhraní mezi nimi).
- i. Odebral se 1 ml supernatantu (horní bezbarvá vrstva) do předem označených skleněných vialek (V = 5 ml) s černým plastovým uzávěrem.
- j. Tyto připravené vialky se vzorky byly postupně umístěny do přístroje pro odpařování (max. 12 kusů) a vzorky byly při teplotě 60 °C odpařeny do sucha pod dusíkem.
- k. Následně byly vysušené vzorky rozpuštěny v 1,5 ml 100% acetonitrilu (Ac-CN) a vialka byla uzavřena.
- l. Rozpuštěný odparek vzorku byl dále přefiltrován přes skleněný filtrační papír (typ Z-7, velikost pórů 1,7 µm) za pomoci speciálního skleněného filtračního zařízení s pístem (skleněná stříkačka)

a závitem pro našroubování plastové části s umístěným skleněným filtrem. Vzorky byly přefiltrovány do předem označených skleněných vialek ($V = 2$ ml) s modrým uzávěrem se septem.

- Takto připravené vzorky byly uloženy do krabičky s názvem a datem přípravy, která byla uložena se do lednice a vzorky byly připravené k měření na ultraúčinném kapalinovém chromatografu UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) pro zjištění obsahu biogenních aminů.

7.2.4 Stanovení a vyhodnocení obsahu biogenních aminů

Obsah biogenních aminů ve vzorcích pív byl stanovován pomocí (UPLC). UPLC účinně stanoví PUT, CAD, SPM, SPD, PEA, HIS, TRM a TYM ve vybraných vzorcích potravin. Těchto osm BA, které jsou nejdůležitější pro stanovení ve vzorcích potravin, bylo před separací UPLC derivatizováno dansylchloridem. Tato analýza je velmi rychlá, a proto jsou všechny BA dobře rozděleny z roztoku v koloně za méně než 6 minut (Dadáková *et al.*, 2009).

Směsný standartní roztok BA pro jejich stanovení byl připraven v koncentraci 400 mg/l v 0,6 M HClO₄ a pro experiment byl dále ředěn (Dadáková *et al.*, 2009).

Vzorky pív byly před stanovením upraveny odstraněním oxidu uhličitého pomocí odsávací nádoby připevněné k vývěvě. Dále byly použity k derivatizaci podle výše uvedeného postupu bez dalšího ředění.

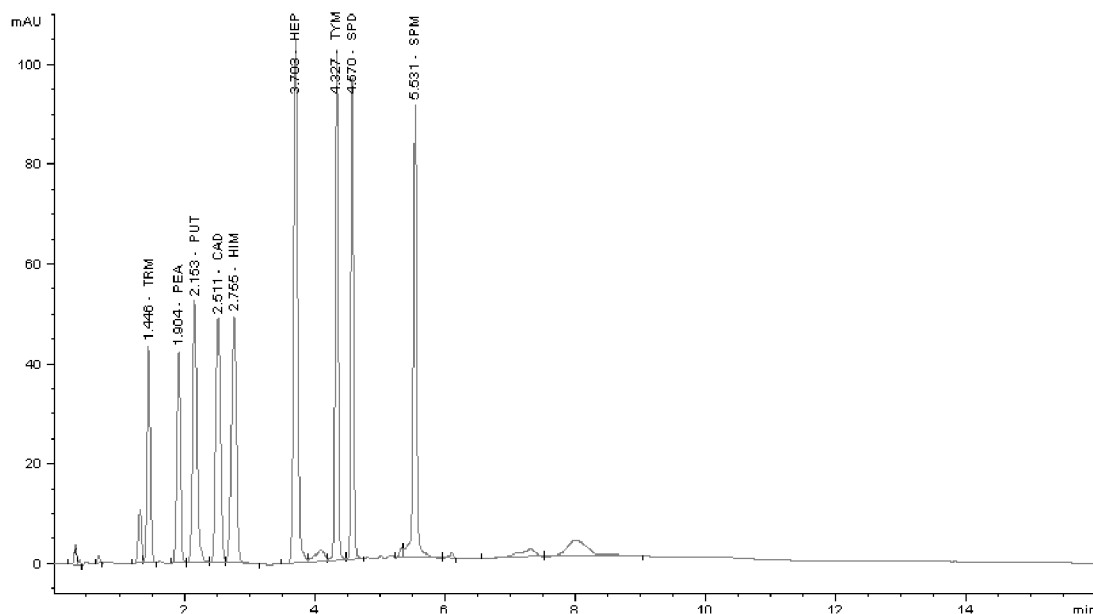
Následná chromatografická separace byla provedena na koloně Agilent Zorbax Eclipse XDB - C18 (50 x 4,6 mm ID, 1,8 μ m) vybavené in-line filtrem (0,2 μ m; Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA). Průtoková rychlost byla udržována na 1,0 ml/min, při teplotě kolony 25 °C, objem nástřiku byl 5 μ l a odezva byla odečítána při vlnové délce 225 nm (Dadáková *et al.*, 2009).

Obrázek 9 ukazuje chromatogram standartního roztoku dansylamidů, získaný separací s gradientovou elucí. Celá metoda tedy trvá pouze dvanáct minut (Dadáková *et al.*, 2009).

Obrázek 10 znázorňuje příklad vzorku piva P2. Ve vzorku bylo prokázáno množství PUT, CAD, TYM, SPD a SPM.

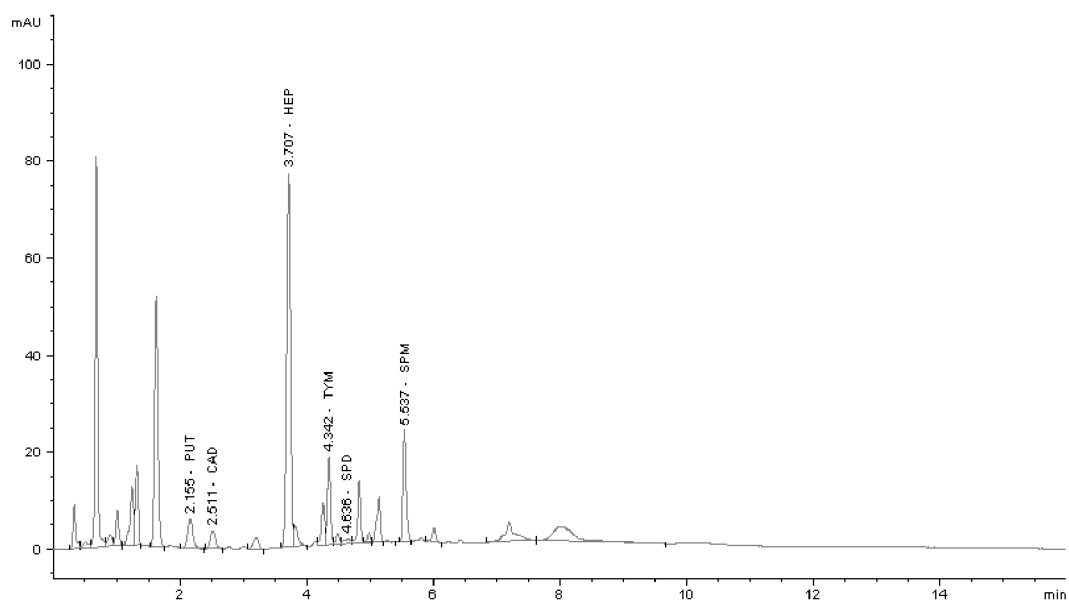
Obrázek 11 znázorňuje příklad kalibračního grafu pro PUT.

Výpočet obsahu jednotlivých aminů ve vzorcích byl proveden metodou výpočtu z kalibrační závislosti. Jako analytická odezva byl použit ve všech případech poměr odezvy každého aminu a odezvy vnitřního standardu. Mez stanovitelnosti pro všechny sledované aminy byla 1 mg/l nápoje.



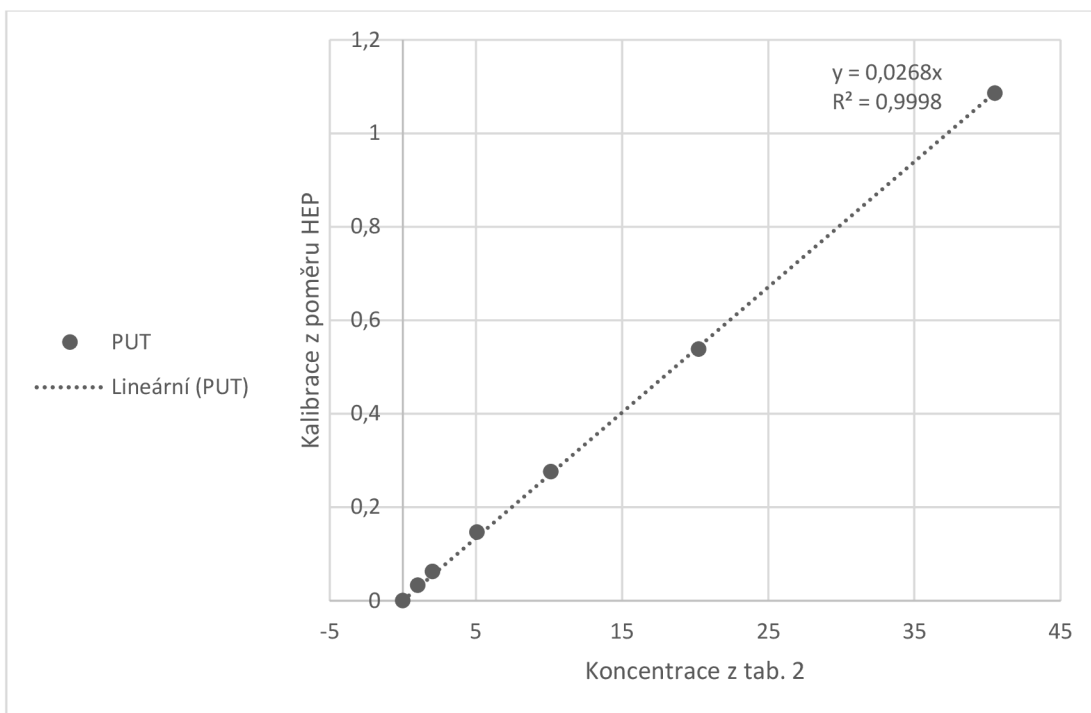
Obrázek 9: Separace standartní směsi BA jako dansylamidů

Koncentrace BA (zaokrouhloeno na tři platné číslice): TRM: 1,45 mg/l, PEA: 1,90 mg/l, PUT: 2,15 mg/l, CAD: 2,51 mg/l, HIM: 2,76 mg/l, HEP (vnitřní standard): 3,70 mg/l, TYM: 4,33 mg/l, SPD: 4,57 mg/l, SPM: 5,53 mg/l



Obrázek 10: Chromatogram vzorku P2

Obsah BA ve vzorku P2 (zaokrouhлено na tři platné číslice): PUT: 2,16 mg/l, CAD: 2,51 mg/l, HEP: 3,71 mg/l, TYM: 4,34 mg/l, SPD: 4,64 mg/l, SPM: 5,54 mg/l



Obrázek 11: Graf kalibrace PUT

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programů ChemStation ver. 3, Agilent Technologies, USA a Excel Microsoft Office 365.

8 Výsledky a diskuse

Mezi nejčastěji vyskytované biogenní aminy ve fermentovaných potravinách patří TRM, PEA, PUT, CAD, HIS, TYM, SPD a SPM. Ovšem v našich vzorcích piv z minipivovarů jižních Čech jsme našli pouze PUT, CAD, TYM, SPD a SPM. Aminy TRM, PEA a HIS nebyly ve vzorcích nalezeny, SPD byl detekován, ale jeho obsah byl ve všech případech pod mezí stanovitelnosti metody.

V následujících tabulkách jsou zobrazeny kompletní a průměrné výsledky experimentu, vypočítané jako průměrná hodnota tří měření (mg/l) se směrodatnou odchylkou (\pm SD). Je možné vidět, že nejvíce zastoupený BA, jak mezi minipivovary, tak komerčními pivovary, je SPM s hodnotami 5,21–7,21 mg/l a nejméně SPD s hodnotami 0,45–0,95 mg/l.

Tabulka 4: Kompletní výsledky velikosti plochy měření a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích pív minipivovarů

označení		TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	HEP (VS)	TYM	SPD	SPM
P1-1	plocha :	0	0	29,5	11,2	0	399	46,5	4,89	73,7
	mg/l :	0	0	2,75	1,05	0		3,30	0,40	5,38
P1-2	plocha :	0	0	22,0	8,75	0	300	37,6	3,72	57,6
	mg/l :	0	0	2,72	1,09	0		3,55	0,41	5,59
P1-3	plocha :	0	0	21,7	9,19	0	309	45,3	5,08	68,9
	mg/l :	0	0	2,62	1,12	0		4,16	0,54	6,51
P2-1	plocha :	0	0	34,5	22,7	0	365	59,4	9,66	76,0
	mg/l :	0	0	3,51	2,34	0		4,61	0,87	6,06
P2-2	plocha :	0	0	32,2	20,9	0	334	63,6	8,81	83,8
	mg/l :	0	0	3,59	2,35	0		5,39	0,86	7,30
P2-3	plocha :	0	0	32,2	20,2	0	329	67,8	11,2	92,4
	mg/l :	0	0	3,65	2,31	0		5,84	1,12	8,19
P3-1	plocha :	0	0	33,9	13,7	0	347	46,7	7,34	69,5
	mg/l :	0	0	3,63	1,48	0		3,81	0,69	5,83
P3-2	plocha :	0	0	43,8	15,6	0	370	53,9	8,23	80,0
	mg/l :	0	0	4,41	1,58	0		4,13	0,73	6,29
P3-3	plocha :	0	0	41,8	14,8	0	338	56,1	8,04	85,9
	mg/l :	0	0	4,61	1,64	0		4,71	0,78	7,40
P4-2	plocha :	0	0	39,3	10,8	0	371	47,8	3,99	67,9
	mg/l :	0	0	3,95	1,09	0		3,65	0,35	5,34
P4-3	plocha :	0	0	40,1	9,65	0	371	51,4	9,34	68,6
	mg/l :	0	0	4,02	0,98	0		3,93	0,83	5,38
P5-1	plocha :	0	0	51,2	14,4	0	363	53,9	7,62	89,7
	mg/l :	0	0	5,25	1,49	0		4,21	0,69	7,20
P5-2	plocha :	0	0	45,3	12,9	0	352	56,8	6,99	89,5
	mg/l :	0	0	4,80	1,37	0		4,58	0,65	7,41
P5-3	plocha :	0	0	53,3	14,0	0	390	51,8	7,29	82,9
	mg/l :	0	0	5,09	1,35	0		3,77	0,61	6,19

**Tabulka 5: Kompletní výsledky velikosti plochy měření a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv
komerčních pivovarů**

P6-1	plocha :	0	0	39,3	20,3	0	354	53,0	5,48	84,5
	mg/l :	0	0	4,14	2,15	0		4,25	0,51	6,97
P6-2	plocha :	0	0	33,0	17,8	0	344	53,1	5,57	78,3
	mg/l :	0	0	3,57	1,94	0		4,38	0,53	6,63
P6-3	plocha :	0	0	28,5	15,9	0	325	57,5	8,92	89,7
	mg/l :	0	0	3,27	1,85	0		5,02	0,90	8,05
P7-1	plocha :	0	0	33,4	12,0	0	379	35,4	3,32	60,5
	mg/l :	0	0	3,28	1,19	0		2,65	0,29	4,65
P7-2	plocha :	0	0	33,0	10,7	0	379	41,5	6,33	74,6
	mg/l :	0	0	3,24	1,06	0		3,10	0,55	5,74
P7-3	plocha :	0	0	27,5	9,9	0	339	42,5	7,36	61,0
	mg/l :	0	0	3,02	1,09	0		3,56	0,71	5,25

Tabulka 6: Průměrné výsledky ploch a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv minipivovarů (průměr ± SD; n=3)

P1	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	24,4	9,71	335	43,1	4,57	66,8
Průměrná koncentrace mg/l	2,70± 0,1	1,01±0,03		3,67± 0,4	0,45± 0,1	5,83± 0,6
P2	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	32,9	21,27	342	63,6	9,90	84,1
Průměrná koncentrace mg/l	3,58± 0,1	2,33± 0,02		5,28± 0,6	0,95± 0,2	7,18± 1,1
P3	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	39,8	14,6	351	52,3	7,9	78,4
Průměrná koncentrace mg/l	4,22± 0,5	1,57± 0,1		4,22± 0,5	0,73± 0,04	6,51± 0,8
P4	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	39,7	10,2	371	49,6	6,67	68,3
Průměrná koncentrace mg/l	3,99± 0,1	1,03± 0,1		3,75± 0,2	0,59± 0,3	5,36± 0,03
P5	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	33,9	13,8	368	54,2	7,30	87,4
Průměrná koncentrace mg/l	5,05± 0,2	1,40± 0,1		4,18± 0,4	0,65± 0,03	6,93± 0,7

Tabulka 7: Průměrné výsledky ploch a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv komerčních pivovarů (průměr ± SD; n=3)

P6	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	33,6	18,0	340	54,5	6,65	84,2
Průměrná koncentrace mg/l	3,66± 0,4	1,98± 0,2		4,55± 0,4	0,65± 0,2	7,21± 0,7
P7	PUT	CAD	HEP	TYM	SPD	SPM
Průměrná plocha měření	31,3	10,9	365	39,8	5,67	65,4
Průměrná plocha koncentrace mg/l	3,18± 0,1	1,12± 0,1		3,10± 0,5	0,52± 0,2	5,21± 0,5

Dle různých záznamů jsem zjistila, že obsah BA v pivech byl stanovován již cca od roku 1980. V té době nebyly technologie pro přesné stanovení BA tak citlivé, a proto bylo možno stanovit pouze vyšší hodnoty než dnes.

Obsah PUT se v analyzovaných druzích piv minipivovarů pohyboval v rozsahu 2,70–5,05 mg/l. K porovnání jsem použila dvě studie zaměřující se na stanovení obsahu BA v pivech a jednu ve vínech. Dle studie z roku 2023, kde bylo zkoumáno množství BA ve vzorcích německých piv z minipivovarů. V tomto výzkumu byly BA stanovovány analytickou metodou založenou na iontové párové chromatografii ve spojení s potenciometrickou detekcí. Tato studie ukázala že obsah PUT ve vybraných vzorcích piv se pohybuje v rozmezí 0,37–0,51 mg/l, což je značně nižší obsah než tomto experimentu. (Gil *et al.*, 2023). Čínská studie z roku 2009 zkoumala obsah BA v komerčně dostupných místních pivech. Obsah BA v těchto vzorcích byl stanovován metodou předkolonové derivatizace aminů pomocí 4-chlor-3,5-dinitrobenzotrifluoridu a následnou analýzou pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází (RP–HLPC) s detekcí diodového pole. Této studie ukazuje, že obsah PUT v jimi zkoumaných vzorcích se pohyboval v rozmezí 5,7–72,0 mg/l. Tato hodnota je oprati výsledkům tohoto experimentu značně vyšší (Tang *et al.*, 2009). Pro porovnání obsahu PUT v jiné fermentované

potravině, jsem použila studii z roku 2022, kde byl stanovován obsah PUT ve vínech různého druhu. Toto stanovení bylo provedeno pomocí disperzní mikroextrakce v systému kapalina–kapalina a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (DLLME–GC–MS). V této studii bylo prokázáno, že obsah PUT ve vínech je značně nižší než v pivu, a to v rozmezí 0,18–0,48 mg/l (Stój *et al.*, 2022).

Obsah CAD se v analyzovaných druzích piv minipivovarů pohyboval v rozsahu 1,01–2,33 mg/l. K porovnání jsou použita dvě studie zabývající se stanovením BA jen v pivech a jednu, která se zabývá stanovením BA v pivech a vínu. Studie z roku 2012 byla zaměřena stanovení BA ve 20 vzorcích piv minipivovarů v různých oblastech Koreje. Stanovení obsahu BA v této studii probíhalo pomocí derivatizace dansylchloridem a následnou analýzou pomocí HPLC. Průměrný obsah CAD v této studii se pohybuje v rozmezí 1–5,89 mg/l, což jsou podobné hodnoty jako v tomto experimentu (Choi *et al.*, 2012). Studie z roku 2015 se zabývala stanovením BA v komerčních vzorcích piva a vína z Brazílie pomocí metody kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií (CE–MS/MS) pro simultánní stanovení devíti BA. V tomto výzkumu bylo zjištěno, že koncentrace CAD v pivech se pohybuje v rozmezí 0,16–0,31 mg/l a ve vínech se pohybuje v rozmezí 0,15–0,17 mg/l. Tyto hodnoty jsou v porovnání s výsledky toho experimentu nižší, což může poukazovat na mírně odlišný proces výroby fermentovaných potravin a odlišnosti použitých surovin k jejich výrobě (Daniel *et al.*, 2015). Studie z roku 2002 stanovila obsah BA ve vzorcích polských komerčních pivech. Pro tuto studii byla použita metoda HPLC a spektrofotometrická detekce po postkolonové derivatizaci dansylchloridem. V této studii se obsah CAD pohyboval v rozmezí 0,33–1,57 mg/l, což jsou hodnoty podobné v porovnání s tímto experimentem, avšak zde byly naměřeny i vyšší hodnoty (Slomkowska, Ambroziak, 2002).

Obsah TYM se v analyzovaných druzích piv minipivovarů pohyboval v rozsahu 3,67–5,28 mg/l. K porovnání zjištěných hodnot TYM jsem vybrala dvě studie, které se zaměřily na stanovení obsahu BA v pivech a jednu studii zaměřenou na stanovení BA ve víně. Studie z roku 1999 stanovovala obsah BA v brazilských pivech metodou iontové párové chromatografie na obrácené fázi a fluorimetrickou detekcí po postkolonové derivatizaci o-ftaldialdehydem. Tato studie stanovila obsah TYM v rozsahu 0,30–0,81 mg/l, což je oproti hodnotám tohoto experimentu značně nižší obsah (Glória *et al.*, 1999). Ve studii z roku 2002 byl zkoumán obsah BA

v lahvových pivech podobu několika dní. Do tohoto porovnání jsem použila hodnoty nultého dne, jelikož vzorky pro tento experiment byly zpracovány ihned po jejich sehnání. Tato studie použila metodu elektrokinetické kapilární chromatografie. Výsledné hodnoty obsahu TYM v této studii se pohybovaly v rozmezí 10,5–102 mg/l, což jsou značně vyšší hodnoty než ty stanovené v tomto experimentu (Kalač *et al.*, 2002). Pro porovnání s jinými fermentovanými potravinami (víno) jsem zvolila studii z roku 2012, jejíž cílem bylo stanovit obsah BA v mladých vínech z oblasti Chile. Pro tento výzkum byla použita metoda kapalinové chromatografie s předkolumnovou derivatizací pro spolehlivější určení množství nejdůležitějších BA ve víně. V této studii byl stanoven obsah TYM v rozsahu 2,03–7,24 mg/l (Pineda *et al.*, 2012).

Obsah SPD byl v analyzovaných druzích piv minipivovarů detekován, ale jeho koncentrace se pohybovala v rozsahu 0,45–0,95 mg/l, což jsou hodnoty pod mezí stanovitelnosti analytické metody. Pro srovnání s literárními daty jsou výsledky také uvedeny v tabulkách 4 a 5. Studie z roku 1995 se zabývala stanovením obsahu BA v pivech. K tomuto výzkumu byla použita metoda HPLC. Hodnoty obsahu SPD v tomto výzkumu byly stanoveny v rozsahu 0,29–1,39 mg/l. tyto hodnoty se podobají naměřeným hodnotám tohoto experimentu (Buiatti *et la.* 1995). Za posledních několik let můžeme narazit na výzkum z roku 2020, kde byla zkoumaná piva z minipivovarů středoevropského regionu. V tomto výzkumu bylo prokázáno, že tato piva obsahují vyšší hladiny koncentrace SPD, které jsou ovšem nižší než 20 mg/l, tak jako v našem experimentu. Vyšší hladinu SPD lze vysvětlit jeho úlohou v metabolismu nukleových kyselin a jeho přítomností v alkoholických nápojích včetně piv. Přítomnost SPD může být odvozena z kvasinek a jejich zbytků, či druhu sladu (Lorencová *et al.*, 2020). Pro porovnání obsahu SPD ve víně jsem použila studii z roku 2012, která se zabývala stanovením BA v chilských rezervních odrůdových vínech. Pro tento výzkum byla použita metoda HPLC. V této studii bylo prokázáno že obsah SPD v chilských vínech se pohybuje v rozsahu 0,27–7, mg/l. Tato studie tedy ukazuje, že maximální hodnota obsahu SPD je značně vyšší než v pivech (Henríquez-Aedo *et al.*, 2012).

Obsah SPM se v analyzovaných druzích piv minipivovarů pohyboval v rozsahu 5,36–7,18 mg/l. Bulharská studie z roku 2003 se zabývá stanovením aminokyselin a BA v pivech a víně pomocí HPLC pro simultánní analýzu s využitím nového postupu předkolumnové derivatizace aminoskupin

N-(9-fuorenylmethoxykarbonyloxy) sukcinimidu. V této studii bylo prokázáno, že obsah SPM v místních pivech se pohybuje v rozsahu 0,02–0,08 mg/l, což jsou značně nižší hodnoty oproti tomuto experimentu (Lozanov *et al.*, 2004). Pro porovnání hodnot obsahu SPM v pivech jsem vybrala studii z roku 2007, která se zabývá stanovením obsahu BA v řeckých vínech. Pro tuto studii byla použita metoda HPLC a ultrafialové detekce pro předkolonovou derivatizaci dansylchloridem. Výsledky této studie stanovily, že obsah SPM se ve vzorcích řeckých vín pohybuje v rozsahu 0–4,85 mg/l, což dokazuje nižší obsah SPM ve víně než v pivu (Soufleros *et al.*, 2007).

K porovnání můžeme také nahlédnout výzkumu z roku 2023, kde byl stanovován obsah BA v pivech čínských pivovarů. Tento výzkum prokázal vyšší obsah toxických BA jako je HIS a TYR, které v tomto experimentu nebyly prokázány, což je velmi dobře. Tyto BA jsou z toxikologického hlediska hodnoceny jako nejzávažnější. Ovšem česká piva z minipivovarů, použitá v tomto experimentu, obsahují vyšší koncentrace SPM než v nedávné čínské studii (Li *et al.*, 2023).

Zjištěné obsahy BA a PA v pivu jsou poměrně nízké v porovnání s dalšími fermentovanými potravinami. V případě masných výrobků mohou obsahy sledovaných aminů dosáhnout různých hodnot. Obsah SPM a SPD v čerstvém mase může dosáhnout množství až 60 mg/kg a během skladování se se může zvyšovat obsah HIS, CAD, PUT a TYM až o 15 mg/kg, což je považováno za index kažení (Schirone *et al.*, 2022). V případě hub se hodnoty TRM a TYM pohybují obvykle do 5mg/kg, PEA se pohybuje v rozmezí od nedetekovatelné hladiny až po 38 mg/kg, hodnoty PUT mohou přesahovat hodnoty až přes 150 mg/kg a SPD s SPM se pohybují na úrovni desítek mg/l (Dadáková *et al.*, 2009). U zrajících sýrů se celkové hodnoty sledovaných aminů pohybují v rozmezí 100–2400 mg/kg, přičemž převažují toxikologicky významné BA, HIS a TYM. Přítomnost BA je pro spotřebitele a výrobce sýrů velice důležitá vzhledem k potenciální hrozbě toxicity pro člověka možným následným obchodním dopadům (Schirone *et al.*, 2012).

Jak je vidět z výsledků této práce, nejsou obsahy sledovaných BA a PA v produktech vybraných minipivovarů nijak vysoké. Zdálo by se, že nemohou představovat nijak velké zdravotní riziko, Když se však přihlédne k množství konzumovaného piva v České republice, představuje pravidelný přísun těchto potenciálně rizikových komponent zcela jistě zdravotní zátěž.

9 Závěr

Bakalářská práce byla zaměřena na stanovení biogenních aminů ve vzorcích piv vybraných minipivovarů z jižních Čech a vzorcích piv z komerčních pivovarů pro porovnání. V této práci byla představena technologie pivovarnictví, co jsou BA a jejich popis. Dále byla představena metodika práce a stanovení koncentrace vybraných BA ve vzorcích piv. Cílem práce bylo stanovit přesné koncentrace BA v jednotlivých druzích piv minipivovarů metodou UPLC s pomocí předchozí derivatizace dansylchloridem. Ve všech vzorcích piv byl stanovován obsah TRM, PEA, PUT, CAD, HIS, TYM, SPD a SPM. Ovšem v našich vzorcích piv z minipivovarů jižních Čech jsme našli pouze PUT, CAD, TYM, SPD a SPM, avšak obsah TRM, PEA a HIS byl ve všech případech pod mezí stanovitelnosti metody. Celkové množství vznikajících BA silně závisí na povaze potravin a v nich přítomných mikroorganismech. Dále se také jejich koncentrace odvíjí od použité technologie výroby daných fermentovaných produktů, druhu použitých surovin, a hlavně od hygieny práce a pracovního prostředí.

Nejvyšší hladiny koncentrace BA byly naměřeny ve vzorku piva P-2 s celkovým průměrným množstvím 19,32 mg/l, oproti tomu nejnižší hladiny koncentrace BA byly naměřeny ve vzorku piva P-1 s celkovým průměrným množstvím 13,66 mg/l. Všechny druhy piv byly stanovovány ve 3 vzorcích, jejichž hodnoty byly následně zprůměrovány a byla k nim vypočtena směrodatná odchylka. Jak bylo již zmíněno, tak v tomto stanovení byly nalezeny jen PUT, CAD, TYM, SPD a SPM v mezích stanovitelnosti. Nejvyšší koncentrace PUT byly prokázány ve vzorku piva P-5 s hodnotou 5,05 mg/l a nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorku P-1 s hodnotou 2,70 mg/l. Nejvyšší koncentrace CAD byly prokázány ve vzorku piva P-3 s hodnotou 2,33 mg/l a nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorku P-1 s hodnotou 1,01 mg/l. Nejvyšší koncentrace TYM byly prokázány ve vzorku piva P-2 s hodnotou 5,28 mg/l a nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorku P-1 s hodnotou 3,67 mg/l. Nejvyšší koncentrace SPD byly prokázány ve vzorku piva P-2 s hodnotou 0,95 mg/l a nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorku P-1 s hodnotou 0,45 mg/l, a nakonec nejvyšší koncentrace SPM byly prokázány ve vzorku piva P-2 s hodnotou 2,33 mg/l a nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorku P-4 s hodnotou 5,36 mg/l.

Na konci práce byly naměřené hodnoty srovnány s hodnotami v jiných studiích a porovnány s hodnotami ve víně (jakožto zástupce jiné fermentované potraviny) a bylo zjištěno, že některé hodnoty jsou vyšší, některé jsou nižší a některé si jsou dost podobné. To poukazuje, na již výše zmíněné rozdíly v technologii výroby a použitých surovinách.

10 Přehled použité literatury

Články:

ALMEIDA, C.; FERNANDES, J.O. a CUNHA, S.C. A novel dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. Online. *Food Control*. 2012, roč. 25, č. 1, s. 380-388. ISSN 09567135.

ANDERSEN, Gaby; MARCINEK, Patrick; SULZINGER, Nicole; SCHIEBERLE, Peter a KRAUTWURST, Dietmar. Food sources and biomolecular targets of tyramine. Online. *Nutrition Reviews*. 2019, roč. 77, č. 2, s. 107-115. ISSN 0029-6643.

BASAŘOVÁ DRSC., Prof. ing. Gabriela a ČEPIČKA CSC., ing. Jaroslav. *Sladařství a Pivovarnictví*. 2. nezměněné. SNTL - Nakladatelství technické literatury n. p., 1986 (173-174).

BODMER, S.; IMARK, C. a KNEUBÜHL, M. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. Online. *Inflammation Research*. 1999, roč. 48, č. 6, s. 296-300. ISSN 1023-3830.

BOROWIEC, Pavel a TITZLOVÁ, Marcela. *Kniha o pivu: jak pivo poznávat, ochutnávat a párovat s jídlem*. Praha: Smart Press, 2017. ISBN 978-80-87049-96-9.

DADÁKOVÁ, E., PEKIKÁNOVÁ, T. & KALÁČ, P. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *Eur Food Res Technol* **230**, 163–171 (2009).

DADÁKOVÁ, Eva; KRÍŽEK, Martin a PELIKÁNOVÁ, Tamara. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Online. *Food Chemistry*. 2009, roč. 116, č. 1, s. 365-370. ISSN 03088146.

DEL RIO, Beatriz; REDRUELLO, Begoña; LINARES, Daniel M.; LADERO, Victor; RUAS-MADIEDO, Patricia et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322.

GASARASI, G; KELGTERMANS, Marc; VERSTREPEN, Kevin; VAN ROY, J; DELVAUX, Fredy et al. *Occurrence of biogenic amines in beer: causes and proposals of remedies*. Online. 2003, č. 56. 2003. ISSN 0723-1520.

GROSSMAN, Paul D. a COLBURN, Joel C. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 1992. ISBN 0-12-304250-X.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, Ágnes a HOLZAPFEL, Wilhelm H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. Online. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1999, roč. 208, č. 5-6, s. 418-423. ISSN 1431-4649.

CHEN, Chen; WANG, Ximo; ZHANG, Yingfang; LI, Xingying; GAO, Huiju et al. A molecularly-imprinted SERS sensor based on a TiO₂@Ag substrate for the selective capture and sensitive detection of tryptamine in foods. Online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 394. ISSN 03088146.

CHOI, SEUNGYOUNG; LEE, JONG-KI; SHUKLA, SHRUTI a KIM, MYUNGHEE. PHYSIOCHEMICAL PROPERTIES AND DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN KOREAN MICROBREWERY BEER PRODUCTS. Online. *Journal of Food Biochemistry*. 2012, roč. 36, č. 6, s. 766-773. ISSN 01458884

KADLEC, Pavel; MELZOCH, Karel a VOLDŘICH, Michal. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Monografie (Key Publishing). Ostrava: Key Publishing, 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.

KOLLER, Hayden a PERKINS, Lewis B. Brewing and the Chemical Composition of Amine-Containing Compounds in Beer: A Review. Online. *Foods*. 2022, roč. 11, č. 3. ISSN 2304-8158.

KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 978-80-7157-757-7.

KŘÍŽEK, M. a Kalač, P. Biogenic amines in foods and their role in human nutrition. *Czech Journal of Food Sciences*. 1998, 16, 151–159.

KŘÍŽEK, M., KALAČ, P.: Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. *Czech Journal of Food Science* 16, 1998

KŘÍŽEK, Martin a ŠÍMA, Jan. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.

LI, Chenyu; HAN, Xiaoyu; HAN, Bing; DENG, Huan; WU, Tianyang et al. Survey of the biogenic amines in craft beer from the Chinese market and the analysis of the formation regularity during beer fermentation. Online. *Food Chemistry*. 2023, roč. 405. ISSN 03088146.

LORENCOVÁ, Eva; SALEK, Richardos Nikolaos; ČERNÍKOVÁ, Michaela; BUŇKOVÁ, Leona; HÝLKOVÁ, Aneta et al. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. Online. *Food Control*. 2020, roč. 117. ISSN 09567135.

MA, Weichao; CHEN, Kequan; LI, Yan; HAO, Ning; WANG, Xin et al. Advances in Cadaverine Bacterial Production and Its Applications. Online. *Engineering*. 2017, roč. 3, č. 3, s. 308-317. ISSN 20958099.

MADEO, Frank; EISENBERG, Tobias; PIETROCOLA, Federico a KROEMER, Guido. Spermidine in health and disease. Online. *Science*. 2018, roč. 359, č. 6374. ISSN 0036-8075.

MAINTZ, Laura a NOVAK, Natalija. Histamine and histamine intolerance. Online. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, roč. 85, č. 5, s. 1185-1196. ISSN 00029165.

MARCOBAL, Angela; DE LAS RIVAS, Blanca; LANDETE, José María; TABERA, Laura a MUÑOZ, Rosario. Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, roč. 52, č. 5, s. 448-467. ISSN 1040-8398.

MUÑOZ-ESPARZA, Nelly C.; LATORRE-MORATALLA, M. Luz; COMAS-BASTÉ, Oriol; TORO-FUNES, Natalia; VECIANA-NOGUÉS, M. Teresa et al. Polyamines in Food. Online. *Frontiers in Nutrition*. 2019, roč. 6. ISSN 2296-861X.

OHTA, Hiroto; TAKEBE, Youhei; MURAKAMI, Yuka; TAKAHAMA, Yusei a MORIMURA, Shigeru. Tyramine and β -phenylethylamine, from fermented food products, as agonists for the human trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1) in the stomach. Online. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2017, roč. 81, č. 5, s. 1002-1006. ISSN 0916-8451.

PAPAGEORGIU, Myrsini; LAMBROPOULOU, Dimitra; MORRISON, Calum; KŁODZIŃSKA, Ewa; NAMIEŚNIK, Jacek et al. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, roč. 98, s. 128-142. ISSN 01659936.

PETERSEN, John R; OKORODUDU, Anthony O; MOHAMMAD, Amin a PAYNE, Deborah A. Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. Online. *Clinica Chimica Acta*. 2003, roč. 330, č. 1-2, s. 1-30. ISSN 00098981.

RAMON-MARQUEZ, Teresa; MEDINA-CASTILLO, Antonio L.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, Alberto a FERNANDEZ-SANCHEZ, Jorge F. Novel optical sensing film based on a functional nonwoven nanofibre mat for an easy, fast and highly selective and sensitive detection of tryptamine in beer. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, roč. 79, s. 600-607. ISSN 09565663.

SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, č. 2-3, s. 213-231. ISSN 01681605.

SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, č. 2-3, s. 213-231. ISSN 01681605.

SCHIRONE, Maria; ESPOSITO, Luigi; D'ONOFRIO, Federica; VISCIANO, Pierina; MARTUSCELLI, Maria et al. Biogenic Amines in Meat and Meat Products: A Review of the Science and Future Perspectives. Online. *Foods*. 2022, roč. 11, č. 6. ISSN 2304-8158.

SCHIRONE, Maria; TOFALO, Rosanna; VISCIANO, Pierina; CORSETTI, Aldo a SUZZI, Giovanna. Biogenic Amines in Italian Pecorino Cheese. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2012, roč. 3. ISSN 1664-302X.

VIDAUD, Z.; GONZÁLEZ, E. a GARCÍA ROCHÉ, M. O. *Some considerations about the tyramine content of some Cuban beers and wines*. Online. 1989, roč. 33, č. 8. *Nahrung*, 1989, 25.2.1991. ISSN 0027-769X.

WÓJCIK, Wojciech; ŁUKASIEWICZ, Monika a PUPPEL, Kamila. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. Online. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021, roč. 101, č. 7, s. 2634-2640. ISSN 0022-5142.

WUNDERLICHOVÁ, Leona; BUŇKOVÁ, Leona; KOUTNÝ, Marek; JANČOVÁ, Petra a BUŇKA, František. Formation, Degradation, and Detoxification of Putrescine by Foodborne Bacteria: A Review. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, roč. 13, č. 5, s. 1012-1030. ISSN 1541-4337.

YUAN, Weien a LI, Hui. Polymer-based nanocarriers for therapeutic nucleic acids delivery. Online. In: *Nanostructures for Drug Delivery*. Elsevier, 2017, s. 445-460. ISBN 9780323461436.

Internetové zdroje:

Biogenní aminy. Online, Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2007/BVMI0322p/um/Biogenni_aminy_2007_MU.pdf.

Co je minipivovar? Online. Dostupné z: <https://cs.drink-drink.ru/chtotakoe-mikropivovarna-vse-cto-vam-nuzhno-znat-o-nih/>.

DAIMEC, Jan. *HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie – základy a principy*. Online. 2020. Dostupné z: <https://hpst.cz/hplc-vysokoucinna-kapalinova-chromatografie-zaklady-principy>.

HPLC vs. UPLC. Online. Dostupné z: <https://dyadlabs.com/hplc-vs-uplc/>.

Kapilární elektroforéza. Online. Dostupné z: <https://www.amedis.cz/laboratorni-technika/kapilarni-elektroforeza/>.

Putrescine. Online. Dostupné z: <https://ecmdb.ca/compounds/M2MDB000378>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Tryptamin	25
Obrázek 2: 2-Fenylethylamin.....	26
Obrázek 3: Putrescin	26
Obrázek 4: Kadaverin	27
Obrázek 5: Histamin	28
Obrázek 6: Tyramin	29
Obrázek 7: Spermin.....	30
Obrázek 8: Spermidin	30
Obrázek 9: Separace standartní směsi BA jako dansylamidů.....	39
Obrázek 10: Chromatogram vzorku P2	40
Obrázek 11: Graf kalibrace PUT.....	41

Seznam tabulek

Tabulka 1. rozdíly mezi spodními a svrchními pivovarskými kvasinkami	18
Tabulka 2: Tabulka pro přípravu kalibrační řady	36
Tabulka 3: Množstevní tabulka pro přípravu uhličitanového roztoku	37
Tabulka 4: Kompletní výsledky velikosti plochy měření a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv minipivovarů	43
Tabulka 5: Kompletní výsledky velikosti plochy měření a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv komerčních pivovarů.....	44
Tabulka 6: Průměrné výsledky ploch a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv minipivovarů (průměr ± SD; n=3)	45
Tabulka 7: Průměrné výsledky ploch a koncentrace BA (mg/l) ve vzorcích piv komerčních pivovarů (průměr ± SD; n=3).....	46

Seznam použitých zkratk

- AB – směsný roztok uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného
- Ac-CN – acetonitril
- BA- biogenní aminy
- CAD – kadaverin
- CE – kapilární elektroforéza
- CE-MS/MS – kapilární elektroforéza s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií
- CNS – centrální nervová soustava
- CO₂ – oxid uhličitý
- DAO – diamonoxidázy
- DLLME-GC-MS – disperzní mikroextrakce kapalina–kapalina–plynové chromatografie s hmotnostní detekcí
- Dns-Cl – dansylchlorid
- EBC – jednotka udávající intenzitu barvy piva a mladiny
- EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin
- FAD – flavinadenindinukleotidová skupina
- H₂O – voda
- HClO₄ – kyselina chloristá
- HEP – 1,7-heptandiamin
- HIM – histamin
- HPLC – kapalinová chromatografie
- hTAAR – lidské receptory pro stopové aminy
- hTAAR1 – typ lidského receptoru pro stopové aminy
- K₂CO₃ – uhličitan draselný
- MAO – monoaminoxidázy
- Na₂CO₃ – uhličitan sodný
- NaHCO₃ –hydrogenuhličitan sodný
- P 1-7 – označení vzorků (P)iv
- PA – polyaminy
- PEA - 2-fenylethylamin
- PUT – putrescin
- RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází
- SPD – spermidin

SPM – spermin

TRM – tryptamin

TYM – tyramin

UPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie

V – objem

VS – vnitřní standard