

Obsah biogenních aminů v pivech z českých mikropivovarů

Bc. Aneta Hýlková

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Hýlková**
Osobní číslo: **T15689**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Obsah biogenních aminů v pivech z českých mikropivovarů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte pivo jako výrobkovou skupinu a stručně popište technologii výroby piva
2. Stručně charakterizujte biogenní aminy
3. Zaobírejte se faktory ovlivňující výskyt biogenních aminů v pivě

II. Praktická část

1. Odeberete nejméně 100 piv z českých mikropivovarů a založte skladovací pokus
2. Provedte stanovení obsahu biogenních aminů ve vzorcích piv na počátku a konci skladování
3. Výsledky vyhodnoťte a vyvodte závěry

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] **BASAŘOVÁ, G.** Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

[2] **BUŇKA, F., BUDINSKÝ, P., ČECHOVÁ, M., DRIENOVSKÝ, V., PACHLOVÁ, V., MATOULKOVÁ, D., KUBÁŇ, V., BUŇKOVÁ, L.** Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. Journal of the Institute of Brewing. 2012. Vol. 118, No. 2, pp. 213-216.

[3] **KALAČ, P., KRÍŽEK, M.** A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. Journal of the Institute of Brewing. 2003. Vol. 109, No. 2, pp. 123-128.

[4] **IZQUIERDO-PULIDO, M., HERNÁNDEZ-JOVER, T., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M.** Biogenic Amines in European Beers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996. Vol. 44, No. 10, pp. 3159-3163.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

25. dubna 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



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



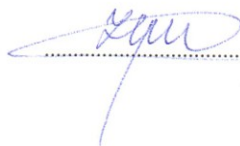
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 2.5.2018



.....

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Biogénne amíny sú prítomné vo fermentovaných výrobkoch, medzi ktoré pivo patrí. Ich prezencia spolu v spojení s alkoholom môže byť pre istú skupinu ľudí nebezpečná. Na prítomnosť biogénnych amínov bolo analyzovaných 115 vzoriek pív pochádzajúcich z 35 českých mikropivovarov. Obsah biogénnych amínov sa analyzoval prostredníctvom HPLC metódy ihneď po zakúpení pív a potom aj po uplynutí dátumu minimálnej trvanlivosti. V každej vzorke boli detekované aspoň 2 biogénne amíny a u každej vzorky bola zistená prítomnosť tyramínu. Celkový obsah biogénnych amínov vyšší ako 100 mg/l bol zistený u 11 vzoriek pív po ich zakúpení a u 14 vzoriek pív po uplynutí dátumu minimálnej trvanlivosti. Niektoré vzorky by u citlivých jedincov mohli spôsobiť zdravotné komplikácie.

Kľúčové slová: biogénne amíny, pivo, mikropivovar, skladovanie

ABSTRACT

Biogenic amines are present in fermented products, including beer. Their presence together with alcohol can be dangerous for a certain group of people. About 115 samples from 35 Czech microbreweries were analyzed for the presence of biological amines. The content of biological amines was analyzed by HPLC method. The beers were analysed immediately after purchase and then at the end best-before period. At least 2 biogenic amines were detected in each sample, and tyramine was detected in each sample. The total content of biological amines above 100 mg / l was found in 11 samples after purchase and in 14 samples after at the end best-before period. Some samples may cause health complications for sensitive group of people.

Keywords: biogenic amines, beer, microbrewery, storage

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D., ktorý bol môj vedúci práce, za jeho odborné vedenie, trpezlivosť a taktiež za čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. Ludmile Zálešákovej za pomoc pri príprave a spracovaní vzoriek.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia diplomovej práce a verzia elektronická, nahratá do IS/STAG sú rovnaké.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČASŤ	10
1 PIVO	11
1.1 SUROVINY PRE VÝROBU PIVA.....	11
1.2 TECHNOLÓGIA VÝROBY PIVA.....	15
1.3 DRUHY PIVA.....	21
2 BIOGÉNNE AMÍNY	23
2.1 CHARAKTERISTIKA BIOGÉNNYCH AMÍNOV.....	23
2.2 VÝZNAM BIOGÉNNYCH AMÍNOV V ĽUDSKOM ORGANIZME	25
3 FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE VÝSKYT BIOGÉNNYCH AMÍNOV V PIVE	29
3.1 BIOGÉNNE AMÍNY POCHÁDZAJÚCE ZO SUROVÍN	29
3.2 BIOGÉNNE AMÍNY VZNIKAJÚCE POČAS VÝROBY A SKLADOVANIA	31
II PRAKTICKÁ ČASŤ	37
4 CIEĽ PRÁCE	38
5 METODIKA PRÁCE	39
5.1 POPIS VZORIEK	39
5.2 STANOVENIE PH.....	42
5.3 PRÍPRAVA VZORIEK PRE CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENIE	43
5.4 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENIE BIOGÉNNYCH AMÍNOV	43
6 VÝSLEDKY A DISKUSIA	45
6.1 OBSAH BIOGÉNNYCH AMÍNOV V LEŽIAKOCHE	45
6.2 OBSAH BIOGÉNNYCH AMÍNOV V ŠPECIÁLNYCH PIVÁCH.....	55
6.3 OBSAH BIOGÉNNYCH AMÍNOV VO VÝČAPNÝCH PIVÁCH.....	63
6.4 DISKUSIA.....	69
ZÁVER	78
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	79
ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	88
ZOZNAM OBRÁZKOV	89
ZOZNAM TABULIEK	90

ÚVOD

Pivo je v České republice najviac konzumovaný alkoholický nápoj a jeho výroba má v tejto zemi dlhoročnú tradíciu. V súčasnej dobe je v ČR sledovaný intenzívny nárast vzniku mikropivovarov. Jedná sa o pivovary s produkciou piva do 10 000 hl ročne, ktoré sú buď samostatne stojacie alebo sú súčasťou reštauračných zariadení. Ponúkajú zaujímavú škálu produktov – rôzne ochutené piva, ovocné piva, korenené a špeciálne kvasené piva. Pri výrobe používajú hlavne tradičné postupy a technológie.

Biogénne amíny sú dusíkaté látky odvodené od aminokyselín. V ľudskom tele sú prirodzene prítomné a plnia si v ňom rôzne fyziologické funkcie. Avšak pri ich vyššej koncentrácii dochádza k zlyhaniu detoxikačného systému ľudského tela a k ich hromadeniu v ňom. Ich zvýšená koncentrácia môže viesť k rade zdravotných problémov. Ohrozená je hlavne skupina ľudí, ktorá užíva lieky s inhibičným účinkom na detoxikačný systém biogénnych amínov.

Táto diplomová práca sa zaoberá obsahom biogénnych amínov v pivách z českých mikropivovarov. Teoretická časť sa venuje výrobe piva, biogénnym amínov a ich možným vznikom a výskytom pri výrobe piva a počas jeho skladovania. Praktická časť tejto práce sa zaoberá stanovením 8 biogénnych amínov v 115 vzorkách a to v dobe spotreby piva a po jej uplynutí.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 PIVO

Pivo je kvasený nápoj s relatívne nízkym obsahom alkoholu. Prvé zmienky o pive sa datujú už v období Mezopotámie. Podľa vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 335/1997 Sb. sa pod pojmom pivo rozumie: penivý nápoj vyrobený skvasením mladiny pripravenej zo sladu, vody, neupraveného chmeľu, upraveného chmeľu, alebo chmeľových produktov, ktorý vedľa kvasným procesom vzniknutého alkoholu a oxidu uhličitého obsahuje aj určité množstvo neprekvaseného extraktu; slad je možné do výšky 1/3 hmotnosti celkového extraktu pôvodnej mladiny nahradiť extraktom, hlavne cukru, obilného škrobu, jačmeňa, pšenice alebo ryže; u pív ochutených môže byť obsah alkoholu zvýšený prídavkom liehovín alebo ostatných alkoholických nápojov (Vyhláška Ministerstva Zemědělství ČR č. 335/1997 Sb.).

1.1 Suroviny pre výrobu piva

Pre výrobu piva sú nevyhnutné tieto suroviny:

- voda,
- slad,
- chmeľ,
- pivovarské kvasinky.

Pivovárstvo je jedno z odvetví, v ktorom dochádza k veľkej spotrebe vody, iba samotný výrobok obsahuje 75 až 80 % vody v závislosti od druhu. Odhaduje sa, že na každý liter produkovaného piva sa používa až sedem litrov vody. Celkovo sa podľa účelu použitia rozlišujú 3 typy vôd: varná voda, umývací a sterilizačná a nakoniec prevádzková voda. Varná voda musí spĺňať požiadavky na pitnú vodu. Vlastnosti vody varnej ovplyvňujú technológiu, kvalitu a špecifické vlastnosti konečného výrobku (Simate *et al.*, 2015). Pre jednotlivé druhy piva sú charakteristické typy pivovarských vôd. Mäkká voda obsahuje malý podiel anorganických zložiek a je preferovaná do svetlejších pív, naopak tvrdá voda sa skôr používa do tmavších pív. Z hľadiska zastúpenia iónov vo vode použitej na výrobu piva sú najviac zastúpené vápenaté (Ca^{2+}) a horečnaté ióny (Mg^{2+}), ktoré reakciou s fosforečnanmi znižujú výsledné pH rmutu, sladiny a mladiny. Naopak hydrogenuličitanové a uhličitanové ióny zvyšujú pH a tak negatívne ovplyvňujú varný proces. Vodíkové (H^+) a hydroxidové ióny (OH^-) sú prítomné v každej vode a ich pomer ovplyvňuje výsledné

pH vody. Vápenaté ióny tlmia prifarbovanie mladiny, stimulujú činnosť sladových enzýmov, kompenzujú nadbytok horečnatých iónov a majú vplyv na flokuláciu kvasníc. Horečnaté ióny povzbudzujú aktivitu kvasničných enzýmov a sú tiež kofaktormi pre niektoré takéto enzýmy (Basařová *et al.*, 2010).

Slad je naklíčené a usušené obilné zrnó z jačmeňa, pšenice alebo iných obilnín, ktorý sa pred samotným varením musí namlieť. V ČR tvorí prevahu slad z jačmeňa. Výber sladu je ovplyvnený druhom piva. Globálne sa pre svetlé piva používajú predovšetkým svetlé slady plzeňského typu a pre tmavé piva sú preferované tmavé slady mníchovského typu. Špeciálne slady sa používajú hlavne s cieľom zvýrazniť určité kvalitatívne a špecifické vlastnosti základných typov pív, alebo s cieľom vyrobiť pivo o odlišných vlastnostiach (Kozák a Kozáková, 2013; Basařová *et al.*, 2010). Pri chemickom rozboře sladovníckeho jačmeňa sa sleduje hlavne obsah vody, škrobu, extraktínych látok a bielkovín. Obsah škrobu u kvalitného sladovníckeho jačmeňa sa pohybuje okolo 62 až 65 %, pričom obsahuje väčší podiel amylopektínu (80 %), amylózy (20 %) a menší podiel prímiesí (dusíkaté a minerálne látky) (Kadlec *et al.*, 2012). Neškrobové polysacharidy (10%) v zrne jačmeňa zastupujú: celulóza, hemicelulóza (β -glukány, pentózany), glykány, lignín a ďalšie. Zvýšený obsah β -glukánov sťažuje technologické spracovanie sladu a následne piva. Uvedené polysacharidy značne ovplyvňujú viskozitu nie len sladiny, ale aj piva. Proteíny (10,5 až 11,5 %) v jačmeni a v slade sú delené do štyroch základných skupín (albumíny, globulíny, prolaminíny, glutelíny), pričom ich percentuálne zastúpenie sa mení odrodou a podmienkami pestovania, taktiež sa ich obsah postupne redukuje v procese degradácie pôsobením proteolytických enzýmov sladu. Najdôležitejšie štepne produkty bielkovín sa tvoria počas klíčenia jačmeňa, patria sem: makropeptidy, polypeptidy, nižšie peptidy a aminokyseliny. Sú to nerozpustné bielkoviny, ktoré sa uvoľňujú len čiastočne, väčšina zostáva v sladovom mláte a sú dôležité pre množenie a metabolizmus kvasenia, ale na druhej strane pôsobia aj ako prekurzory pre tvorbu aldehydov (spôsobujú starú chuť piva). Vysokomolekulárne látky spolu s polyfenolmi sa podieľajú na tvorbe látok negatívne ovplyvňujúcich senzoričné vlastnosti piva, napríklad spôsobujú nebiologické zakalenie piva (Basařová *et al.*, 2010).

Obilniny sú častokrát kontaminované mykotoxínmi, teda produktmi hubových patogénov. K najznámejším producentom mykotoxínov patria: *Fusarium* (trichotheceny, zearalenon, fumonisiny), *Aspergillus* a *Penicillium* (aflatoxiny, ochratoxin A). Práve plesne z rodu *Fusarium* sú podozrivé z prepeňovania pív tzv. „gushingu“. Tieto plesne napadajú jačmeň

a produkujú tzv. hydrofobíny, čo sú malé, povrchovo aktívne silno hydrofóbne bielkoviny, ktoré stabilizujú malé bubliny CO₂ vo fľašiach a plechovkách (Poštulková *et al.*, 2013). V súčasnosti sa objavuje nový typ mykotoxínov tzv. „emerging“ mykotoxíny, ktoré sú metabolitmi z rodu *Fusarium* (*F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* a *F. sambucinum*), jedná sa o : fusaproliferin, beauvericin, enniatiny a moniliformin. Tieto mykotoxíny boli sledované v jačmeni, kedy ďalej prechádzali do výrobného sladu a sladového kvetu. V konečnom výrobku a v pive už neboli zaznamenané, no ich prítomnosť v slade a sladovom kvete si vyžaduje zvýšenú pozornosť nakoľko sa tieto produkty ďalej využívajú v potravinárstve a na krmné účely (Benešová *et al.*, 2015).

Chmeľ (*Humulus lupulus* var. *europaeus*.) je vytrvalá dvojdomá rastlina, náročná na svetlo, teplotu a vlhkosť. Je to jedna z hlavných surovín , ktorá dodáva pivu:

- typickú chuť (živicové zlúčeniny, α - a β -horké kyseliny),
- vôňu (éterické oleje),
- podieľa sa na čírení vyzrážaním bielkovín počas varu (taníny),
- konzervuje pivo (horké chmeľové látky),
- stabilizuje pivnú penu (Canbaş *et al.*, 2001).

Na výrobu piva sa používa v podobe neoplodnených usušených samičích hlávok. Zatiaľ, čo sa chmeľové hlávky skôr používajú v mikropivovaroch , priemyslové pivovary viac preferujú granule, alebo chmeľové extrakty (Kozák *et al.*, 2013). Chmeľová hlávka je zložená zo stopky, vretienka, pravých a krycích listeňov. Tie hlávky, ktoré majú pivovarské využitie vylučujú na vnútornej strane listeňov zrná lupulínu, obsahujúce veľmi významné živice a silice. Okrem živíc a silíc podstatne ovplyvňujú technológiu výroby a kvalitu piva polyfenoly (Kadlec *et al.*, 2012).

Chmeľové živice (do 30 % hmotnosti) sú deriváty floroglucinolu a sú zodpovedné za intenzitu a charakter horkosti piva. Základné látky živíc rozdeľujeme na mäkké živice (α -horké , β -horké kyseliny a mäkké nešpecifické živice) a tvrdé živice. α -horké kyseliny sú z uvedenej skupiny látok najdôležitejšie a sú tvorené siedmymi analógmi humulon (humulon, kohohumulon, adhumulon, prehumulon a posthumulon). Pri varení izomerujú, stávajú rozpustnejšie a spôsobujú silnú horkosť, najmä vzniknuté iso- α -horké kyseliny, ktoré tvoria približne 85 % horkosti piva. Chmeľové silice pridelujú pivu charakteristickú vôňu,

tvoria sa v posledných fázach zretia rastliny (Basařová *et al.*, 2010). β -horké kyseliny naopak izomerizovať nedokážu, pretože neobsahujú terciálnu alkoholovú skupinu v aromatickom jadre. Zároveň sú menej rozpustné ako α -kyseliny (majú na viac isoprenylový bočný reťazec). Jeho analógmi sú: kolupulon, lupulon, adlupulon, prelupulon a postlupulon. Beta kyseliny sú ľahko oxidovateľné, produkty ich oxidácie sú známe ako hulupony. Hulupony spôsobujú krátko trvajúcu miernu horkú chuť, podobne ako iso-alfa-kyseliny. Avšak podmienky ich vzniku pri varení mladiny nie sú priaznivé, kyslík je vo vriacej vode ťažko rozpustný, takže k oxidácii nedôjde. Tieto kyseliny majú vplyv na horkú chuť piva len obmedzený, zato majú preukázateľné antimikrobiálne vlastnosti. Bolo dokázané, že β -kyseliny dokážu potlačovať infekciu spôsobenú *Helicobacter pylori*, pôsobí priaznivo pri liečbe akné, alebo proti *Clostridium perfringens* a iných (Krofta *et al.*, 2014).

Polyfenolické látky majú antioxidačné a antiradikálové vlastnosti, inhibujú oxidačné stárnutie piva. 80 % polyfenolických látok piva pochádza zo sladu a zvyšných 20 % pochádza z chmeľu (Dvořáková *et al.*, 2010). Ich reakciou s dusíkatými látkami (polyfenol-bielkovinové komplexy) naopak podporujú tvorbu koloidného zákalu (flavan-3-oly, proanthokyanogeny). Množstvo polyfenolových látok sa líši najmä podmienkami pestovania. Karabín *et al.* (2013) porovnávali čínsky a český jačmeň, český obsahoval 50,6 mg/100g polyfenolov a čínsky 75,1 mg/100g, čo jasne poukazuje na fakt, že zloženie surovín z veľkej miery ovplyvňujú klimatické podmienky. Polyfenoly pochádzajúce z chmeľu viacej ovplyvňujú antioxidačnú aktivitu piva než polyfenolické látky pochádzajúce zo sladu, dôvodom je ich termostabilita pri varení. Medzi najdôležitejšie chmeľové polyfenolické látky zaradujeme katechín, epikatechín, kyselinu ellagovú a ferulovú. Fidler a Kolářová (2009) vo svojej práci uvádzajú, že najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazujú tmavé piva, ktoré sa od svetlých pív líšia druhom a aj skladbou chmeľu a sladu (Fidler *et al.*, 2009). Do skupiny polyfenolov sa zahrňuje zaujímavá skupina takzvaných prenylovaných flavonoidov, ktoré sa nachádzajú len v chmele. Zahrňujú chalkóny a flavonóny. Medzi jednu z ich dôležitých reakcií patrí premena estrogéne neaktívneho desmethylxanthohumolu na zmes aktívnych estrogénov 6-prenylnaringeninu a 8-prenylnaringeninu. Ich koncentrácia v pive odpovedá 10 – 20 % obsahu z pôvodného množstva látky v chmele. Tejto skupine látok boli preukázané: antikarcinogénne, antioxidačné, protizápalové, antimikrobiálne, antivírusové, estrogéne a antiosteoporotické účinky. Medzi odrody chmeľu, ktoré obsahujú najviac

polyfenolov patria nedávno vyšľachtené Agnus a Vital. (Nešpor *et al.*, 2017, Krofta *et al.*, 2015).

Pivovarské kvasinky sú jednobunkové organizmy nevyhnutné pre výrobu piva. Hlavným účelom použitia kvasiniek je ich schopnosť skvasovať zkvasiteľné cukry a premieňať ich na alkohol. Pri kvasení vzniká veľa iných vedľajších produktov: estery, vyššie alkoholy a kyseliny. Prakticky sa využívajú dva druhy pivovarských kvasiniek podľa spôsobu kvasenia: *Saccharomyces cerevisiae* (vrchne kvasené piva) a *Saccharomyces pastorianus* (spodné kvasené piva). Kvasinky vrchného kvasenia kvasia najlepšie pri teplote 18 – 22 °C, sú vynášané vzniknutým oxidom uhličitým na povrch a vytvárajú tzv. deku. Spodné kvasinky kvasia pri nižšej teplote 7 – 15 °C a sedimentujú na dne. Takéto piva sa čiria pomalšie, potrebujú dlhší čas na uležanie a od toho je odvodený ich názov ležiak (Matoulková *et al.*, 2007). Výroba piva je možná aj bez použitia čistých kvasiniek, týmto spôsob sa vyrábajú tzv. spontánne kvasené piva, ktoré majú rôznorodú mikroflóru, ktorá obsahuje okrem kvasiniek aj baktérie. V tomto prípade sa uplatňujú najmä kvasinky *Dekkera*, *Brettanomyces* a *Torulaspóra*, jedná sa o piva belgického typu - lambik, gueze; anglického - ale, stout, porter; amerického – American coolship ale (Spitaels *et al.*, 2014).

1.2 Technológia výroby piva

Výrobu piva je možné zahrnúť do nasledujúcich základných technologických krokov:

- výroba sladu,
- výroba mladiny,
- kvasenie a dokvášanie,
- záverečné úpravy piva.

Výroba sladu pozostáva z týchto technologických procesov:

- Máčanie jačmeňa – zvýšenie obsahu vody v zrne.
- Klíčenie – aktivácia a syntéza enzýmov, – štepenie zásobných makromolekulových látok na rozpustné nízkomolekulové.
- Hvozdenie – zníženie obsahu vody, deaktivácia enzýmov, zastavenie klíčenia.
- Odklíčenie (Benešová *et al.*, 2017).

Rozsah produkcie farebných a aromatických zlúčenín je možné regulovať úpravami v postupe hvozdenia sladu. Z hľadiska kvality piva a technológie jeho výroby sa uprednostňuje používať časti sladu z jednej odrody jačmeňa alebo z dvoch odrôd jačmeňa, ktoré sú si geneticky podobné (Basařová *et al.*, 2010).

Cieľom máčania zrna je zachovanie latentnej formy života jačmenného zrna. Z pôvodného obsahu vody 12 až 17 % dochádza k zvýšeniu až na 42 až 48 %. Príjem vody ovplyvňuje veľkosť zrna, prístup kyslíka, teplota vody (10 až 12 °C) a technológia máčania. Obsah vody v slade sa označuje ako stupeň domočenia. Najpoužívanejšou metódou máčania je máčanie so vzdušnými prestávkami, kedy je zrno bez vody (4 až 6 hodín), aby sa dobre prevzdušnilo. Máčacia voda sa niekoľkokrát (1 až 3-krát) vymieňa. Celková doba máčania kolíše v rozmedzí od 60 do 90 hodín (Basařová *et al.*, 2010; Kosař *et al.*, 2000).

Klíčenie je fyziologický proces pri ktorom dochádza k vyvíjaniu zárodku, aktivácii a tvorbe enzýmov, štepeniu zásobných látok a k cytolytickému rozlúšteniu zrna. Riadenie klíčenia nazývame vedenie hromád. Počas klíčenia dochádza k uvoľneniu amylolytických enzýmov, ktoré dokážu degradovať škrob. Škrob je počas klíčenia enzýmovo degradovaný iba z 18 %. Dostatočné množstvo vody je nevyhnuté pre optimálny proces, pre slady svetlé je to množstvo do 35 – 44 % a pre slady tmavé do 45 – 48 %. Nedostatok vody sa upravuje kropením hromád. Naklíčený sladovnícky jačmeň sa nazýva zelený slad (Harrison, 2009; Basařová *et al.*, 2010; Kosař *et al.*, 2000).

Hvozdenie je predposledný technologický krok pri výrobe sladu, ktorého cieľom je znížiť obsah vody zeleného sladu (okolo 6 %), deaktivovať enzýmy, zastaviť životné pochody v zrne a tak zabezpečiť jeho skladovateľnosť. Tento krok výroby sladu ovplyvňuje jeho výslednú farbu, chuť a vôňu. Dochádza k rade chemických reakcií : karamelizácia, Maillardove reakcie, oxidácia lipidov. Proces hvozdenia prebieha v niekoľkých krokoch : predsušenie zeleného sladu (okolo 60 °C), vyhriatie a doťahovanie. Podmienky hvozdenia sú závislé od druhu sladu (Cejpek, 2014).

Odkličovanie sladu je proces pri ktorom sa slad zbavuje klíčkov súčasne dochádza k odstráneniu poškodených zrn. Takto upravený slad sa necháva dozrieť v skladovacích silách (Kosař *et al.*, 2000).

Mladina je cukornatý medziprodukt pri výrobe piva obsahujúci extraktívne látky zo sladu a chmeľu. Vlastnosti hotovej mladiny ovplyvňujú nasledovný technologický proces fermen-

táciu. Z tohto dôvodu je nutné aby obsahoval všetky dôležité zložky, jedná sa o : skvasiteľné sacharidy, lipidy a kyslík, zdroj dusíka, vitamíny, vodu a anorganické ióny. Výroba mladiny pozostáva z nasledujúcich technologických krokov:

- kondicionovanie a šrotovanie,
- vystieranie a rmutovanie,
- scedzovanie a vyslaďovanie,
- chmelovar,
- úprava mladiny.

Kondicionovanie sa vykonáva s cieľom zvlhčiť obalové vrstvy zrna, aby sa znížilo jeho poškodenie počas šrotovania. Šrotovanie je možné nazvať aj procesom dezintegrácie sladového zrna na požadovanú veľkosť častíc. Čím je šrot jemnejšie dezintegrovateľný, tým je pôsobenie enzýmov sladu účinnejšie pri nasledovných procesoch. Vystieranie je zmiešanie sladu respektíve sladového šrotu s vodou o teplote 37 °C vo vystieracej panvici. Niekedy sa vykonáva tzv. záparka, kedy sa časť vystieracej vody zahreje a na konci vystierania sa vystierka touto teplou vodou prečerpá, aby sa zvýšila jej teplota na teplotu peptonizačnú (48 – 52 °C) (Kadlec *et al.*, 2002).

Rmutovanie je proces, pri ktorom dochádza k extrakcii sladu vo vode za riadených teplotných podmienok, tak aby sa vytvorili optimálne podmienky pre činnosť jednotlivých druhov enzýmov. Jednotlivé rozsahy teplôt sú uvedené v tabuľke č. 1.

*Tabuľka 1 Teploty a pôsobiace enzýmy pri rmutovaní (prepracované podľa Kadlec *et al.*, 2002).*

Rozsah teplôt (°C)	Teplota	Enzýmy	Produkty
35 - 38	kyselinotvorná	fosfatázy	fosforečnany
48 - 52	peptonizačná	proteolytické	voľné aminokyseliny
60 - 65	nižšia cukrotvorná	β -amylázy	nižšie cukry
70 - 75	vyššia cukrotvorná	α -amylázy	dextríny
78	odrmutovacia	inaktivácia	

Jednou z najdôležitejších reakcií v tejto časti je štiepenie škrobu na jednoduché skvasiteľné cukry, ktoré v procese fermentácie využívajú pivovarnícke kvasinky. Štiepenie škrobu sa skladá: bobtnanie, mazovatenie, stekutenie a scukornenie. Zahrievaním škrob začne najskôr vo vode bobtnať a následne mazovatieť (50 – 57 °C). Počas mazovatenia prechádza škrob do roztoku a mení sa na hustú vizkóznú kvapalinu. Takto upravený škrob (škrobový maz) stáva prístupný pre sladové enzýmy (alfa-amylázy), príčinou čoho príde k stekuteniu škrobu (65 – 75 °C, vzniká amyloextrín). Komplexom amylolytických enzýmov (α -amylázy, β -amylázy) dôjde k úplnému rozštiepeniu škrobu na nižšie cukry a dextríny. Pri výrobe nízkoprekvasených pív prevládajú v mladine dextríny, podmienky sa upravujú tak aby boli výhodné pre aktivitu α -amylázy (rýchly výhrev na 70 °C s dlhšou výdržou, optimálne pH je 5,5), naopak pri vysokoprekvasených pivách sú podmienky výhodnejšie pre β -amylázy (dlhšia výdrž pri 65 °C, optimálne pH je 5,2), ktoré štiepia škrob na nižšie cukry (Mosher a Trantham, 2017; Kadlec *et al.*, 2002). K výrobe vysokoprekvasených pív sa používajú ešte ďalšie enzýmy (amyloglukozidáza, pullulanáza, izoamyláza), nakoľko bežné sladové enzýmy úplne nedokážu štiepiť väzby v amylopektíne. Sacharidická zložka mladiny tvorí 90 % z celkového obsahu chemických látok, z toho 68 – 75 % sú skvasiteľné cukry (Cvengroschová a Šmogrovičová, 2004). Činnosťou proteolytických enzýmov dochádza k rozštiepeniu bielkovín až na ich štiepne produkty, hlavne na aminokyseliny, ktoré sú nevyhnutné pre činnosť kvasiniek. Vyšší obsah bielkovín by pôsobil negatívne na stabilitu piva a tvorbu zákalu (Cvengroschová a Šmogrovičová, 2004). Kyselinotvorné enzýmy štiepia organické zlúčeniny za vzniku kyselín, ktoré znižujú pH, tieto reakcie sú nevyhnutné pre aktivitu enzýmov. Výsledný produkt rmutovania sa nazýva sladina (Kadlec *et al.*, 2002).

Existujú dva spôsoby rmutovania: infúzný a dekokčný spôsob. Infúznym spôsobom rmutovania si vystačí s jednou rmutovacou nádobou s ohrevom, nakoľko sa v nej postupne vyhrieva celý objem vystierky. Tento spôsob rmutovania sa aplikuje pre vysoko vymleté slady, ktoré majú vysokú enzýmovú aktivitu, ide hlavne o špeciálne pívá. Rmutovanie prebieha v niekoľkých teplotných stupňoch: 1. vystieracia teplota, nižšia cukrotrvorná teplota, vyššia cukrotrvorná teplota a odrmutovacia teplota. U dekokčného spôsobu rmutovania dochádza k presunu časti vystierky do rmutovacej nádoby a k jej zohriatiu na nižšiu, následne na vyššiu cukrotrvornú teplotu a nakoniec k jej povareniu (10 – 20 min.). Vzniká rmut, ktorý sa vráti do vystieracej panvice, čím zvýši teplotu jej obsahu. Tento proces sa môže opako-

vat' niekoľkokrát, najpoužívanější je dvojmutový spôsob, ktorý sa aplikuje aj pri výrobe piva plzeňského typu (Harrison, 2009; Basařová *et al.*, 2010; Kosař *et al.*, 2000, Tóth *et al.*, 2011).

Scedzovanie znamená proces separácie pevného podielu tzv. mláta od vodného podielu obsahujúceho extraktívne látky, ktorý nazývame sladina. Mláto sa usadí na dne scedzovacej nádoby alebo sa použijú scedzovacie filtry, takto oddelená sladina sa nazýva predok. Po scedzovaní nasleduje vyslad'ovanie, čo v praxi znamená premytie mláta horúcou vodou (75 °C), aby došlo k vylúhovaniu zvyšného extraktu – výstrelok. (Basařová *et al.*, 2010).

Chmelovar je proces, pri ktorom sa varí chmeľ (chmeľový granulát, chmeľový extrakt) so sladinou a vzniká mladina. Pri tomto procese dochádza k rade zmien, ktoré ovplyvňujú charakter finálneho piva. Pri varení dochádza k: odpareniu vody a teda k zahusteniu mladiny, sterilizácii mladiny, inaktivácii enzýmov, extrakcii účinných látok z chmeľu do mladiny, rozpusteniu α -horkých kyselín a k ich izomerácii, koagulácii bielkovín, poklesu pH a tvorbe farebných látok. Chmeľ sa dávkuje postupne, zvyčajne na dvakrát alebo na trikrát. V prvej dávke sa pridáva vysokoobsažný chmeľ zabezpečujúci dostatočnú horkosť piva, v ďalších dávkach sa pridávajú aromatické odrody chmeľu za cieľom dosiahnuť požadovanú arómu. Prvá dávka chmeľu sa aplikuje hneď na začiatku chmelovaru, druhá dávka po 60 minútach a posledná 15 minút pred koncom chmelovaru (Basařová *et al.*, 2010; Kosař *et al.*, 2000; Briggs *et al.*, 2004). Pri chmelovare vzniká hrubý kal a jemný kal. Hrubý kal obsahuje vyzrážané bielkoviny, polyfenoly a horké látky. Hrubý kal je nutné odseparovať, pretože zhoršuje penivosť piva a tiež spôsobuje nadmernú horkosť piva. Jemný kal je tvorený z komplexu trieslovín s bielkovinami, začína sa tvoriť pri chladení mladiny. Jemný kal sa odstraňuje len čiastočne, nakoľko úplne odstránenie, by viedlo k prázdnoti piva. Naopak vysoký obsah jemného kalu, by mohol spôsobiť zhoršenie filtrovateľnosti a zanášanie kvasiniek (Chládek *et al.*, 2007).

Po schladení mladiny na príslušnú teplotu podľa typu piva nasleduje prevzdušnenie a proces kvasenia. Prevzdušnenie je súčasť zakvasovania a je nevyhnutné na zabezpečenie rastu a rozmnožovanie buniek. Dochádza predovšetkým k syntéze nenasýtených mastných kyselín a sterolov, ktoré sú nevyhnutné zložky membrány kvasiniek, je od nich závislý pohyb živín a metabolitov do a z bunky (Cvengroschová a Šmogrovičová, 2004).

Kvasenie rozdeľujeme na hlavné kvasenie, dokvasovanie a zretie. V minulosti sa aplikovalo otvorené hlavné kvasenie v spilkách. Doba kvasenia sa tu pohybuje 7 – 10 dní. Po prvej zaprašovacej fáze dochádza k intenzívnemu búrlivému kvaseniu, vznikajú nízke, neskôr vysoké biele krúžky a nakoniec žltobiela pena, ktorá na konci kvasenia klesne. Vtedy na povrchu zostane tmavohnedý povlak – deka. Výhodou otvoreného kvasenia je aj možnosť zberu deky, ktorú tvoria vyplavené vyčerpané kvasinky a ostatné balastné látky. Tieto časti by zanechávali horko-kyslú pachuť. Otvorené kvasenie v spilkách poskytuje pre kvasinky prirodzenejšie prostredie oproti cylindrokónickým tankom, v ktorých dochádza k striedaniu teplôt a vysokému tlaku, čo sa prejavuje na chuti piva, ale aj na trvanlivosti peny. Tento spôsob kvasenia je, ale ekonomicky náročnejší, vyžaduje si viacej odbornej ľudskej práce, dlhšie trvá, zároveň je nevyhnutné dodržiavať vysoko sterilné prostredie v spilkách a je nutné kade dokonale čistiť (Kadlec *et al.*, 2002). V súčasnosti sa aj preto používajú uzatvorené cylindrokónické tanky. Moderné technológie využívajú cylindrokónické tanky, ktoré dokážu zabezpečiť beztlakovú aj tlakovú prevádzku. Prvé štádium kvasenia sa nazýva zaprašovanie, nastáva do 24 h od zakvasenia, vyznačuje sa tvorbou bielej peny na povrchu. Postupne sa z bielej peny začnú tvoriť nízke biele krúžky (po 24 – 36 h), ktoré časom začnú tmavnúť (po 72 – 96 h). Hnedé krúžky nazývané deka, ktoré sa postupne zbierajú, kvasinky klesajú ku dnu a prekvasená mladina sa číry, vzniká mladé pivo. Mladé pivo sa prečerpáva do ležiackych prípadne v cylindrokónických tankoch, kde dochádza k dokvaseniu a číreniu piva, pri teplote -2 až 3 °C. Proces dokvasenia prebieha pod tlakom, dochádza k sýteniu piva vznikajúcim oxidom uhličitým. Doba dokvasenia a zretia piva trvá 1 až 10 týždňov (Chládek *et al.*, 2007).

Medzi záverečné úpravy piva patrí: filtrácia piva, stáčanie piva, pasterizácia. Účelom filtrácie je odstrániť všetky mechanické a kaliace látky bez straty oxidu uhličitého. Čím horšie je pivo vyčírené tým väčšie ťažkosti vznikajú pri filtrácii. Materiál prechádza cez pórovitú dosku, ostrosť filtrácie je daná veľkosťou pórov filtračnej dosky. Rozpustnosť látok s klesajúcou teplotou klesá, takže ochladením sa z piva vylučujú. Na proces filtrácie navezuje stáčanie piva do obalov. Pri stáčaní nesmie dôjsť k úniku CO₂ a prístupu kyslíka., preto sa vykonáva pod tlakom CO₂ a dusíka. Podmienkou je dodržovanie dokonalej sanitácie (Pajurek, 2003; Basařová *et al.*, 2010). V súčasnosti rastie dopyt po nefiltrovaných pivách, ktoré vyrábajú predovšetkým minipivovary. Trvanlivosť takýchto pív je veľmi krátka (fľaškové nefiltrované 14 dní až 1 mesiac), preto dochádza k ich predaju v mieste ich vý-

roby. Nefiltrované piva obsahujú živé mikroorganizmy, ktoré sa svojou zvyškovou aktivitou môžu podieľať na rade senzorických zmien. Na predĺženie trvanlivosti nefiltrovaného piva sa aplikujú alternatívne postupy napr. použite vysokého hydrostatického tlaku alebo pulzného elektrického pola (Hanko *et al.*, 2017). Pasterizácia je tepelné ošetrenie piva s cieľom predĺžiť trvanlivosť výrobku. Využívané sú dva typy pasterov: prietokový (pred plnením do fliaš), tunelový (tepelné ošetrenie fliaš resp. plechoviek s obsahom) (Niemsch a Theodor, 2006). Tunelová pasterizácia využíva ohrev pri 71 – 75 °C počas 15 až 30 sekúnd, prietoková 62 °C počas 20 minút. Zavedením membránovej filtrácie sa vylučuje nepriaznivý efekt teploty na hotový výrobok a zároveň sa dosahuje stabilita piva (Harrison *et al.*, 2009).

1.3 Druhy piva

Na etikete nájdeme údaj o obsahu skvasiteľného extraktu, ktorý sa nesprávne nazýva stupňovitosť. Je to údaj, ktorý hovorí o množstve sladů použitého na výrobu piva. Pojednáva o tom, koľko cukru v sladine bolo pripraveného pre kvasinky, ktoré rozkladajú cukor na alkohol a tiež pivo sýtia produkciou oxidu uhličitého. Správne, sa tento údaj nazýva ako „extrakt v pôvodnej mladine“ (EPM) a má sa udávať v percentách nie v stupňoch, keďže podľa SI je stupeň jednotka určená pre meranie uhlov. Uvádzanie „stupňovitosti“ piva na etikete, ale nie je povinné, povinné je zaradiť pivo do určitého percentuálneho rozmedzia obsahu extraktu v mladine: stolné pivo (do 6 %), výčapné pivo (7 – 10 %), ležiak (11 – 12 %), špeciál (13 a viac %), takýto spôsob označovania je typický iba v Českej republike, v ostatných krajinách sa toto označovanie nepoužíva (Chládek *et al.*, 2007).

Česká legislatíva konkrétne Vyhláška Ministerstva Zemědělství č. 335/1997 Sb. presne rozdeľuje a definuje jednotlivé druhy pív:

1. Pivo
 - a) stolné pivo – pivo vyrobené prevažne z jačmenných sladov s extraktom pôvodnej mladiny do 6 % hmotnostných vrátane,
 - b) výčapné pivo – pivo vyrobené prevažne z jačmenných sladov s extraktom pôvodnej mladiny do 7 až 10 % hmotnostných,
 - c) ležiak – pivo vyrobené prevažne z jačmenných sladov s extraktom pôvodnej mladiny do 11 až 12 % hmotnostných,

- d) špeciálne pivo – pivo vyrobené prevažne z jačmenných sladov s extraktom pôvodnej mladiny 13 % hmotnostných a vyšších,
- e) porter – tmavé pivo vyrobené prevažne z jačmenných sladov s extraktom pôvodnej mladiny 18 % hmotnostných a vyšších,
- f) pivo so zníženým obsahom alkoholu – pivo s obsahom alkoholu najviac 1,2 % objemových (1,0 % hmotnostných),
- g) nealkoholické pivo – pivo s obsahom alkoholu najviac 0,5 % objemových (0,4 % hmotnostných).

2. Nápoj na báze piva

- a) kvasený sladový nápoj – nápoj vyrobený zo sladiny pivovarskou technológiou, poprípade ochutený,
- b) miešaný nápoj z piva – nápoj vyrobený zmiešaním piva s nealkoholickým nápojom alebo s nápojovým koncentrátom pre prípravu nealkoholických nápojov a sódomou vodou.

Skupiny piva sa ďalej môžu členiť:

- a) pšeničné pivo – pivo vyrobené s podielom extraktu z požitého pšeničného sladu vyšším než jedna tretina hmotnosti celkovo dodaného extraktu,
- b) pivo z iných obilnín – pivo vyrobené s podielom extraktu z použitého sladu inej obilniny než jačmeňa alebo pšenice vyšším než jedna tretina hmotnosti extraktu,
- c) kvasnicové pivo – pivo vyrobené dodatočným prídavkom čistej kvasničnej kultúry alebo podielu rozkvasenej mladiny do hotového piva,
- d) ochutené pivo – pivo vyrobené s prídavkom látok určených k aromatizácii, potravinových doplnkov, potravín alebo surovín s vlastnou arómou, liehovín alebo ostatných alkoholických nápojov. Obsah alkoholu pochádzajúci z liehovín a ostatných alkoholických nápojov pritom nesmie prekročiť obsah alkoholu v pôvodnom pive.

2 BIOGÉNNE AMÍNY

Biogénne amíny je skupina dusíkatých báz odvodených od aminokyselín, ktoré vznikajú pôsobením enzýmov, dekarboxyláz a transamináz. V rôznych koncentráciách sú prirodzenou zložkou prakticky všetkých potravín – endogénne, taktiež vznikajú ako dôsledok mikrobiálnej kontaminácie a pri fermentačných procesoch – exogénne. Niektoré biogénne amíny sa podieľajú na tvorbe arómy konečných produktov (Velíšek a Hajšlová, 2009). Ich nadmerný obsah sa nachádza v potravinách v pokročilom štádiu kazenia, preto slúžia ako indikátory kazenia potravín, sú teda ukazovateľmi zdravotnej bezpečnosti a akosti potravín (Kopřiva *et al.*, 2014)

Podľa chemickej štruktúry sa biogénne amíny delia na:

- alifatické – putrescín, kadaverín, spermin, spermidín, agmatín;
- aromatické – tyramín, fenyletylamín;
- heterocyklické – histamín, tryptamín (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.1 Charakteristika biogénnych amínov

Vznik amínov v potravinách je možný týmito cestami vzniku:

- dekarboxylácia aminokyselín,
- aminácia a transaminácia aldehydov a ketónov.

Väčšina amínov vzniká dekarboxyláciou. Dekarboxylácia je odstraňovanie α -karboxylovej skupiny prostredníctvom enzýmov – dekarboxyláz. Tomuto deju podliehajú voľné L-aminokyseliny a výsledkom tohto procesu je CO_2 a biogénne amíny, ktoré v ľudskom tele majú široké spektrum funkcií. Takto vznikajú iba primárne amíny, sekundárne a terciálne amíny vznikajú alkyláciou. Enzýmy, ktoré sa podieľajú na dekarboxylácii obsahujú ako kofaktor zvyčajne pyridoxalfosfát, ktorý najprv pôsobí na aminokyselinu za vzniku Schiffovej bázy. V pyridínovom cykle pyridoxalfosfátu dochádza mezomernému stavu, ktorý nastáva za podmienok ak dôjde eliminácii substituenta na α – C ako katiónu, čím môže byť karboxylová skupina. Mezomerný stav je následne stabilizovaný adíciou protónu na α – C a hydrolýzou Schiffovej bázy na primárny amín. Vznik Schiffovej bázy urýchľuje prítomnosť ťažkých kovov v systéme. Aminácia aldehydov prebieha buď ako transaminácia, alebo redukčná aminácia, vyznačuje sa hlavne u kvitnúcich rastlín (Greif *et al.*, 2005). Ďal-

šia cesta dekarboxylácie je cez pyruvoylový zvyšok, ktorý sa viaže na fenylalanínový bočný reťazec enzýmu cez jeho aminoskupinu. Mechanizmus však zostáva rovnaký ako u pyridoxalfosfátu (Kohajdová *et al.*, 2008).

Vznik biogénnych amínov z príslušných aminokyselín je nasledovný:

- arginín → agmatín → putrescín,
- histidín → histamín,
- tyrozín → tyramín,
- tryptofán → tryptamín,
- lyzín → kadaverín,
- ornitín → putrescín → spermidín (Kohajdová *et al.*, 2008).

Putrescín má štruktúru diamínu, častokrát sa zaraďuje medzi polyamíny, pretože funguje ako ich prekursor, vzniká niekoľkými cestami. Po prvé dekarboxyláciou L – ornitínu (enzým ornitíndekarboxyláza), následne metyláciou (S-adenozylmetioninom) vzniká spermidín a ďalej spermín. Spermín a spermidín sa líšia od putrescínu pripojením aminopropylových skupín pomocou enzýmu aminopropyltransferázy. Druhá cesta vzniku putrescínu je dekarboxyláciou L-arginínu (enzým arginíndekarboxyláza) za vzniku agmatínu. Premena agmatínu na putrescín je katalizovaná agmatinázou. Touto reakciou sa vyznačujú gram-negatívne baktérie. U gram-pozitívnych baktérii a niektorých gram-negatívnych dochádza k syntéze putrescínu hydrolýzou agmatínu. Túto reakciu katalyzuje enzým agmatiniminohydroláza a dochádza k premene agmatínu na N-karbamoylputrescín, ktorý sa ďalej premieňa na putrescín (enzým N-karbamoylputrescínamidohydroláza). (Del Rio *et al.*, 2016; Kalač a Krausová, 2005; Kohajdová *et al.*, 2008).

Sekundárne amíny (agmatín, spermín a spermidín) môžu pri reakcii s nitrozačnými činidlami (dusitany, oxidy dusíka) vytvárať karcinogénne N – nitrózo zlúčeniny. Potenciálne karcinogénny sú aj putrescín a kadaverín, ktoré pri zahrievaní tvoria N - nitrózopyrolidín a N – nitrózopiperidín. Reakciou primárnych amínov s nitrozačnými činidlami vznikajú alkylačné produkty s krátkou životnosťou a bez toxického účinku (Vrzal *et al.*, 2016).

Biogénne amíny obsahujú hlavne fermentované potraviny, do ktorých sa dostávajú zo surovín alebo prostredníctvom fermentačnej mikroflóry alebo vystupujú ako mikrobiálna kontaminácia (Lorencová *et al.*, 2012). Autori Suzi a Gardiny sledovali biogénne amíny v suchej fermentovanej saláme, identifikovali nasledujúce baktérie s dekarboxylázovou akti-

vitou: rod *Bacillus*, *Clostridium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*; čelad' *Enterobacteriaceae*, so zástupcami rodov *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*; čelade *Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae* s rodmi *Kocuria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*; čelad' *Vibrionaceae* s rodmi *Aeromonas*, *Vibrio* a baktérie mliečneho kvasenia zahŕňajúc rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* (Suzzi *et al.*, 2003). Prítomnosť baktérií s preukázanou dekarboxylačnou aktivitou v pivách je venovaná pozornosť v nasledujúcich kapitolách.

Odborníci sa domnievajú, že štartovacie kultúry majú vplyv na zvýšené množstvo biogénnych amínov v hotovej potravine. Pre tvorbu biogénnych amínov v potravinách je potrebná prítomnosť voľných aminokyselín, baktérii s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmienky pre bakteriálnu činnosť (teplota, pH, O₂, NaCl, NaNO₃, glukóza). Optimálne teplota pre rast mikroorganizmov sa pohybuje v rozmedzí okolo 20 – 37 °C. Dekarboxylázová aktivita je silnejšia v kyslom prostredí, prítomnosť kyslíka je nevyhnutná pre rast mikroorganizmov, obsah NaNO₂ a NaCl majú aktivačný účinok na tyrozin dekarboxylázu, naopak NaCl inhibuje histidín dekarboxylázu. Obsah glukózy je priaznivý v rozmedzí 0,5 – 2 %, naopak obsah nad 3 % pôsobí inhibične. Biogénne amíny vznikajú nielen v potravinách, ale aj v ľudskom organizme, za pomoci dekarboxyláz črevnej mikroflóry ľudského tela (Burdychová a Dohnal, 2007; Kohajdová *et al.*, 2008).

2.2 Význam biogénnych amínov v ľudskom organizme

Ľudský organizmus je schopný degradovať biogénne amíny prostredníctvom detoxikačného mechanizmu, ktorý je založený na oxidačnej deaminácii za katalýzy špecifických enzýmov. Jedná sa o monoaminoxidázu (MAO), diaminoxidázu (DAO), histidínmetyltransferázu (HMT) (Loret *et al.*, 2005). MAO sa vyskytuje v dvoch formách: MAO-A a MAO-B. MAO-A sa podieľa na deaminácii dopamínu, noradrenalínu, serotonínu a tyramínu, je súčasťou centrálného nervového systému a črevných buniek. MAO-B deaminuje dopamín a fenylalanín. DAO zabezpečuje deamináciu v črevách. Enzým HMT je prítomný v gastrointestinálnom trakte a v pečeni. Biogénne amíny sa absorbujú v črevách a ďalej sú detoxikované v pečeni. Konečnými produktmi detoxikácie biogénnych amínov sú aldehydy, amoniak, kyseliny, alebo peroxid vodíka, pričom tieto rozkladné produkty sa nachádzajú v krvi (Tofalo *et al.*, 2016).

Pri zvýšenom obsahu biogénnych amínov v ľudskom organizme dochádza k zlyhaniu detoxikačného systému a hromadeniu biogénnych amínov v tele. Tento fakt môže viesť k rade zdravotných problémov. K eliminácii biogénnych amínov neprispieva prítomnosť rôznych inhibítorov v tele, zaraďujeme sem inhibítory oxidáz, alkohol, liečivá (ambroxol hydrochlorid, dihydralazin, isoniazid, klavulanová kyselina, prometazin, verapamil), genetické predispozície alebo gastrointestinálne ochorenia. Vyšší obsah biogénnych amínov v tele sa v základe prejavuje dvomi spôsobmi: vazoaktívne a psychoaktívne. Vazoaktívne amíny (fenyletylamin, tyramín, tryptamín) majú vplyv na sťahovanie ciev a tak ovplyvňujú krvný tlak, psychoaktívne amíny (histamín, putrescín, kadaverín) pôsobia ako neurotransmitéry v centrálnom nervovom systéme. Existuje veľké množstvo symptómov: kožné, gastrointestinálne ťažkosti, extrémne hodnoty krvného tlaku, kontrakcia alebo relaxácia hladkého extravaskulárneho svalstva (Buňková *et al.*, 2012).

Biogénne amíny plnia v ľudskom tele rôzne dôležité fyziologické funkcie. Zúčastňujú sa širokej škály reakcií a procesov, medzi ktoré zaraďujeme: regulácia krvného tlaku a telesnej teploty, mozgová činnosť, regulácia pH v žalúdku, fungujú ako východzie látky pre niektoré nukleové kyseliny, bielkoviny a hormóny. Sú rozšírené aj v živej prírode vo forme rastlinných alkaloidov ako sú chinín, kokaín, nikotín. Polyamíny (putrescín, spermidín, spermin, agmatín) sa vyskytujú vo vyšších rastlinách, kde fungujú ako stabilizátory bunkových membrán, zúčastňujú sa na diferenciácii buniek, podieľajú sa na raste, vychytávajú voľné radikály, zamedzujú peroxidácii lipidov, sú zdrojom dusíka pre biochemické pochody. Polyamíny sú na druhej strane spájané s rastom nádorov (Velíšek, 2009). Prehľad biologického významu jednotlivých biogénnych amínov je uvedený v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Biologický význam biogénnych amínov (prepracované podľa Velíšek, 2009).

Biogénny amín	Biologický význam
Histamín	lokálny tkaninový hormón, vplyva na krvný tlak a sekréciu žalúdočných štiav, zúčastňuje sa pri anafylaktickom šoku a alergických reakciách
Kadaverín	stabilizácia makromolekúl (nukleové kyseliny), subcelulárnych štruktúr (ribozómy), stimulácia diferenciácie buniek, rastlinný hormón
Putrescín	stabilizácia makromolekúl, subcelulárnych štruktúr, stimulácia diferenciácie buniek, rastlinný hormón

Biogénny amín	Biologický význam
Agmatín	stabilizácia makromolekúl, subcelulárnych štruktúr, stimulácia diferenciácie buniek, rastlinný hormón, prekursor tyramínu
Fenylethylamín	prekursor tyramínu
Tyramín	prekursor dopamínu, lokálny tkaninový hormón, vplyv na krvný tlak a kontrakciu hladkého svalstva
Dopamín	mediátory sympatických nervov
Tryptamín	lokálne tkaninové a rastlinné hormóny (katecholamíny), vplyv na krvný tlak, peristaltiku čriev, psychické funkcie

Medzi biogénne amíny najviac ohrozujúce ľudské zdravie patria hlavne histamín a tyramín, tieto biogénne amíny sa vyskytujú v potravinách najčastejšie, toxicita ostatných biogénnych amínov je nižšia. Niektoré nie sú primárne nebezpečné, ale majú vplyv na toxicitu iných biogénnych amínov, patria sem putrescín a kadaverín, ktorí podporujú histamín (Adams *et al.*, 2001). Taktiež sa preukázalo, že histamín zvyšuje toxicitu tyramínu, tieto dva amíny majú synergistický účinok. Koncentrácia 190 mg/kg histamínu zvýšila toxicitu spojenú s 500 mg/kg tyramínu. Naopak pri súčasnej prítomnosti tyramínu v množstve 658 mg/kg a histamínu 4335 mg/kg bola preukázaná antagonistická reakcia týchto dvoch amínov. Prítomnosť oboch amínov súčasne v takomto veľkom množstve zatiaľ nebola v potravinách zistená, avšak podobne veľké a aj väčšie množstvá boli zistené samostatne v rybách a rybacích výrobkoch (Del Rio *et al.*, 2017). Histamín je najviac sa vyskytujúci biogénny amín, vyskytuje sa hlavne u rýb čeľadí *Scombridae* a *Scomberesocidae* (sardinky, makrela, tuniak), u syrov a aj v červenom víne (Kohajdová *et al.*, 2008).

Posudzovanie toxicity biogénnych amínov je náročné z dôvodu, že ju ovplyvňuje niekoľko faktorov: individualita organizmu, množstvo skonzumovanej potraviny, prítomnosť liečiv, alergie. V minulosti boli legislatívne stanovené obsahy vybraných biogénnych amínov pre ryby, syry, pivo a víno. Od roku 2004 je legislatívne stanovený iba hygienický limit pre histamín v rybách a ich výrobkoch. Limit je stanovený tak, že u siedmych z deviatich vzoriek (100 mg/kg) môžu dva obsahovať 200 mg/kg histamínu. V súčasnosti neplatná Vy-

hláška Ministerstva zdravotnictva ČR č. 298/1997 Sb. stanovovala maximálne limity BA aj pre pivo, víno a syry. Maximálne množstvo histamínu v pive a víne bolo stanovené na 20 mg/kg a pre tyramín to bolo množstvo 200 mg/kg u mäkkých, tvrdých, zrejúcich syroch a v prípade červeného vína maximálne 50 mg/kg (Buňka *et al.*, 2013). Obsah biogénnych amínov sa nemusí uvádzať na obale. Hodnoty toxicity histamínu sa v literatúrach odlišujú, celkovo môžeme tvrdiť, že množstvo 5 – 10 mg môže spôsobiť u citlivých jedincov poruchy. Vo všeobecnosti 10 mg tvorí ešte znesiteľnú hranicu, 100 mg spôsobuje strednú toxicitu a 1000 mg vysokú toxicitu (Karovičová a Kohajdová, 2005). Otrava histamínom sa prejavuje sčervenáním pokožky, svrbivými vyrážkami, nevoľnosťou, závratmi, brušnými kŕčmi a hnačkou. Otrava sa lieči podávaním antihistaminík. Ľudský organizmus obsahuje dva histamínové receptory H_1 a H_2 . Sťahovanie hladkého svalstva v črevách spôsobuje H_1 receptor, dôjde k vyvolaniu hnačky, kŕčov poprípade zvracania. H_1 stimulujú zmyslové a motorické nervy, čoho výsledkom je svrbenie a bolesť. Receptor H_2 reguluje vylučovanie žalúdočných štiav (Cataldi *et al.*, 2014; Peters *et al.*, 2009).

3 FAKTORY OVPLYVNĚJÚCE VÝSKYT BIOGÉNNÝCH AMÍNŮV PIVE

Existuje niekoľko spôsobov ako sa môžu biogénne amíny v pivách tvoriť. V prvom rade môžu biogénne amíny pochádzať zo surovín, z ktorých sa pivo vyrába, ďalšou možnosťou je vznik počas prípravy sladiny, ďalej počas fermentačného procesu a v neposlednom rade môžu vznikať pri nesprávnom skladovaní.

3.1 Biogénne amíny pochádzajúce zo surovín

Na výrobu piva sa používajú tieto suroviny: slad, chmeľ alebo je ho deriváty, voda a pivovarské kvasinky. Medzi najčastejšie biogénne amíny pochádzajúce zo surovín radíme:

- putrescín,
- agmatín,
- spermín,
- spermidín.

Tieto biogénne amíny sú prítomné hlavne v slade, no časť ich obsahu je odstránená v procesoch úpravy sladu. Existuje len malé množstvo prác, ktoré by sa zaoberali obsahom biogénnych amínov v samotných surovinách. Kalač *et al.* (1997) popísal obsah histamínu (7 – 17 mg/kg) a tyramínu (20 – 24 mg/kg) v slade. Počas piatich dňoch klíčenia sa zvýšil obsah biogénnych amínov, pričom u putrescínu, spermidínu, spermínu a agmatínu došlo k zvýšeniu až od 3 do 5,5 mg/kg/deň. Podmienky sladovania, intenzita klíčenia, teplota sušenia, ale aj druh jačmeňa má vplyv na konečný obsah biogénnych amínov v slade. Proces sladovania jačmeňa prebieha pri teplote okolo 18 – 20 °C, kedy dosahujú dekarboxylačné enzýmy svoju maximálnu aktivitu. (Kalač *et al.*, 2003, Romero *et al.*, 2003). Halász *et al.* (1999) však pripisuje tento vyšší obsah biogénnych amínov ako výsledok dekarboxylázovej aktivity mikrobiálnej kontaminácie sladu. V obilninách, ktoré sa používajú ako doplnky sladu (kukurica, proso, ryža) nebola zistená prítomnosť biogénnych amínov (Halász *et al.* 1999).

Z hľadiska vzniku biogénnych amínov je veľmi dôležitá fáza štiepenia bielkovín na dusíkaté látky s menšou molekulou hmotnosťou. Takto vznikajú okrem iných aj voľné amino-

kyseliny, ktoré neskôr fungujú ako prekurzory pre tvorbu príslušných biogénnych amínov dekarboxylačnou reakciou. Prítomnosť voľných aminokyselín je jednou z podmienok vzniku biogénnych amínov (Basařová *et al.*, 2010). Avšak niektoré práce sledovali vzťah prekurzorových aminokyselín so vznikom im príslušných biogénnych amínov. Kalač *et al.* (2002) sledovali spodne kvasené svetlé ležiaky po plnení a pasterizácii. Autori nedokázali nájsť súvislosť medzi voľnou hladinou tyrozínu v sladine a tvorbou tyramínu počas fermentácie. Ich výsledky naznačujú, že obsah voľného tyrozínu a histidínu neovplyvňujú tvorbu tyramínu alebo histamínu vo fľaškovom pive. Tento fakt sa zhoduje aj s výsledkami práce Izquierdo-Pulido *et al.* (2000).

K spomínanej interakcii štiepenia bielkovín dochádza pri klíčení vo fáze sladovania, kedy sa aktivujú enzýmy a dochádza k rastu klíčku. K ďalšiemu štiepeniu bielkovín dochádza aj pri rmutovaní sladu, vtedy dusíkaté látky prechádzajú do sladiny a v chmeľovare ďalej do mladiny (Basařová *et al.*, 2010). V chmele boli stanovené vyššie úrovne tyramínu, fenyletylamínu a polyamínov. V chmeľových výťažkoch sa zistili vyššie koncentrácie histamínu a tyramínu v porovnaní so sušeným chmeľom a chmeľovými granulami. Celkové množstvo chmeľu použité v technologickom procese je veľmi malé, preto nemožno tvrdiť, že chmeľ má významný vplyv na konečný obsah biogénnych amínov (Slomkowska a Ambroziak, 2002).

Najviac biogénnych amínov vzniká počas samotnej fermentácie (Basařová *et al.*, 2010). Pivovarnícke kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* neobsahujú špecifické histidínové a tyrozínové dekarboxylázy a počas fermentácie piva nedochádza k tvorbe alebo redukcii amínov ich vplyvom. Tento fakt sa potvrdil aj v práci Loret *et al.* (2005), ktorí stanovovali obsah biogénnych amínov v belgických pivách. Putrescín a agmatín sa vyskytovali v každej vzorke a to v konštantnej koncentrácii aj v pivách spodne kvasených. Potvrdil sa tu fakt, že tieto amíny pochádzajú zo surovín, keďže použité kvasinky u spodného kvasenia neboli schopné produkovať biogénne amíny (Loret *et al.*, 2005). Podľa Slomkowska a Ambroziak (2002) ani recyklácia kvasiniek neovplyvňuje tvorbu týchto biogénnych amínov. Naopak Kalač *et al.* (2002) vidí v opakovanom používaní pivovarníckych kvasiniek príčinu vzniku biogénnych amínov, pretože môžu byť kontaminované kyslomliečnými baktériami. Dôvodom vzniku biogénnych amínov počas priebehu fermentácie sú hlavne kyslomliečne baktérie, ktoré sa dostávajú do procesu ako kontaminujúca mikroflóra. Preto

je výhodné kontrolovať hladiny biogénnych amínov pri výrobe piva. Vo vode nebola detekovaná prítomnosť biogénnych amínov (Kalač *et al.*, 2002).

V záujme znížiť obsah biogénnych amínov v pivách je dôležité vyberať si správne východiskové suroviny. Jedným z riešení je vhodný vyber jačmeňa, nakoľko rôzne odrody obsahujú odlišný rozsah dusíkatých látok, z ktorých neskôr vznikajú prekursori biogénnych amínov. Riešením je aj použitie doplnkových obilnín k jačmeňu, ktoré neobsahujú biogénne amíny a zároveň sú zdrojom zkvasiteľných sacharidov (Kalač *et al.*, 2002). Aj keď sa pivovarské kvasinky nejavia ako zdroj biogénnych amínov, je dôležité klásť dôraz na ich premývanie kyselinou fosforečnou. Pri tomto procese by malo prísť k úhynu baktérií na nich uviaznutých vplyvom veľmi kyslého pH, zatiaľ čo kvasinky sú voči nemu odolné. Niektoré baktérie sú však acidotolerantné, takže je možné, že premývanie prežívajú. Čerstvé kvasinky, alebo sušené sú mikrobiologicky čisté a tak nepodporujú rozvoj nežiaducej mikroflóry (Basařová *et al.*, 2010). Niektoré štúdie poukázali, že použitie korenia vo výrobe, môže mať pozitívny vplyv na minimalizovanie obsahu biogénnych amínov v potravinách. Korenie je využiteľné skôr v mliečnych a mäsových fermentovaných výrobkoch, v prípade piva by bol možný prídavok zázvoru, škorice, klinčeka a iných. Zázvor znižuje obsah putrescínu a škorica s klinčekmi zase obsah histamínu (Komprda *et al.*, 2004; Mah *et al.*, 2009).

3.2 Biogénne amíny vznikajúce počas výroby a skladovania

Medzi biogénne amíny najčastejšie vznikajúce pri výrobe piva patria:

- histamín,
- tyramín,
- kadaverín.

Pivo vo všeobecnosti nie je dobré médium pre rast väčšiny MO, tento fakt je spôsobený: kyslým pH, nízkym obsahom kyslíka, vysokým obsahom CO₂, prítomnosťou etanolu a antibakteriálnych chmeľových zlúčenín. Napriek tomu, niektoré mikroorganizmy tu dokážu rásť a spôsobovať zákal a iné nepriaznivé zmeny, ku ktorým patrí aj tvorba biogénnych amínov. Medzi tieto mikroorganizmy radíme niektoré rody zo skupiny kyslomliečnych baktérií. Vo všeobecnosti sa v pivovarníctve kyslomliečne baktérie radia medzi kontaminujúcu mikroflóru, existujú však výnimky v technológiách, kde sa tieto mikroor-

ganizmy zámerne pridávajú (Li *et al.*, 2017). Jedná sa o piva belgického typu tzv. lambické piva, ktoré sa vyrábajú spontánnym kvasením, respektíve sa infikujú mikroorganizmami prítomnými vo vzduchu (Spitaels *et al.*, 2015). Ako producenti biogénnych amínov sú označené hlavne niektoré druhy rodov *Lactobacillus* spp. a *Pediococcus* spp.. Najviac vyskytovaný producenti biogénnych amínov v pive sú: *Lactobacillus frigidus* (histamín, tyramín), *Lactobacillus brevis* (histamín, tyramín), *Lactobacillus plantarum* (tyramín, tryptamín), *Lactobacillus buchneri* (histamín); *Enterococcus faecium* (tyramín), *Enterococcus faecalis* (tyramín); *Leuconostoc mesenteroides* (tyramín); *Pediococcus damnosus* (tyramín) (Kalač a Krížek, 2003; Izquierdo-Pulido, 1996; Kalač *et al.*, 2002).

Poveda *et al.* (2017) sledovali produkciu biogénnych amínov počas tradičnej výroby španielskeho piva. Identifikovali *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, pričom tyramín bol ako jediný amín produkovaný všetkými kmeňmi. Všetky kmene obsahovali gény pre dekarboxyláciu histidínu a ornitínu, napriek tomu neboli vyprodukované k nim korešpondujúce biogénne amíny v sladine ani v pive. Tento fakt sa pripisuje možnej existencii tichého génu, alebo k neprítomnosti optimálnych environmentálnych podmienok pre ich produkciu. Zároveň je nutné podotknúť, že existuje málo prác, ktoré by popisovali *Leuconostoc mesenteroides*, ako producenta tyramínu (Poveda *et al.*, 2017).

Nízka koncentrácia kyslíka, ktorá je prítomná v pivách práve spomínaným kyslomliečnym baktériám vyhovuje. Zástupcovia z rodu *Lactobacillus* sú fakultatívne anaeróbné, častokrát mikroaerofilní a zástupci rodu *Pediococcus* sú anaeróbné (Basařová *et al.*, 2010).

Podmienky prostredia môžu ovplyvňovať produkciu BA v dvoch smeroch. V prvom rade sú zodpovedné za metabolizáciu dekarboxylačných buniek a v druhom rade ovplyvňujú aktivitu dekarboxyláz ako enzýmov. Pričom optimálne hodnoty pre tieto dva faktory sa môžu líšiť. To znamená, že rast bakteriálnych buniek, ktoré dokážu produkovať biogénne amíny je nevyhnutnou podmienkou pre ich produkciu avšak nie dostačujúcou. Z tohto dôvodu je veľmi obtiažné nájsť optimálne hodnoty pre ich produkciu, pretože existujú rozdiely ich produkcie medzi uvažovanými typmi potravín, medzi metabolickými dráhami, ale aj z dôvodu veľkej heterogenity dekarboxylázovej aktivity dokonca aj v kmeňoch toho istého druhu (Marcobal *et al.*, 2006).

Teploty blízke optimálnej hodnote rastu buniek podporujú bunkový metabolizmus a proliferáciu. Nepreukázalo sa však, že prítomnosť vysokého počtu dekarboxylačných buniek musí vždy znamenať aj vysokú produkciu biogénnych amínov. Gardini *et al.* (2001) zaznamenali, že nárast teploty u *Enterococcus faecalis* EF37 z 16 na 44 °C sa zhodoval s rýchlejším rastom a s rýchlejšou a intenzívnejšou akumuláciou tyramínu. Bargossi *et al.* (2015) extrahoval tyrozín dekarboxylázu z *Enterococcus faecalis* a sledoval vplyv teploty na jeho aktivitu, pričom najvyššiu zaznamenal medzi 30 a 37 °C. V ďalšej práci Bagossi *et al.* (2015) zistili maximálnu aktivitu dekarboxylázy z buniek *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* pri 37 °C po 2 hodinách inkubácie. Avšak po 24 hodinách bol zistený maximálny obsah tyramínu vo vzorke, ktorá bola inkubovaná pri menej priaznivej teplote 20 °C. Autori Zhang a Ni (2014) zistili, že tyrozín dekarboxyláza z *Lactobacillus brevis* mala svoju optimálnu teplotu pri 50 °C, bola však rýchlo inaktivovaná pri vyššej teplote. Aktivita enzýmu pri uvedenej optimálnej teplote bola počas jednej hodiny rýchlo znížená. Marcobal *et al.* (2006) zistili, že optimálna teplota pre výrobu tyramínu v aeróbnom stave *Enterococcus faecium* a *Lactobacillus brevis* bola 32 °C. Naproti tomu za anaeróbných podmienok bola dosiahnutá maximálna koncentrácia tyramínu pri 22,0 až 24,5 °C. Všeobecne platí, že schopnosť produkovať biogénne amíny je obmedzená znížením teploty. Znamená to, že kontrola chladiaceho reťazca počas skladovania a komercializácie je hlavným nástrojom na zabránenie akumulácie nežiaducich produktov po výrobe (Knoppe *et al.*, 2014). Použitie tepelných úprav (pokiaľ je to možné) na suroviny môže prispieť k eliminácii divokej dekarboxylačnej mikroflóry. Gramnegatívni výrobcovia biogénnych amínov – enterobaktérie a pseudomonády sa rýchlo inaktivujú pri teplotách vyšších ako 60 °C. Kyslomliečne baktérie sú odolnejšie a vyžadujú drastickejšie tepelné úpravy. Z tohto dôvodu sú zvyčajne syry z pasterizovaného mlieka charakterizované nižším obsahom biogénnych amínov (Marino *et al.*, 2008).

Všeobecne platí, že zvyšujúce sa koncentrácie soli prispievajú k zníženiu akumulácie BA v potravinách. V prvom rade dochádza k zníženiu metabolických aktivít dekarboxylačných mikroorganizmov. Inhibované sú najmä gram-negatívne baktérie oproti gram-pozitívnym. Ale, existujú práce kedy sa preukázala produkcia biogénnych amínov aj v prítomnosti NaCl. Bargossi *et al.* (2015) študovali produkciu tyramínu *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* v prítomnosti NaCl. *Enterococcus faecalis* so zvyšujúcim obsahom soli (0-5 %) čiastočne znižoval svoj tyraminogénny potenciál buniek, ale dekarboxylačná aktivita

zostala nezmenená až do 15 % NaCl. Na druhej strane rovnaká enzymatická aktivita v bunkách *Enterococcus faecium* zostala takmer konštantná nezávisle na koncentrácii NaCl (Bargossi *et al.*, 2015). Kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* dosiahli svoju maximálnu produkciu tyramínu v syntetickom médiu iba v prítomnosti vyššej koncentrácie solí (2 %). Rovnaké podmienky umožňovali maximálnu produkciu tyramínu ako aj najnižšiu dobu na produkciu detegovateľných množstiev BA. Dôležité je poznamenať, že pivo neobsahuje také množstvo solí, aby bolo produkcii biogénnych amínov zabránené (Buňková *et al.*, 2011).

Aktivácia dekarboxylázových systémov je súčasťou komplexných metabolických odpovedí na prítomnosť rôznych stresových podmienok (Pessione *et al.*, 2009). Dekarboxylácia je mechanizmom buniek na potlačenie kyslého stresu, existuje teda súvislosť medzi pH a produkciou biogénnych amínov (Pereira *et al.*, 2009). Pivo má relatívne nízke pH, ktoré sa pohybuje v rozmedzí 3,8 – 4,7, preto sa označuje za mikrobiálne stabilný produkt. Niektorým kmeňom kyslomliečnych baktérií vyhovuje kyslejšie prostredie, vyznačujú sa svojou acidotolerantnosťou, preto nižšie pH im nezabraňuje produkciu biogénnych amínov. Pivá s vyšším pH (menej prekvasené) sú ďaleko viac náchylné k rozvoju nežiaducej mikrofóry, obsahujú vyšší obsah aminokyselín a skvasiteľných cukrov (Matoulková a Kubizniaková, 2015). Preukázalo sa, že transkripcia génov mnohých dekarboxylázových klastrov je indukovaná nízkym pH. Výsledky štúdií sa líšia pri porovnávaní aktivity čistého enzýmu a aktivity dekarboxylázy živých buniek (Pereira *et al.*, 2009). Kmeň *Enterococcus faecalis* ukázal maximálnu akumuláciu tyramínu pri pH 4 po 2 hodinách inkubácie a pH medzi 4 a 5 po 24 hodinách. V tom istom systéme kmeň *Enterococcus faecium* nevykazoval relevantné rozdiely v aktivite dekarboxylázy pri pH medzi 4 a 6. Neboli pozorované žiadne pH rozdiely vo vzťahu k produkcii tyramínu v celých bunkách alebo bunkových extraktoch *Lactobacillus brevis*, avšak bezbunkový extrakt mal vyššiu aktivitu v porovnaní s celými bunkami (Moreno-Arribas *et al.*, 2001).

Práve prítomnosť etanolu je jedným z faktorov, ktorý spôsobuje nižší obsah biogénnych amínov v pive oproti iným fermentovaným výrobkom. Etanol sa zaraďuje medzi silný inhibítor rastu mikroorganizmov, pričom jeho účinok podporuje teplota alebo pH. Romero *et al.* (2003) pri sledovaní obsahu biogénnych amínov v španielskych pivách zistili rastúci obsah biogénnych amínov s rastúcim obsahom alkoholu. So zvyšujúcim sa obsahom alko-

holu rastie aj dĺžka fermentácie, tým pádom pivná mikroflóra má väčší priestor pre možné pôsobenie a rozmnožovanie (Romero *et al.*, 2003).

Horké chmeľové látky v izomérovej forme vykazujú antimikrobiálnu aktivitu voči gram-pozitívnym baktériám a aj niektorým hubám. Predpokladá sa, že iso- α -kyseliny a ich deriváty sa správajú ako protónofóry, to znamená, že spôsobujú zvýšenú permeabilitu lipidových vrstiev pre protóny v biologických membránach. Tieto látky sa vo svojej nedisociovannej forme dostávajú do vnútra buniek prostredníctvom pasívnej difúzie. V cytoplazme dochádza k disociácii iso- α -kyselín na anióny a protóny. Uvoľnené protóny spôsobujú pokles vnútrobunkového pH, čo vedie k narušeniu transmembránových transportných procesov. Tento fakt má za následok narušenie príjmu živín v bunke, pokles aktivity enzýmov, ovplyvňuje bunkové proteíny a aj DNA. Uvoľnené anióny opúšťajú bunku v podobe neutrálnych komplexov, ktoré vznikli reakciou s bunkovými dvojmocnými kationmi. Napriek tomu, že kyslomliečne baktérie sú gram-pozitívne, niektoré kmene sa vyznačujú silnou rezistenciou voči horkým chmeľovým látkam. Táto rezistencia sa pripisuje existencii génov horA, horC a hitA, ktorými určité kmene kyslomliečnych baktérií disponujú. Produkty týchto génov (horA, horC) fungujú ako membránové pumpy, ktoré vylučujú nedisociované chmeľové kyseliny z bunky a týmto spôsobom znižujú ich antimikrobiálny účinok. Génom hitA sú pravdepodobne kódované membránové prenášače dvojmocných kationov, ktoré kompenzujú stratu bunkových kationov vplyvom pôsobenia chmeľových látok. Spomínané gény boli detekované u *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus paracollinoides* a *Pediococcus damnosus* (Suzuki *et al.*, 2008). Podľa Matoulková *et al.* (2012) je schopnosť *Lactobacillus brevis* prežívať v pive a spôsobovať jeho kazenie, dôsledkom odpovede na niekoľko stresových faktorov (alkohol, pretlak CO₂ a horké chmeľové látky) a teda nie je závislá len na rezistencii k horkým chmeľovým látkam. V ich práci preukázali, že so stúpajúcou koncentráciou horkých chmeľových látok sa v suspenzii znižoval počet buniek (Matoulková *et al.*, 2012).

Aseptický proces pri výrobe piva bohužiaľ nie je možné zabezpečiť, ale je možné rizika kontaminácie minimalizovať. Ako bolo už spomenuté vyššie, je nutné zabezpečiť spoľahlivú filtráciu, pasterizáciu, hygienu balenia a podmienky skladovania. Pradenas *et al.* (2016) sledovali obsah biogénnych amínov na čilskom trhu, z tejto práce vyplýva, že pivá pochádzajúce z mikropivovarov mali vyšší priemerný obsah biogénnych amínov ($19,13 \pm$

16,92 mg/l) než piva pochádzajúce z makropivovarov ($9,65 \pm 4,5$ mg/l), autori v mikropivovaroach poukazujú hlavne na nedostatky hygienického typu (Pradena *et al.*, 2016).

Filtrácia je mechanické odstránenie kvasiniek a baktérií. V princípe spočíva niekoľkonásobným prietokom piva cez filtračnú vrstvu alebo cez viaceré filtračné vrstvy so znižujúcim sa prietokom. V prvom rade dochádza k odstráneniu kvasiniek a neskôr aj baktérií, ktorých veľkosť je menšia. Najrozšírenejšie filtre sú kremelinové, no v súčasnosti sú moderné membránové separačné filtre, tieto technológie si nevyžadujú prítomnosť filtračných materiálov. Pri nedostatočnej filtrácii sa dostávajú nežiaduce mikroorganizmy do spotrebných balení, v ktorom spôsobujú značné škody nielen z hľadiska produkcie biogénnych amínov (usadeniny, zákaly) (Kosař, Prochádzka, 2000; Kadlec *et al.*, 2000).

Nedostatočná pasterizácia je jednou z príčin vzniku biogénnych amínov počas skladovania, príčinou sú tie kyslomliečne baktérie, ktoré tento tepelný zákrok prežili. Pri plnení je takisto dôležité udržiavať proces pod prísnu kontrolu, aby došlo k zamedzeniu sekundárnej kontaminácie. V procese skladovania hrajú v tvorbe biogénnych amínov hlavné úlohy dva faktory: teplota skladovania a jeho čas (Basařová *et al.*, 2010). Anli *et al.* (2006) preukázali, že so zvyšujúcou sa teplotou a dobou skladovania sa zvyšoval aj obsah biogénnych amínov. Po ôsmich týždňoch skladovania sa celkový obsah biogénnych amínov zvýšil pri 25 °C 10-násobne, zatiaľ čo pri 6°C došlo k 5-násobnému nárastu (Anli *et al.*, 2006).

Dokázalo sa, že hygiena čapovania môže mať takisto vplyv na výskyt biogénnych amínov. Diel *et al.* (2009) sledovali vzorky odobraté z mestských reštaurácií v Nemecku, porovnávali vplyv hygienických aspektov pri čapovaní na obsah histamínu. Vykonal rozbor piva pred mechanickým/chemickým čistením (4,84 – 31,94 ng/ml) čapovacieho kohútika a skladovacieho zariadenia a po ňom. Preukázalo sa, že po mechanickom čistení klesol obsah histamínu (3,94 – 6,13 ng/ml) a pri dodatočnom chemickom čistení nebola detekovaná takmer žiadna kontaminácia histamínom (pred 2,63 – 5,5 ng/ml; po 0,406 – 0,446 ng/ml) (Diel *et al.*, 2009).

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo stanoviť biogénne amíny vo fľaškových pivách pochádzajúcich z českých mikropivovarov a zistiť ich zmeny v obsahu po uplynutí dátumu minimálnej trvanlivosti (DMT).

Cieľom praktickej časti bolo:

- stanoviť obsah biogénnych amínov u pív z českých mikropivovarov bezprostredne po ich kúpe,
- založiť skladovací pokus a stanoviť obsah biogénnych amínov po uplynutí DMT,
- namerané výsledky spracovať a odvodiť závery.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Popis vzoriek

Chromatografickým stanovením sa identifikovalo osem biogénnych amínov (fenyletylamín, tryptamín, putrescín, kadaverín, histamín, tyramín, spermidín, spermín) v 115 vzorkách pív, ktorých obsah alkoholu sa pohyboval 4 – 8 %. Pivá pochádzali z 35 českých mikropivovarov a počas celého experimentu boli skladované pri teplote 8 ± 2 °C. Zo 115 vzoriek bolo 65 kusov ležiakov, 38 kusov špeciálnych pív a 12 kusov výčapných. Z celkového množstva bolo 89 kusov pív svetlých, 12 kusov tmavých, 13 kusov polotmavých a 1 kus rezaného piva. V tabuľke 3 sú uvedené charakteristiky jednotlivých vzoriek pív. Od každej vzorky boli zakúpené dva kusy výrobkov rovnakej šarže, tak aby bol stanovený obsah biogénnych amínov v pive po jeho zakúpení (v dobe spotreby) a po uplynutí DMT. Pred každým stanovením došlo k zmeraniu pH vzorky.

Tabuľka 3 Popis analyzovaných vzoriek pív.

Pivovar	Číslo vzorky	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Pasterizácia	Poznámka
A	39	svetlé	špeciál	5,7	nie	nefiltrované
	40	svetlé	špeciál	5,1	nie	nefiltrované
	41	svetlé	ležiak	4,9	nie	nefiltrované
	42	polotmavé	špeciál	5,2	nie	nefiltrované
B	12	polotmavé	ležiak	4,3	áno	
	13	svetlé	špeciál	6,0	áno	
	106	svetlé	ležiak	5,0	áno	
C	8	svetlé	ležiak	5,0	áno	
	84	svetlé	ležiak	4,8	áno	
	85	svetlé	výčapné	4,2	áno	
	86	svetlé	výčapné	4,0	áno	extra chmeľené
	87	svetlé	špeciál	5,0	áno	ochutené
	88	svetlé	ležiak	4,8	áno	ochutené
D	76	tmavé	ležiak	5,2	áno	
	77	svetlé	výčapné	4,0	áno	
	78	svetlé	ležiak	5,0	áno	

Pivovar	Číslo vzorky	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Pasterizácia	Poznámka
	80	tmavé	ležiak	5,0	áno	
	81	svetlé	ležiak	4,5	áno	
Dz	9	svetlé	ležiak	5,1	nie	
	10	svetlé	ležiak	4,5	nie	
	49	polotmavé	ležiak	5,1	nie	
	50	svetlé	ležiak	5,0	nie	
E	34	polotmavé	špeciál	5,5	áno	
	108	svetlé	ležiak	4,7	áno	
	109	svetlé	špeciál	6,5	áno	
	112	svetlé	ležiak	5,0	áno	
F	6	svetlé	ležiak	5,2	áno	
	7	svetlé	ležiak	5,0	áno	pšeničné, kvasnicové
G	63	svetlé	ležiak	5,0	nie	nefiltrované
	64	svetlé	špeciál	5,5	nie	nefiltrované
	65	svetlé	ležiak	4,5	nie	nefiltrované
H	36	tmavé	ležiak	5,2	áno	
	38	svetlé	špeciál	7,0	áno	
	44	svetlé	ležiak	5,2	áno	
	45	svetlé	špeciál	7,3	nie	nefiltrované
	46	tmavé	ležiak	4,4	áno	
Ch	14	svetlé	špeciál	5,1	nie	
	15	svetlé	ležiak	5,0	nie	
	16	tmavé	výčapné	4,2	nie	
I	11	svetlé	ležiak	4,9	nie	
	107	svetlé	výčapné	4,1	nie	
	111	tmavé	ležiak	4,2	nie	
J	47	svetlé	výčapné	4,6	nie	
	48	svetlé	ležiak	5,0	nie	
K	98	svetlé	ležiak	4,8	áno	
	99	tmavé	špeciál	7,0	áno	
	51	svetlé	ležiak	5,2	áno	
	54	svetlé	špeciál	6,0	áno	
L	32	svetlé	ležiak	5,1	áno	
	33	svetlé	ležiak	4,3	áno	
	103	svetlé	ležiak	5,0	nie	
M	66	svetlé	ležiak	4,3	nie	nefiltrované
	67	svetlé	ležiak	4,3	nie	nefiltrované

Pivovar	Číslo vzorky	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Pasterizácia	Poznámka
	68	polotmavé	ležiak	4,6	nie	nefiltrované
	69	svetlé	ležiak	4,6	nie	nefiltrované
	70	svetlé	špeciál	6,4	nie	nefiltrované
	73	svetlé	špeciál	5,3	nie	nefiltrované
N	57	svetlé	ležiak	5,2	nie	
	59	svetlé	ležiak	4,5	nie	
O	71	tmavé	špeciál	5,3	nie	
	72	svetlé	špeciál	5,1	nie	
P	25	svetlé	ležiak	5,3	áno	
	26	svetlé	špeciál	7,0	áno	
	102	svetlé	výčapné	4,5	áno	
	89	tmavé	špeciál	6,3	áno	
	24	svetlé	špeciál	6,3	áno	
Q	60	svetlé	ležiak	4,7	nie	
	61	svetlé	ležiak	5,0	nie	
R	28	svetlé	ležiak	5,0	áno	
	58	tmavé	špeciál	8,0	áno	
	27	svetlé	špeciál	6,0	áno	
S	21	svetlé	ležiak	5,0	nie	nefiltrované, pšeničné
	22	svetlé	špeciál	5,8	nie	nefiltrované, ochutené
	23	svetlé	špeciál	5,8	nie	nefiltrované
	35	svetlé	špeciál	7,6	nie	nefiltrované, ochutené
	37	svetlé	výčapné	4,1	nie	nefiltrované
T	19	svetlé	špeciál	6,0	áno	
	20	svetlé	ležiak	5,3	áno	
	104	svetlé	výčapné	4,6	áno	
	105	svetlé	ležiak	5,0	áno	
	55	rezané	ležiak	5,0	áno	
U	90	svetlé	ležiak	5,0	áno	
	113	svetlé	špeciál	6,5	áno	
V	93	svetlé	špeciál	5,8	áno	ochutené
	62	svetlé	výčapné	4,0	áno	
	17	svetlé	ležiak	5,2	áno	
W	94	svetlé	špeciál	6,0	áno	
	100	polotmavé	ležiak	4,6	áno	

Pivovar	Číslo vzorky	Charakter piva	Typ piva	Obsah alkoholu (%)	Pasterizácia	Poznámka
X	31	polotmavé	špeciál	5,2	áno	
	83	svetlé	ležiak	4,5	áno	nefiltrované, pšeničné
	97	polotmavé	špeciál	5,5	áno	
	101	svetlé	ležiak	4,4	áno	
Y	52	polotmavé	ležiak	5,0	áno	
	53	svetlé	ležiak	5,0	áno	
	74	svetlé	ležiak	5,2	áno	
	75	svetlé	ležiak	4,7	áno	nefiltrované
	79	polotmavé	špeciál	7,0	áno	nefiltrované
	82	svetlé	výčapné	4,5	áno	
Z	43	svetlé	špeciál	5,5	áno	
	1	polotmavé	špeciál	7,3	áno	
	2	svetlé	ležiak	4,8	áno	
	3	svetlé	ležiak	5,1	áno	
	4	svetlé	ležiak	5,3	áno	nefiltrované
	5	svetlé	ležiak	5,3	áno	
	92	svetlé	ležiak	4,5	áno	bezlepkové
	95	tmavé	špeciál	5,7	áno	
	115	tmavé	špeciál	5,7	áno	
*	91	svetlé	výčapné	4,7	áno	
	56	polotmavé	ležiak	5,0	áno	
	110	svetlé	ležiak	4,7	nie	
	29	svetlé	ležiak	4,8	áno	
	18	svetlé	ležiak	5,0	nie	
	96	polotmavé	špeciál	6,5	áno	
	30	svetlé	špeciál	6,0	áno	

*Vzorky pochádzajúce z odlišných pivovarov

5.2 Stanovenie pH

Pivá boli opatrne otvorené a naliate do označených Erlenmeyerových baniek, následne sa nechali odpeniť na trepačke približne 30 minút. Po odpenení boli trikrát zmerané hodnoty pH (Separ Eutech – pH, USA), výsledok je uvedený ako ich aritmetický priemer. Takto pripravené vzorky sa ďalej upravovali na samotné chromatografické stanovenie.

5.3 Příprava vzoriek pre chromatografické stanovenie

Zo vzorky sa odobralo 5 ml a obsah bol zriedený s 1,2 M kyselinou chloristou (Sigma-Aldrich, USA) v pomere 1:1, následne došlo k dôkladnému premiešaniu. Do derivatizačnej nádoby sa odobralo 1 ml zo zriedeného vzorku, pričom sa vykonávalo 5 paralelných stanovení. K 1 ml vzorku bolo napipetovaných 100 μ l vnútorného štandardu 1,7-diaminoheptánu (Sigma-Aldrich) o koncentrácii 500 mg/l a 1,5 ml karbonátového pufru s pH v rozmedzí 11,1 – 11,2.

V ďalšom kroku bol pridaný čerstvo pripravený roztok dansylchloridu (Sigma-Aldrich) v acetóne (Sigma-Aldrich) o koncentrácii 5 g/l. Takto pripravená vzorka bola riadne uzavretá a došlo k jej premiešaniu na trepačke počas 20 hodín v tme. Po 20 hodinovej prestávke sa pridalo 200 μ l prolínu (Merck) a opäť došlo k premiešaniu na trepačke ďalšiu 1 hodinu. Do každého vzorku boli pridané 3 ml heptánu (Sigma-Aldrich). Vzorky boli uzavreté a znovu pretrepané, tentoraz 3 minúty ručne. Z derivatizačných nádobiek bol odpipetovaný 1 ml z heptánovej vrstvy do vopred označených vialiek. Objem vialiek bol pod prúdom dusíka pri 60 °C odparený a vzniknutý suchý odparok zriedený s 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich).

Takto upravené vzorky sa do chromatografickej analýzy skladovali v mraziacom zariadení pri -18 °C. Pred samotnou analýzou došlo k prefiltraniu vzoriek cez striekačkový filter s porozitou 0,22 μ m a ďalej k dávkovaniu do chromatografického systému.

5.4 Chromatografické stanovenie biogénnych amínov

Zderivatizované a prefiltrované vzorky boli nanášané na kolónu (Zorbax C18 RRHD s rozmermi 3 x 50 mm, pórovitosťou 1,8 μ m a prietokom 0,45 ml/min) s chromatologickým systémom (binárna pumpa a autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) s UV/VIS-DAD detektorom ($\lambda = 254$ nm) a termostatom (Agilent Technologies, USA). Podmienky separácie, ale aj detekcie BA boli nastavené podľa Smelá *et al.*, pričom separácia bola vykonaná gradientovou elúciou. Podmienky gradientovej elúcie sú uvedené v tabuľke 4. Chromatogramy boli vyhodnotené pomocou programu Clarity. Výsledky chromatogramov u stanovených biogénnych amínov sú uvádzané ako priemerná hodnota \pm smerodajná odchýlka.

*Tabulka 4 Lineární gradientový elučný program**HPLC.*

Čas [min]	10% acetonitril [%]	100% acetonitril [%]
0	41	59
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V diplomovej práci došlo k sledovaniu obsahu ôsmych biogénnych amínov (tryptamín, fenyletylamín, putrescín, kadaverín, histamín, tyramín, spermidín a spermín) v 115 vzorkách pív. Vzorky pochádzali z 35 českých mikropivovarov, každá vzorka bola zakúpená dvakrát, tak aby pochádzala z rovnakej šarže. Obsah biogénnych amínov bol stanovovaný ihneď po zakúpení piva (v dobe použiteľnosti) a po uplynutí DMT. Počas experimentu boli vzorky skladované pri teplote 8 °C a pred každou analýzou došlo k zmeraniu pH vzorky. Biogénne amíny sa stanovovali pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

6.1 Obsah biogénnych amínov v ležiakoch

V tejto práci bol sledovaný obsah ôsmych biogénnych amínov v 65 ležiakoch, z čoho bolo 53 kusov pív svetlých, 5 tmavých, 6 polotmavých a 1 rezané. Zmeny v celkovom obsahu biogénnych amínov sú zaznamenané v tabuľke 5.

Tabuľka 5 Celkový obsah biogénnych amínov (mg/l) v ležiakoch.

Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov		Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov		Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
2	ND	65,0	41	75,4	96,6	75	15,0	11,7
3	146,0	158,6	44	47,9	105,2	76	14,6	259,5
4	167,8	176,5	46	70,9	79,1	78	18,4	27,9
5	103,4	153,8	48	8,3	17,3	80	47,2	48,7
6	10,3	31,0	49	35,9	56,5	81	15,5	28,2
7	22,6	64,8	50	34,9	60,7	83	9,6	21,3
8	19,2	ND	51	69,3	70,3	84	10,5	17,0
9	50,1	ND	52	4,5	12,4	88	8,4	22,8
10	48,4	43,4	53	3,8	12,1	90	78,9	15,6
11	17,6	67,0	55	17,8	76,6	92	105,5	72,4
12	11,4	14,3	56	14,3	44,5	98	58,5	128,8
15	17,0	16,4	57	8,1	20,1	100	45,7	19,8
17	19,0	16,4	59	9,1	20,9	101	156,2	21,3
18	11,4	12,7	60	74,4	74,9	103	61,4	83,3
20	34,6	83,5	61	73,3	64,5	105	42,0	33,1
21	6,1	ND	63	124,7	154,1	106	23,3	47,0
25	22,9	31,4	65	119,6	92,2	108	32,6	19,7
28	14,4	4,6	66	96,2	63,8	110	103,1	99,1
29	18,4	1,0	67	111,7	98,6	111	29,2	50,5
32	50,1	61,0	68	104,3	58,2	112	20,4	57,7

Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov		Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov		Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
33	29,6	78,3	69	15,2	2,6	114	27,9	21,2
36	1,7	20,1	74	20,2	5,1			

ND – nedetekovaný biogénny amín

Na počiatku experimentu (po zakúpení vzoriek) nebola prítomnosť biogénnych amínov zistená iba u jednej vzorky (vzorka 2), pričom celkové množstvo kolísalo od 1,7 až po 167 mg/l. Celkový obsah biogénnych amínov pod 10 mg/l bol identifikovaný u pív (vzorky 21, 36, 48, 52, 53, 57, 59, 83, 88), v rozmedzí 10 – 20 mg/l bol zistený u 34 pív (vzorky 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 25, 28, 29, 33, 44, 49, 50, 55, 56, 69, 74, 75, 76, 78, 80, 81, 84, 100, 105, 106, 108, 111, 112, 114) a v rozmedzí 50 – 100 mg/l bolo stanovených 11 vzoriek (vzorky 9, 32, 41, 46, 51, 60, 61, 66, 90, 98, 103). U zvyšných vzoriek (10 vzoriek) bol obsah vyšší než 100 mg/l (vzorky 3, 4, 5, 63, 65, 67, 68, 92, 101, 110). Vzorka číslo 4 mala bezprostredne po zakúpení najvyšší obsah biogénnych amínov (167,8 mg/l).

Na konci experimentu nebola zaznamenaná prítomnosť žiadnych biogénnych amínov u troch vzoriek (vzorky 8, 9, 21), celkový obsah kolísal od 1,0 až po 259,5 mg/l. Obsah biogénnych amínov pod 10 mg/l bol u 4 vzoriek (vzorky 28, 29, 69, 74), v rozmedzí 10 – 50 mg/l sa zistil u 28 vzoriek (vzorky 6, 10, 12, 15, 17, 18, 25, 36, 48, 52, 53, 56, 57, 59, 75, 78, 80, 81, 83, 84, 88, 90, 100, 101, 105, 106, 108, 114), obsah medzi 50 – 100 mg/l bol u 23 vzoriek (vzorky 2, 7, 11, 20, 32, 33, 41, 46, 49, 50, 51, 55, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 92, 103, 110, 111, 112). Celkový obsah biogénnych amínov nad 100 mg/l bol stanovený u 7 vzoriek (vzorky 3, 4, 5, 44, 63, 76, 98), pričom najvyšší celkový obsah biogénnych amínov (259,5 mg/l) mala vzorka 76.

U 41 vzoriek došlo k zvýšeniu celkového obsahu biogénnych amínov po uplynutí DMT. U 20 pív (vzorky 3, 4, 5, 12, 18, 25, 32, 41, 46, 49, 50, 51, 60, 63, 78, 80, 81, 84, 88, 103, 111, 112) došlo iba k miernemu navýšeniu obsahu. U 13 pív došlo k dvojnásobnému (vzorky 7, 20, 33, 44, 48, 52, 57, 59, 83, 88, 98, 106, 112), u 4 pív k trojnásobnému (vzorky 6, 7, 53, 56) a u 2 pív až štvornásobnému (vzorky 11 a 55) nárastu. U piva 36 bolo zvýšenie jedenásťnásobné a u piva 76 až sedemnásťnásobné. U jedného piva (vzorka 2) došlo na konci experimentu k zmene z nedekovateľného množstva (ND) na 65,0 mg/l.

Naopak 24 vzoriek malo na konci experimentu celkový obsah nižší, než na počiatku stano-
venia (po zakúpení). U väčšiny pív (vzorky 10, 15, 17, 61, 65, 66, 67, 68, 75, 92, 105, 108,
110, 114) došlo len k miernemu zníženiu v celkovom obsahu biogénnych amínov.
U ostatných vzoriek bolo zníženie obsahu biogénnych amínov dvojnásobné (vzorka 100),
trojnásobné (vzorka 28), štvornásobné (vzorka 74), päťnásobné (vzorky 69, 90), a až se-
demnásobné (vzorka 101). V prípade vzorky 29 došlo až k osemnásťnásobnému poklesu.
Tri pivá (vzorky 8, 9, 21) neobsahovali po uplynutí DMT žiadne biogénne amíny, aj na-
priek tomu, že po zakúpení im určité množstvo BA detekované bolo. U vzorky 9 bolo po
jej zakúpení detekovaných 50,1 mg/l no na konci skladovania žiadne detekovateľné množ-
stvo BA neobsahovala.

Prítomnosť a množstvo jednotlivých biogénnych amínov v ležiackych pivách sú uvedené
v tabuľke 6 (pre tryptamín, fenyetylamin, putrescín a kadaverín) a v tabuľke 7 (pre hista-
mín, tyramín, spermidín a spermín).

Tabuľka 6 Obsah vybraných biogénnych amínov (TRM, PEA, PUT, CAD) v ležiakoch.

Číslo vzorky	Tryptamín*		Fenyetylamin*		Putrescín*		Kadaverín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
2	ND	ND	ND	ND	ND	1,2±0,0	ND	21,7±0,0
3	ND	ND	ND	2,3±0,3	2,8±0,3	1,9±0,1	61,1±5,0	57,6±3,8
4	2,3±0,3	2,9±0,0	ND	ND	5,1±0,5	3,0±0,1	65,4±4,2	53,7±4,0
5	ND	ND	ND	ND	3,5±0,1	53,8±2,8	37,3±2,9	27,7±2,8
6	ND	ND	ND	ND	ND	17,1±0,3	1,1±0,2	4,6±0,1
7	ND	ND	ND	ND	ND	40,6±2,1	10,4±1,0	13,9±0,9
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,7±0,1	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	40,6±4,7	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	37,3±0,6	25,7±0,2
11	ND	ND	ND	ND	ND	1,7±0,1	5,5±0,7	4,8±0,6
12	ND	ND	ND	ND	ND	1,4±0,1	ND	1,8±0,9
15	ND	ND	ND	ND	ND	1,7±0,2	ND	2,9±1,9
17	ND	ND	ND	ND	1,0±0,2	1,5±0,1	1,2±0,1	1,7±0,3
18	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	ND	2,8±0,5	3,1±0,1
20	ND	ND	ND	ND	ND	7,4±0,7	15,4±0,2	10±0,8
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10,6±1,3	10,2±1,3
28	ND	ND	ND	ND	1,2±0,1	ND	1,0±0,3	1,5±0,6
29	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	ND	1,1±0,1	ND
32	ND	ND	ND	ND	1,1±0,5	1,1±0,1	31,8±16	39,3±4,1
33	ND	ND	ND	ND	ND	1,1±0,1	23,0±1,4	50,3±3,2

Číslo vzorky	Tryptamín*		Fenyletylamín*		Putrescín*		Kadaverín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
36	ND	ND	ND	ND	ND	1,8±0,5	ND	5,1±3,9
41	ND	ND	1,7±0,4	1,0±0,2	ND	1,7±0,5	22,9±1,2	32,2±3,1
44	ND	ND	ND	ND	ND	48,3±2,3	37,1±3,4	17,6±0,2
46	ND	ND	ND	ND	ND	4,5±0,1	30,9±1,9	16,2±0,2
48	ND	ND	ND	ND	ND	1,5±0,1	1,9±0,2	ND
49	ND	ND	ND	ND	ND	1,5±0,0	29,7±1,1	43,8±0,8
50	ND	ND	ND	ND	ND	1,6±0,3	30,3±1,8	44,2±0,7
51	ND	ND	ND	ND	ND	11,8±0,4	38,9±5,2	21,1±1,4
52	ND	ND	ND	ND	1,1±0,1	1,1±0,1	ND	ND
53	ND	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	ND	ND
55	ND	ND	ND	ND	ND	16,3±0,1	6,2±0,7	43,8±1,0
56	ND	ND	ND	ND	1,2±0,3	1,4±0,3	2,5±0,5	16,2±18,9
57	ND	ND	ND	3,8±4,5	ND	1,1±0,1	2,1±0,2	1,6±0,6
59	ND	ND	ND	1,4±0,7	ND	1,4±0,1	1,6±0,2	1,6±0,6
60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	38,1±2,0	44,8±0,8
61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36,1±2,6	38,8±4,0
63	ND	1,8±1,3	2,5±0,4	2,0±1,3	2,3±0,2	2,0±0,1	75,5±4,3	61,7±3,8
65	ND	ND	2,6±0,5	1,0±0,3	2,4±0,4	2,0±0,2	71,5±1,8	60±1,5
66	ND	ND	1,1±0,3	1,0±0,0	2,0±0,7	1,7±0,1	62,5±18,5	61,1±1,4
67	ND	ND	2,0±1,2	ND	2,2±0,5	11,7±1,0	68,5±5,2	31,2±2,2
68	ND	ND	ND	ND	1,6±0,1	1,5±0,3	59,8±1,9	56,7±9,5
69	ND	ND	ND	ND	2,5±0,7	ND	6,5±4,7	ND
74	ND	ND	ND	ND	1,3±0,2	ND	2,4±0,4	ND
75	ND	ND	ND	ND	1,2±0,4	1,6±0,1	1,6±0,4	1,2±0,1
76	ND	ND	ND	ND	1,1±0,0	17,2±14,0	1,6±0,1	42±40,8
78	ND	ND	ND	ND	1,4±0,0	11,8±1,0	1,8±0,0	3,4±0,0
80	ND	ND	ND	ND	1,2±0,3	1,4±0,1	1,9±0,8	1±0,4
81	ND	ND	ND	ND	1,5±0,1	1,6±0,1	2,8±0,4	1,2±0,2
83	ND	ND	ND	ND	ND	5,3±0,3	ND	ND
84	ND	ND	ND	ND	1,3±0,0	6,0±0,4	1,7±1,2	ND
88	ND	ND	ND	ND	1,2±0,1	5,6±0,5	ND	2,2±0,1
90	ND	ND	6,3±4,8	ND	6,6±6,4	1,9±0,5	25,7±36,0	ND
92	ND	ND	ND	ND	5,6±0,3	33,0±0,3	48,9±2,3	19,9±0,3
98	ND	ND	ND	ND	1,8±0,2	36,1±3,8	43,4±0,9	19,2±1,7
100	ND	ND	3,3±0,2	ND	2,7±2,2	1,4±0,0	12,4±15,0	1,6±0,2
101	ND	ND	2,5±1,3	ND	3,1±0,2	1,7±0,1	91,5±7,0	2,7±0,2
103	ND	ND	ND	ND	ND	16,2±1,9	20,5±0,9	21,6±1,5
105	ND	ND	ND	ND	18,2±0,6	10,6±0,6	13,1±1,1	ND
106	ND	ND	ND	ND	15,7±0,9	22,5±0,3	ND	ND
108	ND	ND	ND	ND	15±0,3	16,4±0,3	3,3±0,1	ND
110	ND	ND	ND	ND	9,9±0,4	15,0±1,5	20,7±0,5	ND

Číslo vzorky	Tryptamín*		Fenyletylamín*		Putrescín*		Kadaverín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
111	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
112	ND	ND	ND	ND	11,5±0,7	5,2±0,7	ND	ND
114	ND	ND	ND	ND	15,4±1,7	25,7±0,5	ND	ND
ΣBA (mg/l)	2,3	4,7	22,0	12,4	147,7	457,9	1263,1	1044,4

*Množstvo biogénneho amínu vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

ND – nedetekovaný biogénny amín.

Tryptamín bol jeden z najmenej sa vyskytujúcich biogénnych amínov. Bol detekovaný iba v dvoch vzorkách (vzorky 4 a 63). Obe vzorky mali tryptamínu pod 10 mg/l a v oboch prípadoch došlo k zvýšeniu tohto biogénneho amínu po uplynutí DMT.

Fenyletylamín (PEA) bol identifikovaný v 11 ležiakoch (vzorky 3, 41, 57, 59, 63, 65, 66, 67, 90, 100, 101). Po zakúpení sa jeho obsah vo vzorkách pohyboval od množstva 1,1 až po 6,3 mg/l a po uplynutí DMT sa toto rozmedzie zmenilo na 1,0 až 3,8 mg/l. Všetky piva okrem piva 90 ($6,3 \pm 4,8$ mg/l) obsahovali PEA pod 10 mg/l, ako po zakúpení tak aj po uplynutí DMT. Iba u 3 vzoriek (vzorky 3, 57, 59) došlo na konci experimentu k zvýšeniu obsahu PEA. U zvyšných 8 vzoriek (vzorky 41, 63, 65, 66, 67, 90, 100, 101) došlo naopak k miernemu zníženiu v obsahu tohto amínu, alebo amín detekovaný nebol. K najvyššiemu poklesu došlo u vzorky 90 (z 6,3 mg/l na ND). Súčet PEA vo všetkých pivách bol po zakúpení 22,0 mg/l a po uplynutí DMT 12,4 mg/l.

Putrescín (PUT) nebol vôbec detekovaný iba u 8 (vzorky 8, 9, 10, 21, 25, 60, 61, 111) z 65 vzoriek ležiakov. Po zakúpení bol PUT detekovaný v 35 vzorkách (tabuľka 6), pričom obsah tohto BA sa pohyboval v rozsahu od 1,0 po 18,2 mg/l. Väčšina týchto pív (26 vzoriek) obsahovala PUT pod 5 mg/l (tabuľka 6). Iba 5 pív (vzorky 105, 106, 108, 112, 114) z tejto skupiny obsahovalo viac PUT ako 10 mg/l bezprostredne po ich zakúpení, ale ani jedno nepresiahlo 20 mg/l. Najvyšší obsah PUT mala vzorka 105 ($18,2 \pm 0,6$ mg/l). Po uplynutí DMT bol PUT detekovaný v 51 vzorkách (tabuľka 6), jeho rozsah bol od 1,0 po 53,8 mg/l. V tomto období 35 pív obsahovalo PUT do 10 mg/l, u zvyšných 15 pív sa pohybovali hodnoty PUT od 10 do 50 mg/l a iba jedno pivo (vzorka 5) obsahovalo viac PUT ako 50 mg/l ($53,8 \pm 2,8$ mg/l). Po uplynutí DMT došlo k zvýšeniu množstva PUT oproti jeho množstvu po zakúpení u 38 pív (tabuľka 6). Bol zaznamenaný osemnásobný nárast množstva PUT u piva 78, päťnásobný u pív 76 a 5 a dvadsaťnásobný u piva 98. Celkom 22 vzoriek

bolo detekovaných až po uplynutí DMT, k najväčším zvýšeniam došlo u piva 7 (z ND na $40,6 \pm 2,1$ mg/l) a 44 (z ND na $48,3 \pm 2,3$ mg/l). U 17 pív (vzorky 3, 4, 18, 28, 29, 63, 65, 66, 68, 69, 74, 90, 100, 101, 105, 112, 114) došlo naopak k poklesu množstva PUT, oproti množstvu po jeho zakúpení. U väčšiny vzoriek môžeme tento pokles označiť za mierny (maximálne dvojnásobný), najviac sa zmenilo množstvo u vzorky 93 (trojnásobne) a v prípade vzorky 115 došlo z pôvodne detekovaného množstva $15,4 \pm 1,7$ mg/l k poklesu až na ND. U dvoch pív (vzorky 32 a 52) sa namerané hodnoty po skladovaní nezmenili. Na začiatku experimentu bolo v týchto vzorkách spolu namerané 147,7 mg/l putrescínu a na jeho konci 457,9 mg/l (trojnásobok).

Prítomnosť kadaverínu (CAD) bola zistená takmer vo všetkých vzorkách s výnimkou 8 pív (vzorky 21, 52, 53, 83, 106, 111, 112, 114). Pri zakúpení sa rozsah CAD pohyboval od 1,0 po 91,5 mg/l a bol detekovaný v 52 pivách (tabuľka 6). V tejto dobe 21 pív (vzorky 6, 8, 11, 17, 18, 28, 29, 48, 55, 56, 57, 59, 69, 74, 75, 76, 78, 80, 81, 84, 108) obsahovalo CAD v množstve nižšom ako 10 mg/l, v rozmedzí 10 – 50 mg/l bol CAD v 23 pivách (vzorky 5, 7, 9, 10, 20, 25, 32, 33, 41, 44, 46, 49, 50, 51, 60, 61, 90, 92, 98, 100, 103, 105, 110), nad 50 mg/l u 8 pív (vzorky 3, 4, 63, 65, 66, 67, 68, 101). Ani jedna hodnota nepresiahla hranicu 100 mg/l. Najviac CAD po zakúpení obsahovalo pivo 101 a toto množstvo bolo $91,5 \pm 7,0$ mg/l. Po uplynutí DMT bol CAD prítomný v 46 pivách. V množstve nižšom než 10 mg/l bol CAD zastúpený v 17 pivách (vzorky 6, 11, 12, 15, 17, 18, 28, 36, 57, 59, 75, 78, 80, 81, 88, 100, 101), v rozmedzí 10 – 50 mg/l sa nachádzal v 22 pivách (vzorky 2, 5, 7, 10, 20, 25, 32, 41, 44, 46, 49, 50, 51, 55, 56, 60, 61, 67, 76, 92, 98, 103) a nad hodnotu 50 mg/l bol stanovený v 7 pivách (vzorky 3, 4, 33, 63, 65, 66, 68). Najvyššia hodnota po uplynutí DMT bola $61,7 \pm 3,8$ mg/l u vzorky 63. Celkovo došlo u 23 pív (vzorky 2, 5, 6, 7, 12, 15, 17, 18, 28, 32, 33, 36, 41, 49, 50, 55, 56, 60, 61, 76, 78, 88, 103) k nárastu množstva CAD po uplynutí DMT. Najvyšší až 26-násobný nárast bol u vzorky 76. Z týchto vzoriek bolo 5 (vzorky 2, 12, 15, 36, 88), u ktorých sa zvýšilo množstvo po uplynutí DMT z pôvodne nedetekovateľného množstva. Najvyššia takáto zmena bola zistená u vzorky 2 (z ND na $21,7 \pm 0,0$ mg/l). U väčšiny pív (33 kusov) došlo po uplynutí doby použiteľnosti k poklesu CAD (tabuľka 6). U 21 pív došlo k miernemu až dvojnásobnému zníženiu, najvyšší pokles (33-násobný) sa zistil u vzorky 101. Celkom 11 vzoriek na konci skladovania nebolo detekovaných, aj keď pôvodne (po zakúpení) sa v nich CAD nachádzal, najväčší sa

zistil u vzorky 9 (z $40,6 \pm 4,7$ mg/l do ND). Celkovo vo všetkých pivách tejto skupiny sa po zakúpení nachádzalo v $1263,1$ mg/l CAD a po uplynutí DMT $1044,4$ mg/l.

Tabuľka 7 Obsah vybraných biogénnych amínov (HIM, TRM, SPD, SPM) v ležiakoch.

Číslo vzorky	Histamín*		Tyramín*		Spermidín*		Spermín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
2	ND	17,5±3,1	ND	20,4±2,0	ND	ND	ND	4,3±0,3
3	27,8±2,1	37,1±2,4	53,3±3,8	59,8±3,0	ND	ND	1,1±0,4	ND
4	36,6±3,0	44,6±6,1	58,4±0,8	71,3±7,3	ND	ND	ND	1,0±0,2
5	22,8±2,0	ND	36,3±8,5	69,0±5,6	ND	ND	3,4±0,6	3,3±0,1
6	ND	3,9±0,4	1,6±0,2	1,0±0,1	ND	ND	7,6±1,0	4,4±0,1
7	ND	ND	2,3±1,0	6,1±0,2	ND	ND	9,8±5,1	4,2±0,1
8	ND	ND	5,6±2,7	ND	ND	ND	11,8±1,8	ND
9	ND	ND	1,8±0,0	ND	ND	ND	7,7±0,6	ND
10	ND	ND	2,4±0,2	4,8±0,8	ND	ND	8,7±1,0	12,8±0,6
11	ND	ND	4,9±3,6	60,4±0,7	ND	ND	7,3±4,4	ND
12	ND	ND	2,5±0,7	4,4±0,3	ND	ND	8,9±1,3	6,7±2,4
15	ND	ND	5,7±2,8	4,3±1,8	ND	ND	11,3±0,4	7,4±0,7
17	ND	ND	4,8±1,2	4,9±0,6	ND	ND	12,0±1,8	8,3±0,3
18	ND	ND	1,3±0,3	2,2±0,3	ND	ND	6,4±0,5	7,4±0,5
20	ND	ND	8,4±0,5	57,5±4,7	ND	ND	10,7±1,5	8,8±0,2
21	ND	ND	4,3±3,4	ND	ND	ND	1,8±0,0	ND
25	ND	ND	8,7±0,8	12±2,0	ND	9,3±0,5	3,7±0,6	ND
28	ND	1,4±0,1	2,9±0,5	1,7±0,0	ND	ND	9,3±0,6	ND
29	ND	1,0±0,2	3,5±0,6	ND	ND	ND	12,7±1,7	ND
32	ND	ND	12,3±8,2	13,8±1,4	ND	ND	4,9±3,0	6,8±1,1
33	ND	2,5±0,1	6,6±3,6	18,5±1,6	ND	ND	ND	5,9±0,8
36	ND	1,5±1,6	0,8±0,1	5,3±2,7	ND	ND	1,7±0,2	6,4±0,5
41	ND	8,1±10,8	50,8±2,4	53,6±4,2	ND	ND	ND	ND
44	ND	ND	10,9±0,4	34,9±3,3	ND	ND	ND	4,4±0,2
46	3,8±0,8	ND	36,2±1,2	58,4±1,2	ND	ND	ND	ND
48	ND	ND	2,7±0,9	5,4±0,8	ND	ND	3,8±0,2	10,4±1,4
49	ND	ND	3,3±1,1	3,8±0,1	ND	ND	2,8±0,1	7,4±1,5
50	ND	ND	2,0±0,5	6,1±1,5	ND	ND	2,6±0,8	8,7±0,4
51	6,1±1,4	11,1±1,2	23,0±2,8	23,5±1,8	ND	ND	1,3±0,5	2,7±0,1
52	ND	ND	1,5±0,2	4,1±2,3	ND	ND	2,0±0,6	7,2±0,7
53	ND	ND	1,9±0,5	3,8±2,3	ND	ND	2,0±0,7	7,3±0,4
55	ND	ND	10,4±0,7	12,1±0,2	ND	ND	1,2±0,2	4,3±0,2
56	ND	5,7±6,7	9,0±0,2	11,2±1,3	ND	1,0±0,1	1,6±0,5	9,0±0,4
57	ND	ND	2,9±1,4	3,8±0,9	ND	ND	3,1±0,7	9,7±0,8
59	ND	1,2±0,1	2,6±0,7	6,4±3,1	ND	ND	4,9±1,2	9,0±0,3
60	ND	ND	36,3±2,4	28,8±0,6	ND	ND	ND	1,3±0,1

Číslo vzorky	Histamín*		Tyramín*		Spermidín*		Spermín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
61	ND	ND	35,7±0,3	24,4±1,1	ND	ND	1,5±0,7	1,4±0,6
63	ND	36,2±5,5	44,4±4,2	50,3±6,5	ND	ND	ND	ND
65	ND	29,3±1,1	43,2±2,2	ND	ND	ND	ND	ND
66	ND	ND	30,7±11,1	ND	ND	ND	ND	ND
67	ND	ND	39,0±5,2	55,7±4,1	ND	ND	ND	ND
68	ND	ND	42,9±3,0	ND	ND	ND	ND	ND
69	ND	ND	4,5±2,7	ND	ND	ND	1,8±0,8	2,6±0,7
74	ND	ND	5,4±0,0	1,3±0,1	ND	ND	11,1±0,9	3,7±0,2
75	ND	ND	6,2±3,3	2,7±0,2	ND	ND	5,9±0,8	6,2±0,5
76	ND	23,9±8,5	6,7±0,1	113,6±100,0	ND	ND	5,1±0,4	62,9±7,1
78	ND	ND	6,2±1,5	3,4±0,3	ND	ND	9,0±0,9	9,2±0,4
80	ND	ND	41,9±0,0	42,8±1,6	ND	ND	2,3±0,6	3,5±0,3
81	ND	ND	4,1±1,0	15,4±2,1	1,1±0,6	ND	6,0±1,1	10±0,4
83	ND	ND	5,0±0,8	12,0±0,5	ND	ND	4,7±1,1	4,0±0,1
84	ND	ND	2,5±0,8	7,8±2,4	ND	ND	4,9±0,4	3,2±0,2
88	ND	ND	1,7±0,3	11,6±1,0	ND	ND	5,5±0,7	3,4±0,1
90	15,3±15,1	ND	16,6±13,8	5,0±1,6	ND	ND	8,3±3,3	8,7±0,9
92	27,4±1,1	ND	17,4±1,0	13,9±0,4	ND	ND	6,2±0,5	5,5±0,2
98	ND	ND	7,3±1,2	69,9±4,1	ND	ND	6,1±0,7	3,5±0,1
100	10,8±5,1	ND	8,4±5,8	7,4±2,9	ND	ND	8,1±6,6	9,4±0,8
101	ND	1,5±0,0	59,0±0,7	7,1±1,9	ND	ND	ND	8,4±0,7
103	12,4±0,2	ND	28,5±1,5	45,5±3,6	ND	ND	ND	ND
105	ND	ND	3,9±1,1	14,9±1,3	ND	ND	6,7±0,0	7,6±0,5
106	ND	ND	5,8±0,4	17,2±1,2	1,7±0	ND	ND	7,3±0,3
108	ND	ND	ND	3,3±0,5	6,9±0,2	ND	7,4±0,3	ND
110	ND	ND	72,5±2,3	84,1±2,1	ND	ND	ND	ND
111	ND	ND	24,2±3,6	46,9±3,4	ND	ND	4,9±0,2	3,7±0,1
112	ND	ND	ND	47,8±0,9	ND	ND	8,9±0,1	4,7±0,1
114	ND	ND	ND	9,9±1,2	ND	ND	12,6±1,0	11,3±0,0
Σ BA (mg/l)	162,9	226,5	984,9	1387,5	9,7	10,3	293,3	349,3

*Množstvo biogénneho amínu vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

ND – nedetekovaný biogénny amín.

Histamín (HIM) bol detekovaný v 22 vzorkách ležiackych pív. Na počiatku experimentu bol HIM prítomný v 9 pivách (vzorky 3, 4, 5, 46, 51, 90, 92, 10, 103) a jeho rozmedzie bolo 3,8 – 36,6 mg/l. Pod hodnotou 10 mg/l sa nachádzal v 2 pivách (vzorky 46 a 51), v rozsahu 10 – 50 mg vo zvyšných 7 pivách. Najvyššie množstvo HIM pri zakúpení vzorky bolo prítomné v pive číslo 4 a malo hodnotu $36,6 \pm 3,0$ mg/l. Po prekročení DMT bol histamín prítomný v 16 pivách, v rozsahu 1,0 – 44,6 mg/l. V množstve nižšom ako 10 mg/l sa

HIM nachádzal u 9 pív (vzorky 6, 28, 29, 33, 36, 41, 56, 59, 101), v množstve 10 – 50 mg/l v 7 pivách (vzorky 2, 3, 4, 51, 63, 65, 76), pričom najvyššia zistená hodnota bola $44,6 \pm 6,1$ mg/l u vzorky pod číslom 4. U 16 (vzorky 2, 3, 4, 6, 28, 29, 33, 36, 41, 51, 56, 59, 63, 65, 76, 101) z 22 pív došlo po uplynutí DMT k zvýšeniu obsahu histamínu, naopak u 6 pív (vzorky 5, 46, 90, 92, 100, 103) nebol histamín na konci skladovania detekovaný, aj keď po zakúpení vzoriek identifikovaný bol. Na začiatku experimentu bolo množstvo HIM vo všetkých vzorkách rovné 162,9 mg/l a na jeho konci 226,5 mg/l.

Prítomnosť tyramínu (TYM) bola preukázaná v každej z 65 (tabuľka 7) vzoriek ležiackych pív. Po zakúpení pív sa TYM nenachádzal iba v 5 pivách (vzorky 2, 36, 108, 112, 114). Rozsah TYM v tomto období bol 1,3 – 72,5 mg/l. Menej ako 10 mg/l TYM obsahovalo 37 pív (tabuľka 7), 18 pív (vzorky 5, 32, 44, 46, 51, 55, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 80, 90, 92, 103, 111) malo obsah tyramínu v rozsahu 10 – 50 mg/l, nad hodnotu 50 mg/l bol TYM prítomný iba v 5 pivách (vzorky 3, 4, 41, 101, 110). Najvyššiu hodnotu TYM na počiatku experimentu obsahovalo pivo 110 ($72,5 \pm 2,3$ mg/l). Po DMT bol tyramín v 57 vzorkách (tabuľka 7), z toho v množstve pod 10 mg/l v 25 pivách (vzorky 6, 7, 10, 12, 15, 17, 18, 28, 36, 48, 49, 50, 52, 53, 57, 59, 74, 75, 78, 84, 90, 100, 101, 108, 114), v rozmedzí 10 – 50 mg/l v 20 pivách (vzorky 2, 25, 32, 33, 44, 51, 55, 56, 60, 61, 80, 81, 83, 88, 92, 103, 105, 106, 111, 112) a nad 50 mg/l v 12 pivách (vzorky 3, 4, 5, 11, 20, 41, 46, 63, 67, 76, 98, 110). Iba jedno pivo (vzorka 76) obsahovalo TYM nad 100 mg/l a konkrétna hodnota bola $113,6 \pm 7,0$ mg/l. U 45 vzoriek došlo po DMT v zvýšení obsahu TYM. U väčšiny pív (16 vzoriek) došlo iba k miernemu rastu obsahu tyramínu (vzorky 3, 4, 17, 18, 25, 32, 41, 49, 51, 55, 56, 57, 63, 67, 80, 110) avšak u niektorých vzoriek bol rast výraznejší, napríklad u vzorky 98 došlo takmer k 10-násobnému rastu, u vzorky 11 k 12-násobnému rastu a vzorka 76 dosiahla takmer 17-násobné zvýšenie hodnoty. K poklesu obsahu TYM na konci experimentu došlo u 20 pív a u väčšiny bol tento pokles menej výrazný. Najvýraznejšie zmeny boli zaznamenané u pív 65, 66 a 68, u týchto vzoriek boli po zakúpení nameňované hodnoty v uvedenom poradí $43,2 \pm 2,2$; $30,7 \pm 11,1$ a $42,9 \pm 3,0$, no po DMT tento TYM nebol detekovaný. Celkové množstvo TYM vo všetkých vzorkách ležiackych pív po ich zakúpení bolo 984,9 mg/l a po DMT 1387,5 mg/l.

Polyamíny spermidín a spermín boli takisto prítomné vo vzorkách pív. Zatiaľ čo spermidín sa nachádzal iba u 5 pív (vzorky 25, 56, 81, 106, 108), spermín bol prítomný v 56 pivách (tabuľka 7). Spermín sa vôbec nenachádzal iba u 9 pív (vzorky 41, 46, 63, 65, 66, 67, 68, 103, 110). Na počiatku experimentu bol spermín prítomný v 49 vzorkách. Obsah spermínu pod 10 mg/l obsahovala väčšina pív (42 vzoriek), vyššie hodnoty obsahovalo zvyšných 7 pív (vzorky 8, 15, 17, 20, 29, 74, 114), pričom najvyššia bola hodnota $12,7 \pm 1,7$ mg/l (vzorka 29). Na konci experimentu sa zistila prítomnosť spermínu u 47 pív (tabuľka 7). U veľkej väčšiny (42 pív) boli hodnoty spermínu po DMT pod limit 10 mg/l. Iba 4 pivá (vzorky 10, 48, 81, 114) mali hodnotu medzi 10 – 50 mg/l a len jedno pivo (vzorka 76) obsahovalo viac spermínu ako 50 mg/l ($62,9 \pm 7,1$). Vyššie množstvo spermínu na konci experimentu oproti množstvu pri jeho zakúpení bolo zistených u 30 vzoriek pív. K najvyššiemu zvýšeniu (12-násobné) spermínu došlo u vzorky 76. Až 26 vzoriek pív obsahovalo na konci experimentu nižšie množstvo spermínu ako na jeho začiatku. Vo väčšine pív došlo k minimálnemu zníženiu, v prípade vzoriek 3, 8, 9, 11, 21, 25, 29 a 108 nebol spermín po DMT vôbec detekovaný, i keď po zakúpení zistený bol. K najvyššej zmene došlo u vzorky 29 kedy z pôvodných 12,9 mg/l došlo k zníženiu až na nedetekovateľné množstvo.

Pri každej analýze bola zaznamenávaná zmena pH hodnoty (tabuľka 8). Z 65 vzoriek bolo u 44 zaznamenané zníženie pH na konci skladovania, naopak u 21 vzoriek došlo k zníženiu pH. Na začiatku experimentu sa pH pohybovalo v rozmedzí 4,0 – 5,6, po DMT bolo rozmedzie pH u ležiakov 3,8 – 5,1. Pokles pH po DMT sa prejavoval výraznejšie ako zvýšenie hodnôt pH na konci tejto doby. Pokles pH bol zaznamenaný u 8 pív (vzorky 33, 74, 78, 92, 103, 105, 106, 111) s rozdielom pH hodnôt do jednej desatiny, u 19 vzoriek pív (vzorky 6, 7, 9, 10, 12, 29, 36, 41, 48, 49, 50, 60, 61, 65, 66, 68, 69, 81, 110) sa rozdiel pH hodnôt pohyboval v rozmedzí medzi 0,1 – 0,2. Zvýšenie pH vyššie ako dve desatiny bol nameraný u 17 pív (vzorky 28, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 63, 67, 75, 76, 80, 90, 100, 101, 114). K najväčšiemu zníženiu pH počas skladovania došlo u vzorky číslo 55, u ktorej bolo zaznamenané zníženie z pH 5,56 na pH 4,49. Naopak k zvýšeniu pH došlo len u 21 vzoriek z tejto skupiny pív. K zvýšeniu pH hodnoty do jednej desatiny sa zistilo u 13 pív (vzorky 4, 5, 11, 15, 17, 18, 20, 25, 32, 44, 98, 108, 112), u 7 pív (vzorky 2, 3, 8, 21, 46, 84, 88) zvýšenie pH bolo v rozmedzí 0,1 – 0,2. Len u jedenej vzorky bola zistená zvýšená hodnota pH

väčšia ako 0,2 a to u vzorky číslo 83, kedy došlo k zvýšeniu z pôvodnej hodnoty pH 4,07 na 4,97.

Tabuľka 8 Zmeny pH na počiatku skladovania a na jeho konci u ležiakových pív.

Číslo vzorky	pH		Číslo vzorky	pH		Číslo vzorky	pH	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
2	4,48	4,68	41	4,78	4,60	75	4,64	4,31
3	4,57	4,72	44	4,63	4,70	76	4,48	3,80
4	5,09	5,14	46	4,55	4,66	78	4,48	4,40
5	4,76	4,81	48	4,34	4,21	80	4,43	4,07
6	4,64	4,52	49	4,62	4,45	81	4,44	4,27
7	4,82	4,71	50	4,66	4,49	83	4,07	4,97
8	4,74	4,86	51	4,87	4,60	84	4,43	4,56
9	4,58	4,44	52	4,85	4,28	88	4,71	4,84
10	4,68	4,55	53	4,86	4,34	90	4,43	4,01
11	4,44	4,50	55	5,56	4,49	92	4,96	4,88
12	4,58	4,43	56	4,51	4,27	98	4,65	4,70
15	4,41	4,42	57	4,60	4,38	100	4,45	3,98
17	4,00	4,09	59	4,67	4,46	101	4,64	4,18
18	4,34	4,34	60	4,99	4,81	103	4,9	4,84
20	4,10	4,17	61	5,00	4,90	105	4,99	4,92
21	4,00	4,15	63	4,82	4,60	106	5,01	4,92
25	4,57	4,57	65	4,91	4,80	108	5,00	5,02
28	5,10	4,39	66	4,79	4,59	110	4,70	4,59
29	4,91	4,73	67	4,90	4,50	111	5,12	5,05
32	4,94	4,94	68	4,72	4,55	112	4,62	4,69
33	4,99	4,96	69	4,30	4,15	114	5,42	5,01
36	4,29	4,17	74	4,70	4,63			

6.2 Obsah biogénnych amínov v špeciálnych pívach

V diplomovej práci bolo stanovovaných 38 špeciálnych pív, toto množstvo tvorilo 25 kusov svetlých pív, 6 kusov pív tmavých a 7 polotmavých. Vo všetkých vzorkách bola zistiteľná prítomnosť biogénnych amínov (BA). Celkový obsah BA sa pohyboval v rozmedzí od 3,1 až 141,4 mg/l. Celkový obsah BA na začiatku a na konci skladovania je uvedený v tabuľke 9.

Tabuľka 9 Celkový obsah biogénnych amínov (mg/l) v špeciálnych pivách.

Číslo vzorky	Σ biogénne amíny		Číslo vzorky	Σ biogénne amíny		Číslo vzorky	Σ biogénne amíny	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
1	102,1	140,2	38	63,9	99,4	79	75,6	61,7
13	17,9	63,1	39	95,0	97,5	87	12,4	54,0
14	15,7	33,9	40	63,3	74,2	89	61,6	80,9
19	39,5	50,8	42	74,9	110,8	93	21,8	68,5
22	17,6	74,1	43	34,9	56,4	94	70,3	45,9
23	14,4	24,6	45	142,8	43,6	95	36,9	27,9
24	48,1	60,3	54	92,7	126,3	96	22,8	64,8
26	52,7	71,5	58	81,0	103,7	97	20,1	16,6
27	21,1	52,8	64	64,4	77,8	99	55,7	126,0
30	62,4	80,0	70	6,5	6,8	109	16,4	31,1
31	18,4	24,1	71	73,4	77,5	113	13,0	46,0
34	1,4	18,5	72	40,5	45,9	115	23,1	141,4
35	2,8	16,3	73	23,8	36,0			

Po zakúpení pív bolo rozmedzie celkového obsahu biogénnych amínov od 1,4 – 142,8 mg/l. Celkový obsah biogénnych amínov nižší než 10 mg/l bol zistený u 3 pív (vzorky 34, 35, 70), väčšina pív (19 kusov) patrila do rozmedzia 10 – 50 mg/l (vzorky 13, 14, 19, 22, 23, 24, 27, 31, 43, 72, 73, 87, 93, 95, 96, 97, 109, 113, 115). Nad 50 mg/l bolo 14 pív (vzorky 26, 30, 38, 39, 40, 42, 54, 58, 64, 71, 79, 89, 94, 99). Vyšší celkový obsah BA než 100 mg/l bolo zaznamenaných u zvyšných 2 pív (vzorky 1 a 45), pričom celkový najvyšší obsah BA po zakúpení pív bol 142,8 mg/l (vzorka 45).

Na konci skladovania bol zistený celkový obsah biogénnych amínov v rozsahu od 6,8 po 141,4 mg/l. Iba jedno pivo (vzorka 70) malo celkový obsah BA menší ako 10 mg/l. Celkovo 13 pív (vzorky 14, 23, 31, 34, 35, 45, 72, 73, 94, 95, 97, 109, 113) patrilo do rozmedzia 10 – 50 mg/l. Celkom 18 pív (vzorky 13, 19, 22, 24, 26, 27, 30, 38, 39, 40, 43, 64, 71, 79, 87, 89, 93, 96) patrilo po uplynutí DMT do rozsahu od 50,1 po 100 mg/l. Celkový obsah BA nad 100 mg/l dosiahlo 6 špeciálnych pív (vzorky 1, 42, 54, 58, 99, 115). Najväčšie množstvo biogénnych amínov po uplynutí DMT mala vzorka 115.

U 5 pív (vzorky 45, 79, 94, 95, 97) bol zistený nižší obsah BA na konci ich skladovania. U piva pod číslom 45 bol zaznamenaný až 3-násobný pokles celkového množstva BA. U ostatných pív z tejto skupiny došlo na konci skladovania k jeho zvýšeniu. U vzorky 115 došlo k 6-násobnému a u vzorky 34 dokonca k 13-násobnému zvýšeniu BA, oproti obsahu

po ich zakúpení. U ostatných vzoriek došlo prevažne k miernemu zvýšeniu celkového množstva.

Množstvo biogénnych amínov v jednotlivých vzorkách pív je uvedené v tabuľke 10 (pre tryptamín, fenyletylamín, putrescín a kadaverín) a v tabuľke 11 (pre histamín, tyramín, spermidín a spermin).

Tabuľka 10 Obsah vybraných biogénnych amínov (TRM, PEA, PUT, CAD) v špeciálnych pivách.

Číslo vzorky	Tryptamín*		Fenyletylamín*		Putrescín*		Kadaverín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
1	1,1±0,0	ND	5,2±0,4	1,4±0,7	ND	ND	39,0±3,2	33,0±1,8
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,7±0,5	ND
14	ND	ND	ND	2,2±1,6	ND	1,9±0,4	1,0±0,2	1,8±0,1
19	ND	ND	ND	ND	1,0±0,2	1,6±0,3	10,9±1,6	17,0±2,2
22	ND	4,3±0,4	ND	2,1±0,7	1,1±0,1	1,2±0,3	1,1±0,2	2,7±0,3
23	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	1,2±0,0	1,6±0,3	ND
24	ND	ND	ND	ND	ND	1,1±0,1	21,5±0,9	28,6±1,3
26	ND	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	25,8±0,0	38,3±0,5
27	ND	ND	ND	ND	1,0±0,4	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND	1,4±0,2	2,0±0,2	17,7±2,0	27,7±0,8
31	ND	ND	ND	ND	1,0±0,4	ND	1,7±0,8	1,0±0,1
34	ND	ND	ND	ND	ND	1,0±0,0	ND	1,2±0,5
35	ND	ND	ND	ND	ND	2,1±0,2	2,8±0,4	2,0±0,5
38	ND	ND	ND	ND	ND	1,8±0,1	45,1±5,0	64,3±7,3
39	ND	ND	1,2±0,4	ND	ND	1,3±0,1	43,7±2,3	43,0±1,1
40	ND	ND	1,6±0,5	1,7±0,4	ND	2,9±0,4	7,7±0,4	8,7±0,0
42	ND	ND	1,8±0,4	ND	ND	6,6±3,3	28,3±1,0	36,1±19,6
43	ND	ND	ND	ND	ND	14,7±1,8	34,9±4,7	15,7±1,1
45	ND	ND	2,9±0,5	3,1±3,8	1,6±0,3	4,9±4,3	62,6±1,8	21,3±24,6
54	ND	ND	ND	ND	1,2±0,2	2,1±0,1	44,9±3,2	70,3±3,3
58	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	8,1±0,3	2,9±0,4	11,3±0,1
64	ND	ND	2,3±0,5	1,6±0,5	1,6±0,4	ND	16,5±1,7	8,5±0,7
70	ND	ND	ND	ND	2,1±0,0	1,7±0,3	1,4±0,2	2,5±0,4
71	ND	ND	1,4±0,6	ND	2,7±0,1	2,3±0,3	ND	3,5±3,6
72	ND	ND	ND	ND	1,6±0,1	1,8±0,0	1,5±0,4	1,6±0,4
73	ND	ND	2,5±2,2	ND	1,3±0,2	1,2±0,1	4,5±0,0	3,9±0,5
79	ND	ND	ND	ND	1,9±0,1	1,6±0,2	58,0±3,0	47,4±1,9
87	ND	ND	ND	ND	1,3±0,1	24,6±0,7	ND	ND
89	ND	ND	ND	ND	1,1±0,1	1,2±0,3	35,2±0,6	41,9±6,1
93	ND	ND	ND	ND	1,9±0,2	10,8±1,0	1,8±0,4	ND
94	ND	ND	ND	ND	1,8±0,1	1,7±0,4	23,2±2,9	17,4±0,7

Číslo vzorky	Tryptamín*		Fenyletylamín*		Putrescín*		Kadaverín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
95	ND	ND	ND	ND	2,6±1,0	11,0±0,9	5,5±0,1	4,4±0,2
96	ND	ND	ND	ND	2,0±0,1	8,6±0,1	3,7±1,1	2,3±0,1
97	ND	ND	ND	ND	1,6±0,1	1,6±0,0	1,1±0,1	1,4±0,1
99	ND	ND	ND	ND	1,5±0,2	89,8±4,5	33,0±5,3	14,5±1,9
109	ND	ND	ND	ND	ND	15,8±2,4	ND	ND
113	ND	ND	ND	ND	11,3±0,2	15±1,0	ND	ND
115	ND	ND	ND	ND	7,3±0,5	119,1±3,0	3,2±0,1	ND
Σ BA (mg/l)	1,1	4,3	18,8	12,1	53,7	363,3	584,6	573,6

*Množstvo biogénneho amínu vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

ND – nedetekovaný biogénny amín.

Tryptamín bol detekovaný iba u 2 pív (vzorky 1 a 22). V prípade vzorky 1 bol prítomný iba po jej zakúpení ($1,1 \pm 0,0$ mg/l), po uplynutí DMT už detekovaný nebol. U vzorky 22 sa tryptamín nachádzal až na konci skladovania ($4,3 \pm 0,4$ mg/l).

Fenyletylamín bol zistený iba v 10 pivách (vzorky 1, 14, 22, 39, 40, 42, 45, 64, 71, 73). Po zakúpení bol detekovaný v 8 pivách (vzorky 1, 39, 40, 42, 45, 64, 71, 73) a iba jedno (vzorka 1) prešlo hodnotu 5 mg/l. Na konci skladovania sa nachádzal v 6 pivách (vzorky 1, 14, 22, 40, 45, 64) a jeho maximálna hodnota bola $3,1 \pm 3,8$ mg/l (vzorka 45). V prípade 2 pív (vzorky 1, 64,) došlo na konci DMT k zníženiu obsahu fenyletylamínu, oproti množstvu po zakúpení a u vzoriek 39, 42, 71, 73 už nebol detekovaný. Celkové množstvo fenyletylamínu vo všetkých vzorkách špeciálnych pív po zakúpení bolo 18,8 mg/l, po uplynutí DMT 12,1 mg/l.

Okrem 2 pív (vzorky 1 a 13) bol putrescín prítomný v každom z nich. Po zakúpení pív bol detekovaný v 25 pivách (vzorky 19, 22, 23, 27, 30, 31, 45, 54, 58, 64, 70, 71, 72, 73, 79, 87, 89, 93, 94, 95, 96, 97, 99, 113, 115). Všetky piva okrem jedného (vzorka 113) obsahovali putrescín do 10 mg/l. Vzorka číslo 113 obsahovala $11,3 \pm 0,2$ mg/l. Na konci experimentu putrescín obsahovalo 33 pív, 25 z nich nedosahovali 10 mg/l, v rozsahu 10 – 50 mg/l sa nachádzalo 6 pív (vzorky 43, 87, 93, 95, 109, 113). Pivo pod číslom 99 ho obsahovalo $89,9 \pm 4,5$ mg/l a pod číslom 115 až $119,1 \pm 3,0$ mg/l. Na konci experimentu došlo k zníženiu množstva putrescínu v 8 pivách (vzorky 27, 31, 64, 70, 71, 73, 79, 94), vo všetkých sa jednalo o zníženie mierne. Okrem piva pod číslo 97, kde sa hodnota putrescínu nezmenila vo zvyšných pivách došlo k nárastu tohto BA. Najvyššie zmeny boli zazname-

nané u pív 115 (16-násobné zvýšenie), 87 (19-násobné) a u piva 99 (60-násobné). Súčet putrescínu vo všetkých špeciálnych pivách po ich zakúpení bol 53,7 mg/l, toto množstvo sa po uplynutí DMT zvýšilo viac ako šesťkrát (363,3 mg/l).

Kadaverín sa vôbec nenachádzal iba v 4 pivách (vzorky 27, 87, 109, 113). Na začátku experimentu jeho prítomnosť chýbala v 5 pivách (vzorky 27, 34, 87, 109, 113), v 17 pivách (vzorky 13, 14, 22, 23, 31, 35, 40, 58, 70, 71, 72, 73, 93, 95, 96, 97, 115) sa v tomto období nachádzal do 10 mg/l, do rozmedzia 10 – 20 mg/l patrilo 14 pív (vzorky 1, 19, 24, 26, 30, 38, 39, 42, 43, 54, 64, 89, 94, 99), nad spomínané rozmedzie sa dostali len dve piva (vzorky 45 a 79). Najvyššia nameraná hodnota kadaverínu po zakúpení bola $62,6 \pm 1,8$ mg/l (vzorka 45). Po DMT bol kadaverín detekovaný v 30 pivách. V tomto čase sa 14 pív (vzorky 14, 22, 31, 34, 35, 40, 64, 70, 71, 72, 73, 95, 96, 97) nachádzalo pod 10 mg/l, medzi 10 – 50 mg/l bolo 14 pív (vzorky 1, 19, 24, 26, 30, 39, 42, 43, 45, 58, 79, 89, 94, 99) a nad 50 mg/l boli zistené 2 piva (vzorky 38 a 54). Najvyššia nameraná hodnota bola $70,3 \pm 3,3$ mg/l (vzorka 54). Z hľadiska zmeny obsahu kadaverínu na začiatku a na konci experimentu, u 17 pív (vzorky 1, 13, 23, 31, 35, 39, 43, 45, 64, 73, 79, 93, 94, 95, 96, 99, 115) došlo k poklesu obsahu tohoto BA. Tento pokles môžeme označiť u väčšiny vzoriek za mierny až dvojnásobný u vzorky číslo 45 došlo až k trojnásobnému poklesu kadaverínu na konci skladovania. U druhej polovice vzoriek z tejto skupiny sa obsah putrescínu na konci skladovania zvyšoval, podobne ako v prechádzajúcom prípade bolo zvýšenie mierne až dvojnásobné, u vzorky číslo 44 takmer štvornásobné. Na začátku experimentu bolo v tejto skupine pív celkové množstvo kadaverínu 584,6 mg/l, na jeho konci tento súčet mierne klesol na hodnotu 573,6 mg/l.

Tabuľka 11 Obsah vybraných biogénnych amínov (HIM, TYM, SPD, SPM) v špeciálnych pivách.

Číslo vzorky	Histamín*		Tyramín*		Spermidín*		Spermín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
1	7,6±2,6	15,3±0,7	49,3±4,2	89,3±2,8	ND	ND	ND	1,1±0,8
13	ND	49,2±2,4	3,7±0,6	12,2±0,9	ND	1,7±0,0	12,5±3,0	ND
14	ND	8,2±9,5	3,4±0,4	11,7±11,3	ND	ND	11,3±1,2	8,0±1,5
19	1,4±0,2	3,6±1,0	15,3±2,7	19,4±3,4	ND	ND	10,8±4,2	9,2±1,0
22	0,1±0,0	ND	5,0±0,8	63,8±6,3	ND	ND	10,2±0,0	ND
23	ND	ND	ND	7,4±1,0	ND	ND	11,8±1,2	16,0±2,0
24	ND	ND	24,5±0,7	26,8±1,6	ND	3,9±0,0	2,1±0,1	ND

Číslo vzorky	Histamín*		Tyramín*		Spermidín*		Spermín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
26	ND	ND	25,1±2,7	27,7±3,7	ND	4,5±2,3	1,8±0,4	ND
27	ND	ND	7,3±0,3	14,1±1,4	ND	38,7±1,0	12,8±0,9	ND
30	ND	ND	40,7±8,1	48,3±0,4	ND	ND	2,7±0,6	2,0±0,0
31	ND	ND	3,8±2,2	7,1±0,2	ND	ND	11,9±1,0	16,0±1,6
34	ND	1,3±1,2	1,4±1,1	5,5±0,7	ND	ND	ND	9,4±0,3
35	ND	ND	ND	4,5±0,2	ND	ND	ND	7,8±2,6
38	7,4±2,7	10,2±0,3	6,9±0,4	11,4±2,2	ND	1,0±0,1	4,4±1,9	10,6±1,7
39	ND	ND	50,1±4,8	53,2±4,8	ND	ND	ND	ND
40	ND	ND	54±1,7	60,9±6,9	ND	ND	ND	ND
42	ND	20,7±12,5	44,9±7	47,3±3,1	ND	ND	ND	ND
43	ND	ND	ND	21,7±1,6	ND	ND	ND	4,3±0,1
45	ND	8,1±11,6	74,6±6,4	4,2±3,3	ND	ND	1,1±0,0	2,2±0,8
54	ND	4,4±0,4	45,4±1,6	47,8±1,3	ND	ND	1,3±0,3	1,6±0,0
58	ND	ND	73,7±0,8	80,0±6,7	ND	ND	3,4±0,3	4,3±0,1
64	ND	28,8±2,9	44,1±4,9	38,9±2,5	ND	ND	ND	ND
70	ND	ND	2,0±1,0	ND	ND	ND	1,0±0,3	2,6±0,9
71	30,2±1,1	29,5±1,9	38,2±4,5	40,9±2,2	ND	ND	ND	1,3±0,3
72	25,7±0,7	24,3±0,4	9,4±0,3	13,0±0,3	ND	ND	2,3±0,9	5,1±0,2
73	3,1±3,9	ND	3,8±0,0	29,7±0,6	ND	ND	8,6±1,7	1,2±0,1
79	2,8±0,4	3,0±0,7	6,8±0,4	7,5±1,7	ND	ND	6,2±0,5	2,3±1,3
87	ND	ND	2,8±0,2	21,7±1,1	ND	ND	8,3±0,7	7,7±0,3
89	ND	1,4±0,4	22,9±2,5	33,3±6,6	ND	3,2±1,0	2,5±0,4	ND
93	ND	ND	5,1±0,6	46,3±1,9	ND	ND	12,9±2,4	11,4±0,1
94	ND	ND	12,5±1,8	12,0±5,3	32,7±0,2	ND	ND	14,7±1,1
95	12,7±0,2	ND	11,8±1,6	7,1±0,3	ND	ND	4,3±0,8	5,4±0,2
96	1,5±1,0	ND	6,1±2,0	44,3±0,7	ND	ND	9,6±3,5	9,6±0,2
97	ND	ND	7,0±2,9	5,5±0,0	ND	ND	10,4±4,1	8,1±0,8
99	ND	ND	6,9±0,3	10,6±0,9	ND	ND	14,3±1,6	11,0±0,1
109	ND	ND	2,1±0,2	ND	ND	ND	14,3±1,0	15,2±2,1
113	ND	ND	1,7±0,1	30,9±2,6	ND	ND	ND	ND
115	ND	ND	8,2±1,8	17,5±2,0	ND	ND	4,4±0,2	4,8±0,1
Σ BA (mg/l)	92,5	208,1	720,4	1023,5	32,7	52,9	197,0	193,1

*Množstvo biogénneho amínu vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

ND – nedetekovaný biogénny amín.

Z 38 vzoriek špeciálnych pív bol histamín prítomný v 17 vzorkách. Po zakúpení sa tento biogénny amín nachádzal v 9 pivách (vzorky 1, 19, 38, 71, 72, 73, 79, 95, 96), z toho 6 pív (vzorky 1, 19, 38, 73, 79, 96) ho obsahovalo menej ako 10 mg/l, zvyšné 3 pivách neprekročili 50 mg/l a najviac histamínu sa nachádzalo vo vzorke 71 ($30,2 \pm 1,1$ mg/l). Na

konci skladovania sa histamín nachádzal v 14 pivách. Celkovo 7 pív (vzorky 14, 19, 34, 45, 54, 79, 89) obsahovalo menej ako 10 mg/l putrescínu. Ani jedno zo zvyšných pív (vzorky 1, 13, 38, 42, 64, 71, 72) neobsahovalo viac putrescínu ako 50 mg/l, iba pivo pod číslom 13 sa k tejto hodnote priblížilo $49,2 \pm 2,4$ mg/l. Spolu v 12 pivách došlo k zvýšeniu množstva histamínu po DMT, najväčšia zmena bola sledovaná u vzoriek 13, 42 a 64, kedy z pôvodne nedetekovateľného množstva došlo k nárastu na hodnoty $49,2 \pm 2,4$; $20,7 \pm 12,5$; $28,8 \pm 2,9$ mg/l v uvedenom poradí. Pokles histamínu na konci skladovania bol zistený u 5 pív (vzorky 71, 72, 73, 95, 96), z ktorých najväčší bol u piva 95 z pôvodne name-
ranej hodnoty $12,7 \pm 0,2$ mg/l došlo k poklesu až na ND. Na začiatku experimentu bol súčet množstva histamínu všetkých vzoriek 92,5 mg/l, na jeho konci došlo k zdvojnásobeniu tejto hodnoty (208,1 mg/l).

Tyramín sa vyskytoval vo všetkých vzorkách špeciálnych pív. Po zakúpení sa nachádzal v 35 vzorkách, najviac pív (vzorky 13, 14, 22, 27, 31, 34, 38, 70, 72, 73, 79, 87, 93, 96, 97, 99, 109, 113, 115) sa nachádzalo v skupine pod 10 mg/l. Dvanásť pív (vzorky 1, 19, 24, 26, 30, 42, 54, 64, 71, 89, 94, 95) patrilo do rozsahu 10 – 50 mg/l. Celkom 5 pív (39, 40, 45, 58) obsahovali viac ako 50 mg/l histamínu. Najvyššia namerná hodnota histamínu pred uplynutím DMT bola $74,6 \pm 6,4$ mg/l (vzorka 45). Po uplynutí DMT sa histamín nenachádzal iba v 2 pivách (vzorky 70, 109). Konkrétne v 8 pivách (vzorky 23, 31, 34, 35, 45, 79, 95, 97) bol detekovaný v menšom množstve ako 10 mg/l. Najviac pív (vzorky 13, 14, 19, 24, 26, 27, 30, 38, 42, 43, 54, 64, 71, 72, 73, 87, 89, 93, 94, 96, 99, 113, 115) bolo súčasťou rozsahu 10 – 50 mg/l. Nad 50 mg/l obsahovalo tyramín zostavajúcich 5 pív (vzorky 1, 22, 39, 40, 58), no ani jedno neprekročilo 100 mg/l. Najvyššie množstvo tyramínu po uplynutí DMT obsahovalo pivo číslo 1 ($89,3 \pm 2,8$ mg/l). U 31 pív sa zvýšilo množstvo tyramínu na konci skladovacieho pokusu. K najväčšiemu nárastu prišlo u vzoriek 113 (18-násobný rast), 22 (12-násobný), 93 (9-násobný) a ďalej u 73, 87, 96 (7-násobný). Na druhej strane k poklesu tyramínu došlo u 7 pív (vzorky 45, 64, 70, 94, 95, 97, 109) u všetkých okrem vzorky 45 bol zaznamenaný pokles nízky. Až 17-násobný pokles množstva tyramínu po DMT sa zistil u vzorky 45. Táto vzorka obsahovala po zakúpení $74,6 \pm 6,4$ mg/l tyramínu a po uplynutí použiteľnosti len $4,2 \pm 3,3$ mg/l. Súčet množstva tyramínu vo všetkých pivách bol na začiatku 720,4 mg/l a na konci experimentu 1023,5 mg/l.

Spermidín sa nachádzal iba v 7 vzorkách špeciálnych pív, pričom na začiatku experimentu ho obsahovala iba jedno pivo (vzorka 94) a to v množstve $32,7 \pm 0,2$ mg/l. Na konci expe-

rimentu bol detekovaný v 6 pivách (vzorky 13, 24, 26, 27, 38, 89). Vo všetkých pivách bol spermidín prítomný v množstve do 5 mg/l a 1 pivo (vzorka 28) obsahovalo $38,7 \pm 1,0$ mg/l. Najvyšší nárast množstva spermidínu bol u vzorky 1 (z ND na $38,7 \pm 1,0$ mg/l) a pokles u vzorky 94 (z $32,7 \pm 0,2$ mg/l na ND). Celkový obsah spermidínu v 38 špeciálnych pivách bol 32,7 mg/l na začiatku a 52,9 mg/l na konci.

Spermín sa vôbec nenachádzal v 6 pivách. Po zakúpení pív bol detekovaný u 27 pív. V množstve 1 – 10 mg/l bol spermín zistený u 17 pív (vzorky 24, 26, 30, 38, 45, 54, 58, 70, 72, 73, 79, 87, 89, 95, 96, 115), zvyšných 11 pív (vzorky 13, 14, 19, 22, 23, 27, 31, 93, 97, 99, 109) sa pohybovalo v rozmedzí 10 – 15 mg/l. Najvyššie zistené množstvo bolo $14,3 \pm 1,0$ mg/l u piva číslo 109. Po uplynutí DMT sa spermín nachádzal u 20 pív (vzorky 1, 14, 19, 30, 34, 3, 43, 45, 54, 58, 70, 71, 72, 73, 79, 87, 95, 96, 97, 115) v množstve do 10 mg/l a u 7 pív (vzorky 23, 31, 38, 93, 94, 99, 109) od 10 – 20 mg/l. Najvyššie nameraná hodnota spermínu v tomto období bola 16 mg/l u pív 23 a 31. Na konci experimentu u 15 pív (vzorky 13, 14, 19, 22, 24, 26, 27, 30, 73, 79, 87, 89, 93, 97, 99) došlo poklesu množstva spermínu. Najvyšší pokles (sedemnásobný) bol u vzorky 73 a u ostatných vzoriek bol pokles malý. U druhej časti vzoriek došlo naopak k nárastu spermínu na konci skladovania, pričom najvyšší bol u piva 94, kde sa obsah spermínu zvýšil z ND na $14,7 \pm 1,1$ mg/l. U piva pod číslom 96 bola nameraná rovnaká hodnota spermínu na začiatku, ako aj na konci experimentu. Celkové množstvo spermínu po zakúpení pív bolo 197 mg/l a po uplynutí DMT 193 mg/l.

Každé stanovenie bolo sprevádzané zmeraním hodny pH (tabuľka 12), ktorým sa preukázalo že pH hodnoty na začiatku experimentu sa pohybovali v rozmedzí hodnôt 3,79 – 5,39 a po DMT tento rozsah bol 3,68 – 5,40. U 12 pív tejto skupiny došlo po uplynutí DMT k nárastu pH. Nárast pH hodnoty do jednej desatiny po DMT bol zistený u 4 vzoriek (vzorky 1, 14, 43, 109), nárast pH hodnoty v rozmedzí 0,1 – 0,2 bol zaznamenaný u 2 vzoriek (vzorky 30, 87) a vyšší nárast než už vyššie spomínaný, čiže nad 0,2 bol zistený u 6 vzoriek (vzorky 22, 34, 93, 95, 96, 99). Najvyšší nárast pH hodnoty po prekročení DMT sa vyskytol u 3 vzoriek (vzorky 22, 93, 99) a to o hodnotu 0,44. U 26 vzoriek špeciálnych pív došlo k poklesu pH hodnoty na konci experimentu. Pokles pH hodnoty do jednej desatiny sa vyskytol u 6 vzoriek (vzorky 31, 58, 72, 79, 113, 115), pokles pH v rozmedzí 0,1 – 0,2 oproti počiatočnej hodnote bol zaznamenaný u 10 špeciálnych pív (vzorky 13, 19, 23, 24, 26, 38, 39, 64, 71, 73) a pokles pH hodnoty vyšší než 0,2, bol nameraný u 10 vzoriek (vzorky 27,

35, 40, 42, 45, 54, 70, 89, 94, 97). Najvyšší rozdiel pH hodnoty v porovnaní s počiatkovou hodnotou pH namarenou ihneď po zakúpení piva bol zistený u vzorky 42 a mal hodnotu 0,90, išlo o pokles pH hodnoty z 4,80 na 3,9.

Tabuľka 12 Hodnoty pH na počiatku skladovania a na jeho konci u špeciálnych pív.

Číslo vzorky	pH		Číslo vzorky	pH		Číslo vzorky	pH	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
1	4,68	4,77	38	4,67	4,57	79	4,87	4,79
13	5,15	5,01	39	4,81	4,69	87	4,50	4,61
14	4,41	4,48	40	4,59	4,08	89	4,71	4,33
19	4,25	4,12	42	4,80	3,90	93	4,50	4,94
22	4,00	4,44	43	4,70	4,78	94	4,57	4,11
23	4,71	4,59	45	5,39	5,16	95	4,45	4,88
24	4,76	4,60	54	5,15	4,60	96	4,47	4,90
26	4,81	4,67	58	4,83	4,78	97	4,53	4,07
27	4,94	4,73	64	4,98	4,81	99	4,96	5,40
30	4,46	4,62	70	4,30	4,01	109	4,94	4,98
31	4,48	4,40	71	3,79	3,68	113	5,11	5,05
34	3,88	4,09	72	4,39	4,36	115	5,01	4,93
35	4,86	4,41	73	4,66	4,49			

6.3 Obsah biogénnych amínov vo výčapných pivách

V tejto skupine pív bolo sledovaných 12 vzoriek pív, 11 z nich boli piva svetlé a 1 tmavé. V každom z analyzovaných pív bola zistená prítomnosť biogénneho amínu. Ako sa pohyboval celkový obsah biogénnych amínov po zakúpení pív a po uplynutí DMT je uvedené v tabuľke 13.

Tabuľka 13 Celkový obsah biogénnych amínov (mg/l) vo výčapných pivách.

Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov		Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov		Číslo vzorky	Σ Biogénnych amínov	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
16	12,2	27,5	77	15,6	17	91	15	7,8
37	4,7	22,5	82	12,7	14,5	102	43	111,8
47	7,2	16	85	8,7	17	104	12,5	37,5
62	11,6	25,4	86	13,5	83,6	107	82,4	66,7

Celkové množstvo biogénnych amínov kolísalo od 4,7 až po 111,8 mg/l. Po zakúpení pív sa celkový obsah pohyboval medzi 4,7 až 82,4 mg/l. Celkové množstvo pod 10 mg/l bola zistené u 3 pív (vzorky 37, 47, 85), u 8 pív (vzorky 16, 62, 77, 82, 86, 91, 102, 104) bolo na začiatku experimentu detekované množstvo v rozmedzí 10 – 50 mg/l a len jedno pivo (vzorka 107) malo celkové množstvo vyššie ako 50 mg/l.

Po uplynutí DMT sa celkové množstvo biogénnych amínov pohybovalo 7,8 – 111,8 mg/l. Na konci skladovania malo iba jedno pivo (vzorka 91) celkovú hodnotu nižšiu než 10 mg/l, celkové množstvo väčšiny výčapných pív (vzorky 16, 37, 47, 62, 77, 82, 85, 104) sa pohybovalo v rozsahu 10 – 50 mg/l, ale 3 pivá (vzorky 86, 102, 107) túto hodnotu presiahli, z čoho jedno pivo (vzorka 102) malo celkové množstvo vyššie než 100 mg/l. Na konci skladovacieho pokusu došlo u 10 pív k celkovému nárastu obsahu biogénnych amínov, naopak u 2 pív sa tento obsah znížil (vzorky 91 a 107). U niektorých pív sa celkové množstvo zvýšilo len mierne (vzorky 77, 82), u 4 pív sa obsah takmer zdvojnásobilo (vzorky 16, 47, 62, 85), u 2 pív (vzorky 102, 104) takmer ztrojnásobilo, ale bol zaznamenaný aj päťnásobný (vzorka 37) a šesťnásobný (vzorka 86) nárast celkového obsahu oproti jeho množstvu po zakúpení.

Obsah jednotlivých biogénnych amínov vo výčapných pivách je zobrazený v tabuľke 14. Vo výčapných pivách nebola zistená vôbec žiadna prítomnosť 2 biogénnych amínov, tryptamínu a spermidínu. Zastúpenie a množstvo jednotlivých biogénnych amínov vo výčapných pivách je uvedené v tabuľke 14. Fenytylamín a putrescín boli ďalšie amíny, ktoré sa vyskytovali vo výčapných pivách iba vo veľmi malom množstve. Fenytylamín bol zaznamenaný iba po uplynutí DMT v 1 pive pod číslom 102 ($4,6 \pm 0,2$ mg/l). Histamín sa vyskytoval v dvoch vzorkách. V pive 16 bolo po uplynutí DMT v množstve $4,0 \pm 3,3$ mg/l a v pive číslo 82, iba pri zakúpení piva ($1,1 \pm 1,2$ mg/l), na konci skladovania už detekovaných nebol.

Putrescín bol prítomný vo všetkých vzorkách. Na začiatku pokusu bol detekovaný v 8 vzorkách, pričom 6 pív (vzorky 62, 77, 82, 85, 86, 91) nepresiahli hodnotu 1,5 mg/l. Zvyšným dvom pivám (vzorky 104, 107) boli namerané hodnoty do 10 mg/l. Na konci skladovania nebol putrescín detekovaný iba v pive pod číslom 91. Okrem jedného piva (vzorka 104) došlo k nárastu obsahu putrescínu na konci experimentu. Najvyššie zvýšenie bolo pozorované pri vzorke 102, kde došlo k zvýšeniu z ND na $70,2 \pm 2,4$ mg/l.

Okrem vzoriek 85 a 104 bol kadaverín prítomný vo všetkých pivách. Na počiatku sa, ale vôbec nenachádzal v 4 pivách (vzorky 16, 85, 86, 104). V tejto dobe malo 6 pív (vzorky 16, 37, 47, 77, 62, 91, 82) množstvo putrescínu menšie ako 10 mg/l. Zvyšné dve piva (vzorky 102, 107) mali hodnotu vyššiu. V prípade vzorky 102 bola hodnota kadaverínu $10,3 \pm 0,1$ mg/l a u vzorky 107 bolo $27,5 \pm 0,7$ mg/l. Na konci experimentu bol kadaverín detekovaný v 6 pivách (vzorky 16, 37, 47, 77, 82, 86) a iba jedno pivo (vzorka 86) presiahlo hodnotu 10 mg/l ($21,0 \pm 0,9$ mg/l). K zvýšeniu kadaverínu na konci skladovania došlo iba u 3 pív (vzorky 16, 37, 86), kde najvýraznejšie bolo v prípade piva 86 (z ND na $21,0 \pm 0,9$ mg/l). U zvyšných 7 pív došlo k zníženiu obsahu kadaverínu po uplynutí DMT. Najvýraznejší pokles v obsahu bol zistený u vzoriek 102 (z $10,3 \pm 0,1$ mg/l na ND) a 107 ($27,5 \pm 0,7$ mg/l na ND). V ostatných pivách bolo zníženie miernejšie.

Tabuľka 14 Obsah biogénnych aminov (mg/l) vo výčapných pivách.

Číslo vzorky	Fenyletylamín*		Putrescín*		Kadaverín*		Histamín*		Tyramín*		Spermín*	
	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec	Počiatok	Koniec
16	ND	ND	ND	2,8±1,9	ND	8,5±10,0	ND	4,0±3,3	2,5±0,3	5,5±2,9	8,2±0,1	5,7±0,6
37	ND	ND	ND	3,6±1,0	1,6±0,1	8,2±6,1	ND	ND	1,2±0,2	6,1±4,0	1,7±0,1	4,6±0,5
47	ND	ND	ND	1,7±0,2	1,6±0,3	1,1±0,5	ND	ND	2,3±0,5	4,9±2,2	2,7±0,8	8,4±4,6
62	ND	ND	1,0±0,1	7,2±0,7	2,1±0,6	ND	ND	ND	3,1±0,5	13,8±0,3	5,4±1,1	4,4±0,2
77	ND	ND	1,5±0,1	1,8±0,1	2,1±0,6	1,4±0,0	ND	ND	5,1±1,7	4,5±1,0	6,8±0,5	9,3±0,8
82	ND	ND	1,5±0,1	1,5±0,1	2,5±0,5	1,4±0,4	1,1±1,2	ND	2,6±0,1	3,9±0,5	4,8±0,2	7,7±0,2
85	ND	ND	1,2±0,0	5,7±0,4	ND	ND	ND	ND	1,7±0,3	7,8±0,4	5,8±0,7	3,5±0,0
86	ND	ND	1,2±0,2	13,0±0,1	ND	21,0±0,9	ND	ND	3,0±0,7	44,8±0,8	9,3±2,7	4,8±0,0
91	ND	ND	1,4±0,3	ND	2,2±0,2	ND	ND	ND	3,1±0,7	2,3±0,3	8,3±0,5	5,6±0,1
102	ND	4,6±0,2	ND	70,2±2,4	10,3±0,1	ND	ND	ND	28,9±0,6	37,0±1,5	3,8±0,1	ND
104	ND	ND	9,9±0,3	5,3±0,4	ND	ND	ND	ND	2,6±0,2	23,6±1,8	ND	8,6±0,2
107	ND	ND	6,9±0,8	11,6±0,7	27,5±0,7	ND	ND	ND	45,1±1,5	51,5±3,6	2,8±0,0	3,6±0,1
ΣBA (mg/l)	ND	4,6	24,6	124,2	49,9	41,6	1,1	4,0	101,2	205,7	59,7	66,2

*Množstvo biogénneho amínu vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

ND – nedetekovaný biogénny amín.

Tyramín sa nachádzal vo všetkých vzorkách pred DMT aj po ňom. Po zakúpení bol jeho obsah v 10 pivách (vzorky 16, 37, 47, 62, 77, 82, 85, 86, 91, 104) menší než 10 mg/l. Zvyšné dve vzorky 102 ($28,9 \pm 0,6$ mg/l) a 107 ($45,1 \pm 1,5$ mg/l) sa nachádzali v rozmedzí 10 – 50 mg/l. Na konci skladovania bolo pív s obsahom po 10 mg/l sedem (vzorky 16, 37, 47, 77, 82, 85, 91), 4 piva (vzorky) v rozmedzí 10 – 50 mg/l. Posledné pivo (vzorka 107) hranicu 50 mg/l iba testne prekročilo ($51,5 \pm 3,6$ mg/l). Okrem dvoch pív (vzorky 91 a 77) došlo na konci skladovania k nárastu množstva tyramínu. K najvyššiemu zvýšeniu tyramínu na konci skladovania došlo u piva pod číslom 86, v tomto prípade sa pôvodné množstvo zväčšilo 15-krát (z $3,0 \pm 0,7$ na $44,8 \pm 0,8$ mg/l).

Polyamín spermín sa narozdiel od spermidínu nachádzal vo všetkých vzorkách výčapných pív. Ani jedna zo vzoriek neprekročila hodnotu 10 mg/l po ich zakúpení, ale ani na konci skladovania. Na začiatku experimentu sa spermín nenechádzal vo vzorke 104 a jeho najvyššie namerané množstvo v tomto období bolo $9,3 \pm 2,7$ mg/l (vzorka 86). Po uplynutí DMT bola najvyššia hodnota spermínu podobne ako pred jej uplynutím $9,3 \pm 0,8$ (vzorka 77). Spermín v tejto dobe nebol detekovaný u vzorky 102. Z pohľadu zmien v obsahu spermínu pri zakúpení a po uplynutí DMT došlo k miernemu zvýšeniu hodnôt u vzoriek 77 a 107, takmer k dvojnásobnému nárastu došlo u vzorky 82 a skoro k trojnásobnému u 37 a 47. U vzorky 104 sa zvýšila hodnota z ND na $8,6 \pm 0,2$ mg/l. U zvyšnej polovice vzoriek došlo k zníženiu množstva spermínu na konci skladovania, ktoré možno označiť za mierne, maximálne dvojnásobné (16, 62, 85, 86, 91), v prípade vzorky 102 došlo k poklesu z $3,8 \pm 0,1$ na ND.

Hodnota pH sa po zakúpení pív pohybovala v rozmedzí 4,22 – 6,37 a po DMT sa tento rozsah pH hodnôt zmenil na 3,87 – 6,02 (tabuľka 15). Zo všetkých vzoriek výčapných pív došlo k nárastu pH hodnoty po DMT len u 3 vzoriek (16, 85, 86). U vzoriek 85 a 86 došlo k zhodnému nárastu pH o hodnotu 0,12, pričom bol tento nárast zároveň najvyšší. V prípade vzorky 85 došlo z pôvodnej hodnoty pH 4,51 k nárastu na pH 4,63 a u vzorky 86 bola pôvodná hodnota pH 4,68 a narástla na 4,80. U vzorky číslo 16 došlo k zvýšeniu pH z 4,22 na 4,27. U zvyšných 9 vzoriek pív došlo k zníženiu pH po uplynutí DMT. Pokles pH do jednej desatiny bol u 2 vzoriek (vzorky 62, 102), zníženie hodnôt pH v rozmedzí 0,1 – 0,2 sa vyskytol u 2 pív (vzorky 47 a 104) a napokon pokles vyšší než 0,2 bol u 5 vzoriek pív (vzorky 37, 77, 82, 91, 107). Najvyšší pokles bol nameraný u vzorky 91, kedy z pôvodnej hodnoty pH 4,35 došlo k jeho zníženiu na 3,87.

Tabuľka 15 Zmeny pH na počiatku skladovania a na konci u výčapných pív.

Číslo vzorky	pH		Číslo vzorky	pH		Číslo vzorky	pH	
	Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec		Počiatok	Koniec
16	4,22	4,27	77	4,45	4	91	4,35	3,87
37	4,53	4,16	82	4,5	4,28	102	5,17	5,12
47	4,42	4,26	85	4,51	4,63	104	5,06	4,87
62	4,51	4,48	86	4,68	4,8	107	6,37	6,02

6.4 Diskusia

V súčasnosti legislatíva neuvádza maximálne množstvo biogénnych amínov v alkoholických nápojoch a obmedzuje sa len na produkty rybolovu. Nariadenie EP a Rady (ES) o mikrobiologických kritériách stanovuje maximálny limit pre histamín v rybách na 200 mg/kg. Aj keď je obsah biogénnych amínov v pivách oveľa menší než v porovnaní so sýrmi, údenými výrobkami a rybacími výrobkami, tento obsah stojí za pozornosť najmä z dôvodu prítomnosti alkoholu, ktorý v tele človeka spôsobuje inhibíciu detoxikačných enzýmov pre biogénne amíny, ktoré sa takto hromadia v tele (Buňka *et al.*, 2012). Okrem toho skupina ľudí užívajúcich psychofarmaká má celkovo v tele oslabený detoxikačný systém, čím teda dochádza k narušeniu procesu štiepenia biogénnych amínov. Za takýchto okolností by nahromadenie biogénnych amínov mohlo spôsobiť zdravotné problémy, pretože alkohol negatívne účinky biogénnych amínov ešte zosilňuje. Vyššie množstvo biogénnych amínov môže spôsobovať poruchy centrálného nervového systému, bolesti hlavy, nadmerné búchanie srdca, poruchy krvného obehu, zvracanie a hnačky (Anli *et al.*, 2006; Buňková *et al.*, 2012).

Na vznik biogénnych amínov v pivách má vplyv výber počiatočných surovín (najmä kvalita a odroda sladu), ale hlavne hygiena celkového výrobného procesu. Produkciu biogénnych amínov počas technologického spracovania zapríčiňujú kyslomliečne baktérie (najmä rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*), ktoré tu vystupujú ako kontaminujúca mikroflóra a ktoré sú odolné voči nepriaznivému prostrediu piva. Najväčšie množstvo biogénnych amínov vzniká pri hlavnom kvasení (Kalač *et al.*, 2002). Táto diplomová práca sa sústredila na piva pochádzajúce z mikropivovarov, ktorých počet sa v súčasnosti zvyšuje. Väčšina z nich používa tradičné metódy výroby piva, ku ktorému patrí aj hlavné kvasenie mladiny v otvorených kadiach v spilkách. Tieto pivovary väčšinou pracujú v provizórnych podmienkach a existovalo tu podozrenie zo zvýšeného obsahu biogénnych amínov v takýchto pivách .

V diplomovej práci sa analyzovalo 115 rôznych alkoholických pív pochádzajúcich z 35 českých mikropivovarov. Z hľadiska typu piva bolo analyzovaných 65 ležiakov (57 % zo všetkých vzoriek), 38 špeciálnych pív (33 %) a 12 výčapných pív (10 %). Z hľadiska typu sladu bolo testovaných 89 svetlých, 13 polotmavých, 12 tmavých a 1 rezané pivo. Obsah alkoholu sa vo vzorkách pohyboval od 4 do 8 %. Vzorky boli zakúpené v špecializovaných

obchodoch alebo priamo v mikropivovaroch. Od každého piva boli zakúpené dva kusy rovnakej šarže, pričom sa jeden kus stanovoval bezprostredne po zakúpení a druhý kus až po uplynutí DMT, dotedy boli piva skladované v sklade pri teplote 8 °C.

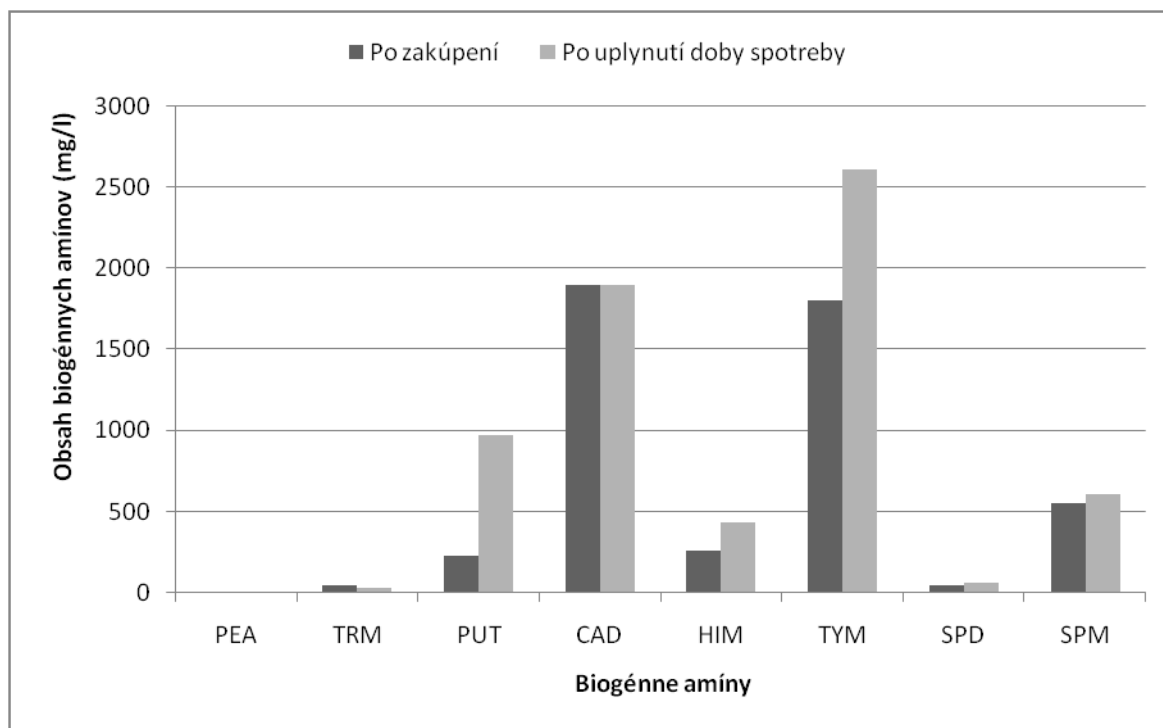
Pri porovnávaní typu sladu a celkového množstva BA sa došlo k nasledovným záverom. Bolo sledovaných 89 svetlých pív, po DMT sa celkový rozsah biogénnych amínov pohyboval od 1,0 po 175,5 mg/l (priemerná hodnota $52,0 \pm 39,4$ mg/l). U 12 vzoriek tmavých pív bol rozsah 20,1 – 259,5 mg/l (priemerná hodnota $86,7 \pm 64,0$ mg/l). Z polotmavých pív bolo analyzovaných 13 kusov a celkový rozsah biogénnych amínov bol 12,4 – 140,2 mg/l (priemerná hodnota $49,4 \pm 37,9$ mg). Jediný kus rezaného piva po DMT mal koncentráciu biogénnych amínov 76,6 mg/l.

Obsah alkoholu v stanovovaných vzorkách bol od 4 do 8 %. Porovnanie obsahu alkoholu a celkového množstva BA po uplynutí DMT je nasledovné. Spolu 61 vzoriek s obsahom alkoholu $\leq 5\%$ malo celkový rozsah biogénnych amínov ND – 154,1 mg/l (priemerná hodnota $44,6 \pm 34,1$ mg/l). Rozsah biogénnych amínov s obsahom alkoholu 5 – 6 % (40 vzoriek) bol ND – 259,5 mg/l (priemerná hodnota $68,5 \pm 52,2$ mg/l). Rozsah biogénnych amínov 6,8 – 126,0 mg/l ($64,8 \pm 31,8$ mg/l) bol u vzoriek s obsahom alkoholu 6,1 – 7 % (12 vzoriek). Štyri vzorky mali obsah alkoholu 7,1 – 8 % a rozmedzie biogénnych amínov 16,3 – 140,2 mg/l (priemerná hodnota $76,0 \pm 48,7$ mg/l). Z výsledkov vyplýva, že so zvyšujúcim sa obsahom alkoholu došlo aj k zvyšovaniu celkového obsahu BA. Romero *et al.* (2003) dospeli vo svojej práci k rovnakému výsledku. So zvyšujúcim sa obsahom alkoholu sa zvyšuje doba trvania kvasenia a procesu zrenia, otvára sa tak väčší priestor pre rozvoj mikroflóry s dekarboxylačnou aktivitou.

Z hľadiska tepelného ošetrenia bolo stanovovaných 77 vzoriek pasterizovaných pív a 38 vzoriek nepasterizovaných. Celkový obsah biogénnych amínov v pasterizovaných pivách po uplynutí DMT bol 0,0 – 259,5 mg/l (priemerná hodnota $57,3 \pm 47,3$ mg/l) a u nepasterizovaných pív 0,0 – 154,1 mg/l (priemerná hodnota $52,1 \pm 36,0$ mg/l). Paradoxné je, že pasterizované piva obsahovali väčšie množstvo BA ako nepasterizované, výsledok sa očakával opačný. Je teda možné predpokladať, že tepelné ošetrenie u pasterizovaných pív bolo nedostatočné, alebo po ňom prišlo k nehygienickej manipulácii s výrobkom. Sledované vzorky pív pochádzajú z mikropivovarov, kde väčšinou dochádza k tradičnej výrobe, ktorá zahŕňa kvasenie v otvorených nádobách v spilkách. Pri tomto spôsobe výroby môže dôjsť

k rozsiahlejšej mikrobiálnej kontaminácii. Kontaminujúcu mikroflóru väčšinou tvoria kyslomliečne baktérie, u ktorých boli sledované kmene s dekarboxylázovou aktivitou a ktoré môžu byť odolnejšie voči vyšším teplotám. Na druhej strane nižší obsah BA u nepasterizovaných pív je možné dosiahnuť použitím iných konzervačných zákrokov ako tepelných, napr. filtráciou alebo pridaním konzervačných látok. Tieto údaje sa však na etiketách nenachádzali.

Celkový obsah jednotlivých biogénnych amínov pred a po uplynutí DMT je zobrazený v grafe 1. Z hľadiska výskytu jednotlivých biogénnych amínov vo vzorkách bolo zostavené nasledovné poradie: tyramín (100 % vzoriek), putrescín (89 %), kadaverín (88 %), spermín (87 %), histamín (36 %), tryptamín (20%), spermidín (10 %), fenyletylamín (3 %). So zreteľom na celkový obsah biogénnych amínov pred DMT je rad nasledovný: kadaverín > tyramín > spermín > spermín > histamín > putrescín > spermidín > tryptamín > fenyletylamín. Po uplynutí doby spotreby poradie vyzeralo takto: tyramín > kadaverín > putrescín > spermín > histamín > spermidín > tryptamín > fenyletylamín.



Obrázok 1 Porovnanie obsahu biogénnych amín pred uplynutím DMT a po ňom.

Celkový obsah BA do 100 mg/l sa všeobecne v potravinách označuje za bezpečný. Túto hranicu však niekoľko vzoriek prekročilo. Celkovo 12 vzoriek (10 % vzoriek) pív obsahovalo viac biogénnych amínov ako 100 mg/l už po ich zakúpení. Päť vzoriek týchto pív po

chádzali z rovnakého pivovaru (pivovar Z), všetkých 5 vzoriek bolo pasterizovaných. Najvyššie zistené množstvo BA po zakúpení vzoriek mala vzorka 4 (167,8 mg/l, svetlý pasterizovaný nefiltrovaný ležiak), ktorá takisto pochádza z pivovaru Z. Tento fakt poukazuje na zlé hygienické podmienky pivovaru. Po uplynutí DMT malo 14 pív (12 % vzoriek) koncentráciu biogénnych amínov vyššiu ako 100 mg/l. Najvyššie celkové množstvo BA obsahovala vzorka 76 (259,5 mg/l), ide o tmavý pasterizovaný ležiak s obsahom alkoholu 5,2 %. Buňka *et al.* (2012) zistili koncentráciu biogénnych amínov nad 100 mg/l u 25 % vzoriek pív po uplynutí ich DMT. Vzhľadom na prítomnosť alkoholu a jeho negatívne pôsobenie na detoxikačný systém ľudského organizmu, by tieto vzorky mohli spôsobovať zdravotné ťažkosti.

Tryptamín (TYM) bol celkovo detekovaný u 22 vzoriek pív (20 % vzoriek). Po zakúpení pív sa nachádzal v 16 vzorkách v rozsahu 1,1 – 6,3 mg/l (priemerná hodnota $2,5 \pm 1,4$ mg/l) a po uplynutí DMT bol detekovaný v 13 vzorkách (rozsah 1,0 – 4,6 mg/l, priemerná hodnota $2,2 \pm 1,0$ mg/l). Väčšina autorov detekovala TYM v koncentrácii do 10 mg/l, ale existujú práce kde bol zistený vyšší obsah TYM. Ako napríklad Camacho *et al.* (2007) identifikovali TYM vo venezuelských pivách v rozsahu 16,4 – 28,6 mg/l a Buňka *et al.* (2012) v českých pivách v rozsahu 2,7 – 26,4 mg/l.

Fenyletylamín (PEA) bol zistený v 4 vzorkách (3 % vzoriek). Po zakúpení bol prítomný v 2 pivách (vzorky 1 a 4) a po uplynutí DMT v 3 pivách (vzorky 4, 22, 63). Vo všetkých vzorkách bol prítomný v koncentrácii do 5 mg/l. Celkový rozsah PEA bol 1,1 – 4,3 mg/l. Okrem vzorky číslo 1 boli všetky ostatné piva nefiltrované. Najvyššia koncentrácia tohto BA bola po uplynutí DMT u vzorky 22 ($4,3 \pm 0,4$ mg/l), jedná sa o svetlý nepasterizovaný, nefiltrovaný špeciál s obsahom alkoholu 5,8 %. Podobne nízku frekvenciu a koncentráciu uvádzajú aj ďalší autori (Anli *et al.*, 2006; Slomkowska a Ambroziak, 2002; Almeida *et al.*, 2012; Izquierdo-Pulido *et al.*, 1996; Loret *et al.*, 2005).

Putrescín (PUT) a kadaverín (CAD) sa označujú ako BA, ktoré nemajú veľký toxický účinok, ale dokážu zvyšovať toxické účinky iných BA, najmä histamínu a tyramínu. PUT sa celkovo nachádzal u 89 % vzoriek a CAD u 88 % vzoriek. Anli *et al.* (2006) vo svojej práci zaznamenali, že na konci skladovania došlo k poklesu PUT a naopak k nárastu CAD, podobne zmeny zistili aj Kalač *et al.* (2002). V tejto práci bol tento efekt skôr opačný.

U PUT došlo celkovo u 74 vzoriek k zvýšeniu a u 24 vzoriek k zníženiu v prípade CAD sa zvýšil obsah 42 vzoriek a znížil u 58 vzoriek.

Putrescín (PUT) bol celkovo detekovaný u 102 vzoriek pív (89 % vzoriek). Na začiatku experimentu (po zakúpení) sa nachádzal v 66 vzorkách pív (rozsah 1,0 – 18,2 mg/l, priemerná hodnota $3,4 \pm 4,1$ mg/l) a na konci experimentu v 95 vzorkách (rozsah 1,0 – 119,1 mg/l, priemerná hodnota $10,2 \pm 18,5$ mg/l). Po uplynutí DMT väčšina vzoriek (67 pív) neprekročila koncentráciu 10 mg/l, v množstve 10 – 50 mg/l sa PUT nachádzal v 24 vzorkách pív. Koncentrácia vyššia ako 50 mg/l bola zistená u 4 vzoriek pív. Jedna vzorka piva (vzorka 115) prekročila koncentráciu 100 mg/l ($119,1 \pm 3,0$ mg/l). Jedná sa o tmavé pasterizované špeciálne pivo s obsahom alkoholu 5,7 %. Väčšina autorov uvádza rozsah PUT od nedetekovaného množstva (ND) po 20 mg/l (Tang *et al.*, 2009; Gloria a Izquierdo-Pulido, 1999; Camacho *et al.*, 2007; Loukou a Zotou, 2003; Lozanov *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2012). Naopak Buňka *et al.* (2012) zistili koncentráciu PUT vyššiu oproti ostatným autorom. V ich práci koncentrácia PUT v českých pivách kolísala od ND až do 100 mg/l. PUT sa radí do skupiny amínov pochádzajúcich zo surovín, preto jeho rozdiely v koncentráciách možno pripísať k rozdielnym vstupným surovinám, ale aj rozdielnym podmienkam pri sladovaní (Kalač *et al.*, 2002).

Kadaverín (CAD) bol detekovaný v 101 vzorkách pív (88 % vzoriek). Po ich zakúpení bol prítomný v 92 pivách v rozsahu 1,0 – 91,5 mg/l (priemerná hodnota $20,6 \pm 22,0$ mg/l). Z týchto vzoriek obsahovalo 43 pív menej CAD ako 10 mg/l, 39 pív sa nachádzalo v rozsahu 10 – 50 mg/l a 10 vzoriek pív malo koncentráciu CAD vyššiu ako 50 mg/l. Ani jedna z týchto vzoriek neobsahovala viac CAD ako 100 mg/l, pričom najviacej sa k tejto hodnote približovala vzorka 101 (svetlý pasterizovaný ležiak s obsahom alkoholu 4,4 %). Po uplynutí DMT sa CAD nachádzal v 81 vzorkách v rozsahu 1,0 – 70,3 mg/l (priemerná hodnota $20,5 \pm 19,7$ mg/l). V 35 pivách bol obsah CAD menší ako 10 mg/l, v 37 pivách medzi 10 – 50 mg/l a v 9 pivách nad 50 mg/l. Najvyššiu koncentráciu CAD mala vzorka 54 ($70,3 \pm 3,3$ mg/l), ide o svetlé špeciálne pasterizované nefiltrované pivo s obsahom alkoholu 6 %. Vo väčšine prác sa rozsah CAD pohyboval od ND do 20 mg/l (Pradena *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2012; Slomkowska a Ambroziak, 2002; Fernandes *et al.*, 2001; Cortace-ro-Ramirez *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2012). Vyššie rozmedzie CAD uvádzajú len Buňka *et al.* (2012) v českých pivách (ND – 100 mg/l), Izquierdo-Pulido *et al.* (1996) v európskych pivách (ND – 39,9 mg/l) a Pradenas *et al.* (2016) v čilských

pivách pochádzajúcich z mikropivovarov (ND – 58,7 mg/l). CAD vzniká hlavne metabolickou činnosťou mikroorganizmov, jedná sa o kontaminujúcu mikroflóru (Kalač *et al.*, 2003). Fakt, že v tejto práci vzniklo vyššie množstvo CAD ako vo väčšine prác, je možné pripísať k nedostatočnej hygiene a sanitácii pri technologickom procese. Tieto vzorky pív pochádzajú z mikropivovarov, ktoré nemajú častokrát k dispozícii potrebné vybavenie a prostredie na úplné zamedzenie nožnej kontaminácie. Po zakúpení pív malo 10 vzoriek vyšší obsah CAD ako 50 mg/l. Z toho bolo 6 vzoriek nepasterizovaných a 8 vzoriek nefiltrovaných. Práve nepožitie pasterizácie, alebo jej nedostatočná aplikácia, môže viesť k zvýšenému obsahu CAD vo vzorkách.

Histamín (HIM) je vazoaktívny amín (vazodilatačný), ktorý sa označuje ako hlavný mediátor zápalov a alergií. Jeho toxický účinok môže byť posilnený požitím alkoholických nápojov, medzi ktoré sa pivo radí. HIM v potravinách vzniká predovšetkým pôsobením mikrobiálnej kontaminácie a jeho hlavnými producentmi sú baktérie rodu *Lactocobacillus* a *Pediococcus* (Diel *et al.*, 2009). HIM bol prítomný celkovo v 41 pivách (36 % vzoriek). Na počiatku experimentu bol detekovaný v 19 vzorkách (rozsah 1,1 – 36,6 mg/l, priemerná hodnota $13,5 \pm 11,1$ mg/l), pričom z toho 9 vzoriek obsahovalo HIM menej ako 10 mg/l a u 10 vzoriek sa HIM pohyboval medzi 10 – 20 mg/l. V tomto období bola najvyššia nameraná hodnota u vzorky 4 (svetlý pasterizovaný nefiltrovaný ležiak s obsahom alkoholu 5,3 %). Po uplynutí DMT bol HIM prítomný u 31 vzoriek (rozsah 1,1 – 49,2 mg/l, priemerná hodnota $14,1 \pm 14,1$ mg/l), väčšina vzoriek (17 kusov) neobsahovala viac HIM ako 10 mg/l, ostatné vzorky obsahovali koncentráciu HIM medzi 10 – 50 mg/l. V tomto období bola najvyššia koncentrácia HIM prítomná vo vzorke 13 (svetlý pasterizovaný špeciál s obsahom alkoholu 6 %). Buňka *et al.* (2012) HIM v českých pivách vôbec nedetkovali, podobne nezistili prítomnosť HIM ani Buiatti *et al.* (1995) ostatní autori uvádzajú väčšinou rozsah medzi ND do 20 mg/l (Tang *et al.*, 2009; Pradena *et al.*, 2016; Anli *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2012; Kalač *et al.*, 2002; Loret *et al.*, 2005). Niektorí autori uvádzajú aj trochu vyššie množstvá HIM v pivách. Camacho *et al.* (2007) uvádzajú koncentráciu HIM vo venezuelských pivách v rozsahu 4,6 – 28,6 mg/l, rozsah 1,3 – 26,5 mg/l zistili Choi *et al.* (2012) v korejských pivách. Loret *et al.* (2005) zistili v spontánne kvasených belgických pivách koncentráciu HIM v rozsahu ND – 40 mg/l. Anli *et al.* (2006) uvádzajú nasledovné toxické limity pre HIM: rozmedzie 8 – 40 mg/l spôsobuje ľahkú otravu, 40 – 100 mg/l strednú otravu a pri koncentrácii HIM nad 100 mg/l môže

dôjsť intenzívnym otravám. V tejto práci bolo ihneď po zakúpení pív identifikovaných 10 pív, ktoré sa nachádzali v rozmedzí 8 – 40 mg/l (ľahká otrava). Najvyššiu hodnotu v tomto období mala vzorka 4 ($36,6 \pm 3,0$ mg/l, nefiltrovaný pasterizovaný ležiak s obsahom alkoholu 5,3 %). Po uplynutí DMT sa 15 vzoriek pív nachádzalo v rozmedzí 8 – 40 mg/l, pričom najviac HIM z tejto skupiny obsahovala vzorka 3 ($37,1 \pm 2,4$ mg/l, pasterizovaný ležiak s obsahom alkoholu 5,1 %). Väčšie množstvo HIM (nad koncentráciu 40 mg/l, stredná otrava) bolo zistené v 2 pivách, pričom najvyššie zistené množstvo bolo $49,2 \pm 12,2$ mg/l (vzorka 13). Z týchto výsledkov vyplýva, že aj nami skúmané piva môžu pre niektorých jedincov spôsobovať nepríjemné zdravotné ťažkosti, pričom tento efekt zosilňuje prítomnosť alkoholu.

Tyramín (TYM) je vazoaktívny amín (vazokonstrikčný), spôsobujúci hypertenziu (Pradenas *et al.*, 2016). TYM bol prítomný vo všetkých 115 vzorkách pív (100 % vzoriek). Po zakúpení sa nachádzal v 107 pivách v koncentrácii od 1,2 po 74,6 mg/l (priemerná hodnota $16,9 \pm 19,3$ mg/l). Celkom 66 vzoriek obsahovalo TYM do 10 mg/l. V rozsahu 10 – 50 mg/l bol prítomný v 32 vzorkách pív a nad 50 mg/l TYM obsahovalo zvyšných 9 pív. Najvyššie množstvo TYM po zakúpení pív obsahovala vzorka 45 (svetlý nepasterizovaný nefiltrovaný špeciál s obsahom alkoholu 7,3 %). Na konci skladovania bol TYM prítomný v 104 vzorkách pív (rozsah 1,3 – 113,6 mg/l, priemerná hodnota $25,2 \pm 24,0$ mg/l). U 39 vzoriek pív bol TYM stanovený v koncentrácii do 10 mg/l a u 47 vzoriek medzi 10 – 50 mg/l, nad túto koncentráciu obsahovalo TYM zvyšných 18 vzoriek. Jedna vzorka (číslo 76, tmavý pasterizovaný ležiak s obsahom alkoholu 5,2 %) prekročila koncentráciu 100 mg/l. Koncentrácie TYM sa pohybujú o niečo vyššie oproti ostatným biogénnym amínom. Zdá, že európske piva obsahujú tento biogénny amín vo vyšších koncentráciách. Izquierdo-Pulido *et al.* (1999) detekovali TYM v európskych pivách v množstve od 0,5 do 67,5 mg/l, Buňka *et al.* (2012) namerali TYM v českých pivách od ND – 100 mg/l, Romero *et al.* (2003) zasa v španielskych pivách v rozsahu 0,3 – 31,7 mg/l a podobne aj Loret *et al.* (2005) našli vyššie koncentrácie TYM v spontánne kvasených belgických pivách. Naproti tomu v čínskych pivách bol TYM nameraný v rozmedzí 2,9 – 7,2 mg/l (Tang *et al.*, 2009), vo venezuelských TYM nebol ani detekovaný (Camacho *et al.*, 2007), v tureckých od ND – 3,5 mg/l (Anli *et al.*, 2006) a v čílskych od ND – 2,1 mg/l (Pradena *et al.*, 2016). TYM je spolu s HIM radení medzi skupinu BA, ktoré vznikajú prostredníctvom metabolizmu kontaminujúcej mikroflóry, ktorej činnosti sa dá predchádzať dodržovaním hygienických

a sanitálních postupov, dostatočnou pasterizáciou, alebo aplikovaním filtrácie (Komprda *et al.*, 2004). Vo vzorke číslo 76 bolo zistené množstvo TYM po uplynutí DMT nad 100 mg/l a v dobe spotreby do 10 mg/l. Napriek tomu, že táto vzorka bola tepelne ošetrená, prítomnosť kontaminujúcej mikroflóry nemusí byť vylúčená. Ako je uvedené v teoretickej časti tejto práce niektoré kyslomliečne baktérie, zodpovedné za produkciu biogénnych amínov, sú termorezistentné a tak dokážu tento tepelný zákrok prežiť (Matoulková a Kubizniaková, 2015). Európska komisia pre bezpečnosť potravín (EFSA) uvádza doporučené bezpečné limity pre obsah TYM v potravinách: 600 mg/l pre zdravých jedincov; 50 mg/l pre tých, ktorí užívajú liečivá inhibujúce monoaminoxidázu tretej generácie a 6 mg/l pre tých, ktorí užívajú klasické lieky inhibujúce monoaminoxidázu. Z tohto jasne vyplýva, že niektoré skúmané vzorky môžu byť pre istú skupinu ľudí rizikové.

Polyamíny spermidín a spermín boli takisto prítomné v pivách, spermidín však len u 11 (10 % vzoriek) vzoriek pív a spermín u 100 vzoriek (87 % vzoriek). Spermidín (SPD) sa na začiatku experimentu nachádzal u 4 vzoriek (rozmedzie 1,1 – 32,7 mg/l, priemerná hodnota $10,6 \pm 12,9$ mg/l), pričom najvyššiu koncentráciu obsahovala vzorka 94 (svetlý pasterizovaný špeciál). Na konci experimentu bol spermidín zistený u 7 vzoriek (rozmedzie 1 – 38,7 mg/l, priemerná hodnota $8,9 \pm 12,4$ mg/l) a najvyššie množstvo obsahovala vzorka 27 (svetlý pasterizovaný špeciál s obsahom alkoholu 6 %). SPD bol vo väčšine prác prítomný do 10 mg/l (Pradenas *et al.*, 2016; Slomkowska a Ambroziak, 2002; Anli *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2009; Kalač *et al.*, 2002). Niektorí autori však uvádzajú aj koncentrácie medzi 20 – 50 mg/l (Buňka *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012).

Spermín (SPM) sa po zakúpení vzoriek vyskytoval u 86 pív (rozsah 1,1 – 14,3 mg/l, priemerná hodnota $6,4 \pm 3,8$ mg/l). U 68 z nich, bola koncentrácia spermínu menšia ako 10 mg/l a u zvyšných vzoriek (18 pív) bola koncentrácia medzi 10 – 15 mg/l. Najvyššie množstvo obsahovala vzorka 109 (svetlý pasterizovaný filtrovaný špeciál s obsahom alkoholu 6,5 %). Na konci skladovania bol spermín u 72 vzoriek prítomný v koncentrácii nižšej ako 10 mg/l a u 11 vzoriek v rozsahu 10 – 15 mg/l. Jedna vzorka (číslo 76) obsahovala $62,9 \pm 7,1$ mg/l (tmavý pasterizovaný ležiak s obsahom alkoholu 5,2 %). Celkový rozsah spermínu po zakúpení bol 1,1 – 62,9 mg/l (priemerná hodnota $7,2 \pm 7,0$ mg/l). Camacho *et al.* (2007) vôbec spermín vo svojej práci nedetekovali ani v jednej vzorke, vo zvyšných prácach sa uvádza rozmedzie od ND po 11,6 mg/l (Tang *et al.*, 2009; Loukou a Zotou, 2003; Lozanov *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2003; Anli *et al.*, 2006). Tieto polyamíny sú prirodze-

nou zložkou rastlinných buniek, preto sa označujú za biogénne amíny pochádzajúce zo surovín, najmä zo sladu. Za príčinu ich rozdielneho zastúpenia môžeme označiť kvalitu použitých východiskových surovín. SPM vznikajú biochemickou cestou z putrescínu, pripojením aminopropylových skupín za prítomnosti spermidín syntázy alebo spermín syntézy (Kalač *et al.*, 2003).

Z hľadiska zmien pH hodnôt, došlo po uplynutí DMT u 34 vzoriek k rastu pH, u 77 k poklesu pH a u 4 vzoriek sa hodnota pH nezmenila. V prípade nárastu bol u 15 vzoriek zaznamenaný rast menší ako 0,1 mg/l, u 11 vzoriek bol rast v rozmedzí 0,1 – 0,2 mg/l a u 8 vzoriek bol rast vyšší ako 0,2 mg/l. Pokles do 0,1 mg/l bol u 16 vzoriek, medzi 0,1 – 0,2 mg/l u 29 vzoriek a pokles nad 0,2 mg/l u 32 vzoriek. Nižšie pH indikuje prítomnosť bakteriálnej aktivity, hlavne kyslomliečnych baktérií, ktoré môžu produkovať biogénne amíny. V kyslom prostredí je dekarboxylácia aminokyselín zvýhodnená, preto možno očakávať vyššiu produkciu BA (Izquierdo-Pulido *et al.*, 1996). V tabuľke 16 sú uvedené súhrné informácie produkcie BA z hľadiska typu piva a tiež i rozmedzie pH hodnôt..

Tabuľka 16 Produkcia biogénnych amínov u 3 typoch pív a ich rozmedzie pH

	pH pred DMT	Σ BA pred DMT (mg/l)	Priemer. pred DMT (mg/l)	pH po DMT	Σ BA po DMT (mg/l)	Priemer po DMT (mg/l)
Ležiak (n = 65)	4,0 – 5,6	2885,8	44,4	3,8 – 5,1	3493	53,7
Špeciál (n = 38)	3,8 – 5,4	1700,8	44,8	3,7 – 5,4	2431	64,0
Výčapné (n = 12)	4,2 – 6,4	236,6	19,7	3,9 – 6,0	446,2	37,2

ZÁVER

Diplomová práca bola zameraná na sledovanie zmien v obsahu biogénnych amínov pred a po uplynutí DMT v 115 pivách pochádzajúcich z 35 českých mikropivovarov. V teoretickej časti došlo k popísaniu výroby piva, k charakterizácii biogénnych amínov a popísanie ich vzniku v pivách.

Praktická časť sa zaoberala stanovením jednotlivých biogénnych amínov v pivách pomocou kvapalinovej chromatografie. Stanovovalo sa 8 biogénnych amínov: spermín, spermidín, tyramín, histamín, kadaverín, putrescín, fenyletylamín a tryptamín. Interpretácia výsledkov sa skladala z dvoch častí, v prvej došlo k rozoberaniu obsahu biogénnych amínov v 3 typoch pív (ležiak, výčapné, špeciálne) a druhá časť sa zaoberá celkovým obsahom biogénnych amínov.

Výsledky tohto experimentu je možné zhrnúť takto:

- so zvyšujúcim sa obsahom alkoholu sa zvyšovalo aj celkové množstvo biogénnych amínov,
- pasterizované piva obsahovali vyššie množstvo biogénnych amínov ako nepasterizované,
- najviac biogénnych amínov bolo zistených v tmavých pivách,
- v každej vzorke bola zistená prítomnosť aspoň 2 biogénnych amínov a najviac biogénnych amínov v jednej vzorke bolo 6,
- najčastejšie sa vo vzorkách vyskytoval tyramín (100 % vzoriek), putrescín (89 %), kadaverín (88 %), spermín (87 %), histamín (36 %), tryptamín (20%), spermidín (10 %), fenyletylamín (3 %),
- maximálne zistené množstvo pre putrescín bolo 119,1 mg/l, tyramín 113,6 mg/l, kadaverín 91,5 mg/l, spermín 62,9 mg/l, histamín 49,2 mg/l, spermidín 38,7 mg/l, tryptamín 5,2 mg/l, fenyletylamín 4,3 mg/l.
- u väčšiny vzoriek došlo k poklesu pH po uplynutí DMT,
- niektoré vzorky pív, by mohli spôsobovať zdravotné ťažkosti pre citlivú skupinu ľudí.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ALMEIDA, C., FERNANDES, J.O., 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. *Food Control*. 2012, 25(1), 380-388. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.052. ISSN 09567135.

ANLI, R. E., VURAL, N., DEMIRAY, S., MERT, B. Biogenic Amine Content of Beers Consumed in Turkey and Influence of Storage Conditions on Biogenic Amine Formation. *Journal of the Institute of Brewing*. 2006, 112(3), 267-274. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00723.x. ISSN 00469750.

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

BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.

BARGOSSO, E., GARDINI, F., GATTO, V., MONTANARI, Ch., TORRIANI, S., TABANELLI, G. The Capability of Tyramine Production and Correlation between Phenotypic and Genetic Characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01371. ISSN 1664-302X.

BARGOSSO, E., TABANELLI, G., MONTANARI, Ch., LANCIOTTI, R., GATTO, V., GARDINI, F., TORRIANI, S. Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00259. ISSN 1664-302X.

BENEŠOVÁ, K., BĚLÁKOVÁ S., MIKULÍKOVÁ R., SVOBODA, Z. Activity of Proteolytic Enzymes During Malting and Brewing. *Kvasny Prumysl*. 2017, 63(1), 2-7 . DOI: 10.18832/kp201701. ISSN 00235830.

BENEŠOVÁ, K., ČUMOVÁ, M., BĚLÁKOVÁ ,S., MIKULÍKOVÁ, R., SVOBODA Z. The occurrence of "emerging" mycotoxins in brewing raw materials. *Kvasny Prumysl*. 2015, 61(4), 114-119. DOI: 10.18832/kp2015014. ISSN 00235830.

BRIGGS, D., BOULTON, C., BROOKES, P., STEVENS, R. *Brewing: Science and practice*. 1st ed. Cambridge: Woodhead Pub. Ltd. 2004, 881 s. ISBN 0-8493-2547-1.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 147(2), 112-119. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.017. ISSN 01681605.

BUŇKOVÁ, L., HUDCOVÁ, K., BUDINSKÝ, P., LORENCOVÁ, E., VELICHOVÁ, H., BUŇKA, F. 2012. Sledování kvality farmářských sýrů. *Mlékařské listy*, 2012, 133, I - IV..

BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V. Screening of probiotic cultures intended for processing of fermented foods for their ability to produce biogenic amines. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2008, 56(1), 25-30. DOI: 10.11118/actaun200856010025. ISSN 1211-8516.

CANBAŞ A., HERTEN H., ÖZŞAHİN F. The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochemistry*. 2001, 36(11), 1053-1058. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00134-0. ISSN 13595113.

CATALDI, M., BORRIELLO, F., GRANATA, F., ANNUNZIATO, L., MARONE, G. Histamine Receptors and Antihistamines: From Discovery to Clinical Applications. BERGMANN, K.-C. a J. RING, ed. *History of Allergy*. Basel: S. KARGER, 2014, s. 214-226. Chemical Immunology and Allergy. DOI: 10.1159/000358740. ISBN 978-3-318-02194-3.

CEJPEK, K. Vonné a chuťové složky sladů. *Chem. Listy*, 2014, 108: 426-435.

CORTACERO-RAMÍREZ, S., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007, 100(1), 383-389. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.037. ISSN 03088146.

CVENGROŠCHOVÁ M., ŠMOGROVIČOVÁ D. Příprava mladiny a jej vplyv na fermentáciu a vlastnosti hotového piva. *Kvasny Prumysl*. 2004, 50(3), 70-75. ISSN 00235830.

DEL RIO B., REDRUELLO B., LADERO, V., FERNANDEZ, M., MARTIN, M. C., ALVAREZ, M. A. Putrescine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CECT 8666 is reduced by NaCl via a decrease in bacterial growth and the repression of the genes involved in putrescine production. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 232, 1-6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.010. ISSN 01681605.

DEL RIO, B., REDRUELLO, B., LINARES, D.M., LADERO, V., FERNANDEZ, M., MARTIN, M.C., RUAS-MADIEDO, P., ALVAREZ, M.A. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*. 2017, 218, 249-255. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.046. ISSN 03088146.

DIEL, S., HERWALD, M., BORCK, H., DIEL, F. Histamine in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2009, 2009, s. 317-326. DOI: 10.1016/B978-0-12-373891-2.00030-4. ISBN 9780123738912.

DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., KAROVIČOVÁ, J., MÓROVÁ, E. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Malé centrum. 1996. 511 s. ISBN 8096-70641-1.

DVOŘÁKOVÁ, M., DOSTÁLEK, P., SKULILOVÁ, Z., JURKOVÁ, M., KELLNER, V., GUIDO L.F. Barley and malt polyphenols and their antioxidant properties. *Kvasny Průmysl*. 2010, 56(3), 160-163. DOI: 10.18832/kp2010022. ISSN 00235830.

FIDLER, M., KOLÁŘOVÁ, L. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chem. listy*, 2009, 103: 232-235.

GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C, GALGANO, F, CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 64(1-2), 105-117s . DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinářstvo*. 2008, 2 (1). ISSN 1337-0960.

HANKO V., POTĚŠIL A., POTĚŠIL V., NEŠPOR J., KARABÍN M., JELÍNEK L., DOSTÁLEK P. Alternative Methods for Shelf Life Extension of Unfiltered Beers from

Microbreweries. *Kvasny Prumysl.* 2017, 63(6), 298-306. DOI: 10.18832/kp201729. ISSN 00235830.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W. H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.* 1999, 208(5-6), 418-423. DOI: 10.1007/s002170050440. ISSN 1431-4649.

HARRISON, M.A. Beer/Brewing. *Encyclopedia of Microbiology.* Elsevier, 2009, 2009, s. 23-33. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00117-6. ISBN 9780123739445.

HORNSEY, I. *Brewing.* 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013, 323 s. ISBN 978-1-84973-602-2.

HORNSEY, I. *Brewing.* 1st ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, 231 s. ISBN 08-540-4568-6.

CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví.* 1. vyd. Praha: Grada, 2007. 207 s. ISBN 978-80-247-1616-9.

IZQUERDO-PULIDO, M., HERNÁNDEZ-JOVER, T., MARINÉ-FRONT, A., VIDAL-CAROU, M. Biogenic Amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1996, 44(10), 3159-3163. DOI: 10.1021/jf960155j. ISSN 0021-8561.

KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin.* Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.

KADLEC, P. *Technologie potravin II.* 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.

KALÁČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry.* 2005, 90(1-2), 219-230. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.03.044. ISSN 03088146.

KALAC, P., KRÍZEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of the Institute of Brewing.* 2003, 109(2), 123-128. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x. ISSN 00469750.

KARABÍN, M., HALAMA, Š., JELÍNEK, L., WANG D., DOSTÁLEK, P. A comparison of Czech and Chinese varieties of barley with regards to technologically important poly-

phenolic prenylflavonoids. *Kvasny Prumysl.* 2015, 61(3), 62-68 . DOI: 10.18832/kp2015010. ISSN 00235830.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. *Chem. Pap.* 2005, 59 (1), 70-79s.

KOMPRDA, T. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science.* 2004, 67(4), 607-616. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.01.003. ISSN 03091740.

KOMPRDA, T. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství.* 2005, 55(10), 646–650s. ISSN 0506-8231.

KNOPE, K.E., SLOAN-GARDNER, T.S., STAFFORD, R.J. (2014). Histamine fish poisoning in Australia, 2001 to 2013. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 38, 285–293.

KOPŘIVA, V., HOSTOVSKÝ, M., NEKVAPIL, T., PECHOVÁ, A. *Vybrané kapitoly z biochemie potravin*, 2014. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-677-3.

KOSAŘ, K.; PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby piva a sladu*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.

KOZÁK, V., KOZÁKOVÁ, V. *Změny v českém pivovarství na přelomu tisíciletí*. Zlín: VeRBuM, 2013. ISBN 978-80-87500-45-3.

KŘÍŽEK, M., KALACĚ, P. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. In *Czech Journal of Food Science.* 1998, 16 (4), 151 – 159s.

KROFTA K., VRABCOVÁ S., MRAVCOVÁ L., DOSTÁLEK P., KARABÍN M., JELÍNEK L., HUDCOVÁ T. Classification of Czech hops according to their contents of KROFTA K., VRABCOVÁ S., MIKYŠKA A., JURKOVÁ M. The effect of hop beta acids oxidation products on beer bitterness. *Kvasny Prumysl.* 2013, 59(10), 306-312 . DOI: 10.18832/kp2013032. ISSN 00235830.

KROFTA K., MIKYŠKA A. Hop beta acids: Properties, significance and utilization. *Kvasny Prumysl.* 2014, 60(4), 96-105. DOI: 10.18832/kp2014010. ISSN 00235830.

LI, Q., WANG, J., LIU, C. Beers. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2017, 305-351s. DOI: 10.1016/B978-0-444-63666-9.00012-1. ISBN 9780444636669.

LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012, 47(10), 2086-2091. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x. ISSN 09505423.

LORET, S., DELOYER, P., DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*. 2005, 89(4), 519-525. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.03.010. ISSN 03088146.

MAH, J. H., KIM, Y. J., HWANG, H. J. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control*. 2009, 20(5), 449-454s. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.006. ISSN 09567135.

MARCOBAL, Á., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., MORENO-ARRIBAS, M. V., MUÑOZ, R. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*. 2006, 157(5), 417-424. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.11.006. ISSN 09232508.

MARINO, M., MAIFRENI, M., BARTOLOMEOLI, I., RONDININI, G. Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 105(2), 540-549. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03793.x. ISSN 13645072.

MATOULKOVÁ, D., KUBIZNIAKOVÁ, P. Lactic acid bacteria and cultivation methods of their detection - Part I. *Kvasny Prumysl*. 2015, 61(3), 76-88. DOI: 10.18832/kp2015012. ISSN 00235830.

MATOULKOVÁ, D., KUBIZNIAKOVÁ, P., SIGLER, K. Beer-spoiling ability of lactic acid bacteria and its relation with genes *horA*, *horC* and *hitA*. *Kvasny Prumysl*. 2012, 58(11), 336-342. DOI: 10.18832/kp2012030. ISSN 00235830.

MATOULKOVÁ, D., ŠAVEL, J. Brewing and the taxonomy of brewer's yeast. *Kvasny Prumysl* . 2007, 53(7), 206-214. DOI: 10.18832/kp2007012. ISSN 00235830.

MORENO-ARRIBAS, V., LONVAUD-FUNEL, A. Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 195(1), 103-107. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10505.x. ISSN 03781097.

MOSHER M., TRANTHAM K., MOSHER M., TRANTHAM K. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-11-15, s. 157-182. DOI: 10.1007/978-3-319-46394-0_6. ISBN 978-3-319-46393-3.

MOUSIA, Z., BALKIN, R.C., PANDIELLA, S.S., WEBB, C. The effect of milling parameters on starch hydrolysis of milled malt in the brewing process. *Process Biochemistry*. 2004, 39(12), 2213-2219. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.11.015. ISSN 13595113.

NEŠPOR J., HANKO V., KARABÍN m., JELÍNEK L., DOSTÁLEK P. Prenylated Flavonoids as Valuable Biologically Active Compounds from Hops. *Kvasny Prumysl*. 2017, 63(4), 164-172. DOI: 10.18832/kp201719. ISSN 00235830.

NIEMSCH K., THEODOR H. Current problems of colloidal haze of beer. *Kvasny Prumysl*. 2006, 52(1), 7-8. DOI: 10.18832/kp2006033. ISSN 00235830.

PAJUREK, M. Vybrané technologické aspekty a souvislosti při zlepšování senzoričké stability piva. *Kvasny Prumysl*. 2003, 49(5), 120-124. ISSN 00235830.

PEREIRA, C. I., MATOS, D., SAN ROMAO, M. V., BARRETO CRESPO, M. T. Dual Role for the Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Enterococcus faecium* E17: Response to an Acid Challenge and Generation of a Proton Motive Force. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(2), 345-352 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1128/AEM.01958-08. ISSN 0099-2240.

PESSIONE, E., PESSIONE, A., LAMBERTI, C. et al. First evidence of a membrane-bound, tyramine and β -phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: A two-dimensional electrophoresis proteomic study. *PROTEOMICS*. 2009, 9(10), 2695-2710. DOI: 10.1002/pmic.200800780. ISSN 16159853.

PETERS, L.J., KOVACIC, J.P. Histamine: metabolism, physiology, and pathophysiology with applications in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2009, 19(4), 311-328. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00434.x. ISSN 14793261.

POŠTULKOVÁ, M., VITOUŠOVÁ, K., NOVÁK, P., FIALA, J., RŮŽIČKA, M., BRÁNYIK, T. History and new trends of research into overfoaming of beer. *Kvasny Průmysl*. 2013, 59(10), 317-320 . DOI: 10.18832/kp2013034. ISSN 00235830.

PRADENAS, J., GALARCE-BUSTOS, O., HENRÍQUEZ-AEDO, K., MUNDACAU-RIBE, R., ARANDA, M. Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. *Food Control*. 2016, 70, 138-144. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.05.043. ISSN 09567135.

ROMERO, R., BAGUR, M. G., SÁNCHEZ-VIÑAS, M., GÁZQUEZ, D. The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, 376(2), 162-167. DOI: 10.1007/s00216-003-1885-2. ISSN 1618-2642.

SIMATE, G.S. Water treatment and reuse in breweries. *Brewing Microbiology* . Elsevier, 2015, 2015, s. 425-456 . DOI: 10.1016/B978-1-78242-331-7.00020-4. ISBN 9781782423317.

SLOMKOWSKA, A., AMBROZIAK, W. Biogenic amine profile of the most popular Polish beers. *European Food Research and Technology*. 2002, 215(5), 380-383. DOI: 10.1007/s00217-002-0571-5. ISSN 1438-2377.

SPITAEELS, F., WIEME, A.D., JANSSENS, M., et al. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *PLoS ONE*. 2014, 9(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0095384. ISSN 1932-6203.

SPITAEELS, F., WIEME, A. D., JANSSENS, M., AERTS, M., VAN LANDSCHOOT, A., DE VUYST, L., VANDAMME, P. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiology*. 2015, 49, 23-32. DOI: 10.1016/j.fm.2015.01.008. ISSN 07400020.

SUZUKI, K., IJIMA, K., SAKAMOTO, K., SAMI, M., YAMASHITA, H. A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*. 2006, 112(2), 173-191s. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x. ISSN 00469750.

SUZUKI, K., ASANO, S., IJIMA, K., KITAMOTO, K. Sake and Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008, 114(3), 209-223. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00331.x. ISSN 00469750.

SUZZI, G., GARDINY, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 88(1), 41-54. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00080-1. ISSN 01681605.

TOFALO, R., PERPETUINI G., SCHIRONE M., SUZZI G. Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. 2016, s. 424. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00071-4. ISBN 9780123849533.

TÓTH, Ž., DRÁB, Š., FRANČÁKOVÁ, H., LIŠKOVÁ, M., NÁVOJSKÁ, J. The influence of first wort part and afterworts in saccharification of wort. *Potravinářstvo*. 2011, 5(1). DOI: 10.5219/114. ISSN 1337-0960.

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.

VRZAL, T. a J. OLŠOVSKÁ. N-nitrosamines in 21st Century. *Kvasný Průmysl*. 2016, 62(1), 2-8. DOI: 10.18832/kp2016001. ISSN 00235830.

Výhláška Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. *O potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí*.

ZHANG, K., NI, Y. Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Soluble expression and characterization. *Protein Expression and Purification*. 2014, 94, 33-39. DOI: 10.1016/j.pep.2013.10.018. ISSN 10465928.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

BA	Biogénny amín
MAO	Monoaminoxidáza
DAO	Diaminoxidáza
HMT	Histidinmetyltransferázu
PEA	Fenyletylamín
TRM	Tryptamín
PUT	Putrescín
CAD	Kadaverín
HIM	Histamín
TYM	Tyramín
SPD	Spermidín
SPM	Spermín
DMT	Dátum minimálnej trvanlivosti

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Porovnanie obsahu biogénnych amín pred uplynutím DMT a po nej..71

ZOZNAM TABULIEK

<i>Tabuľka 1 Teploty a pôsobiace enzýmy pri rmutovaní (prepracované podľa Kadlec et al., 2002).</i>	17
<i>Tabuľka 2 Biologický význam biogénnych amínov (prepracované podľa Velišek, 2009).</i>	26
<i>Tabuľka 3 Popis analyzovaných vzoriek pív.</i>	39
<i>Tabuľka 4 Lineárny gradientový elučný program</i>	44
<i>Tabuľka 5 Celkový obsah biogénnych amínov (mg/l) v ležiakoch.</i>	45
<i>Tabuľka 6 Obsah vybraných biogénnych amínov (TRM, PEA, PUT, CAD) v ležiakoch.</i>	47
<i>Tabuľka 7 Obsah vybraných biogénnych amínov (HIM, TRM, SPD, SPM) v ležiakoch.</i>	51
<i>Tabuľka 8 Zmeny pH na počiatku skladovania a na jeho konci u ležiakových pív.</i>	55
<i>Tabuľka 9 Celkový obsah biogénnych amínov (mg/l) v špeciálnych pivách.</i>	56
<i>Tabuľka 10 Obsah vybraných biogénnych amínov (TRM, PEA, PUT, CAD) v špeciálnych pivách.</i>	57
<i>Tabuľka 11 Obsah vybraných biogénnych amínov (HIM, TYM, SPD, SPM) v špeciálnych pivách.</i>	59
<i>Tabuľka 12 Hodnoty pH na počiatku skladovania a na jeho konci u špeciálnych pív.</i>	63
<i>Tabuľka 13 Celkový obsah biogénnych amínov (mg/l) vo výčapných pivách.</i>	63
<i>Tabuľka 14 Obsah biogénnych amínov (mg/l) vo výčapných pivách.</i>	66
<i>Tabuľka 15 Zmeny pH na počiatku skladovania a na konci u výčapných pív.</i>	68
<i>Tabuľka 16 Produkcia biogénnych amínov u 3 typoch pív a ich rozmedzie pH</i>	77