

Vývoj obsahu biogenních aminů v průběhu výroby vybraných vzorků pív

Bc. Jiří Václavek

Diplomová práce
2014

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jiří Václavek, DiS.**
Osobní číslo: **T11726**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Vývoj obsahu biogenních aminů v průběhu výroby vybraných vzorků pív**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručný popis technologie výroby piva.
2. Charakterizace pivních speciálů.
3. Stručná charakterizace biogenních aminů a jejich výskyt v alkoholických nápojích.

II. Praktická část

1. Odběr vzorků meziproductů během výroby vybraných tipů pív.
2. Stanovení obsahu biogenních aminů v jednotlivých vzorcích pomocí HPLC.
3. Vyhodnocení výsledků, diskuze s literaturou a vyvození závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

[1]KOSAŘ,K.,PROCHÁZKA,S.,a kol.Technologie výroby sladu a piva.VÚPS,Praha

[2]BASAŘOVÁ,G.,ŠAVEL,J.,BASAŘ,P.,LEJSEK,T.Pivovarství:teorie a praxe výroby piva.VŠCHT,Praha 2010

[3]SHALABY A.R.Significance of biogenic amines to food safety and human health.Food Research International.1996,29,675-690

[4]LORET,S.,DELOYER,P.,DANDRIFOSSE,G.,2005.Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process:Data from Belgian samples.Food Chemistry 89,519-525

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Václavek Jiří

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 24.4. 2014.....



.....

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

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

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

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

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

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

Biogenní aminy jsou často přítomny ve fermentovaných nápojích. V pivu zpravidla vznikají během výrobního procesu, nebo jsou obsaženy ve vstupních surovinách. Tato práce je zaměřena na popis technologie výroby piva a vývoj biogenních aminů u vybraných vzorků piv během jejich výroby. Bylo vybráno 5 vzorků různých typů piv (tmavý ležák, tmavé výčepní, světlé speciální, světlý ležák, světlé pšeničné), které byly analyzovány na obsah biogenních aminů ve zvolených místech v závislosti na průběhu technologického procesu. Ke stanovení bylo použito metody HPLC po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Nejvyšší hodnoty celkového obsahu biogenních aminů byly detekovány u speciálního piva s EPM 14 %, na konci skladování hotového výrobku, kde bylo detekováno 52,8 mg.l⁻¹. Nejvyšší množství bylo detekováno u kadaverinu, kde bylo naměřeno max. 33 mg.l⁻¹. Jako nejkritičtější fáze výroby ve vztahu k biogenním aminům lze označit hlavní kvašení, dokvašování piva a skladování hotových piv.

Klíčová slova: pivo, biogenní aminy, technologie výroby piva, dekarboxylace, fermentace.

ABSTRACT

Biogenic amines are often present in fermented beverages. In beer they usually occur during the manufacturing process, or they are contained in raw materials. The current thesis is focused on the description of the technology of beer production, as well as on the formation and the occurrence of biogenic amines in selected samples of beer during its production. Five samples of different types of beer were selected (dark lager, dark draught beer, premium pale beer, pale lager, pale wheat beer) which were further analyzed for the content of biogenic amines in selected stages of production depending on the technological process. The determination method used here was HPLC which had been preceded by derivatization with dansylchloride. The highest values of total biogenic amines content were detected at premium beers with original wort extract 14% (w/w) at the end of the storage of the finished product. Here it was detected 52.8 mg.l⁻¹. The highest rate was detected at cadaverine which was measured up to 33 mg.l⁻¹. As the most critical phase of beer produc-

tion in relation to biogenic amines, it can be indicated the primary fermentation and storage of finished products.

Keywords: beer, biogenic amines, brewing technology, decarboxylation, fermentation.

MOTTO:

„Dej Bůh štěstí!“

(pivovarský pozdrav)

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych chtěl poděkovat Ing. Vendule Pachlové, Ph.D., která byla vedoucí této diplomové práce, za její odborné vedení, za poskytnutí cenných rad a připomínek a také za trpělivost a čas který mi věnovala při zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Ludmile Zálešákové, která se podílela na přípravě a analýzách zpracovávaných vzorků.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA	13
1.1 SUROVINY PRO VÝROBU PIVA	13
1.1.1 Voda	14
1.1.2 Slad.....	15
1.1.3 Chmel	17
1.2 VÝROBA MLADINY	17
1.2.1 Šrotování sladu.....	18
1.2.2 Vystírání	19
1.2.3 Rmutování	19
1.2.3.1 Infuzní rmutování	21
1.2.3.2 Dekokční rmutování	21
1.2.4 Scezování a vyslazování mláta.....	21
1.2.5 Chmelovar	22
1.2.6 Odloučení hrubých kalů a chlazení mladiny	23
1.3 KVAŠENÍ MLADINY A DOKVAŠOVÁNÍ PIVA	24
1.3.1 Pivovarské kvasinky.....	25
1.3.2 Hlavní kvašení.....	25
1.3.3 Dokvašování a zrání piva	27
1.4 FILTRACE A ZÁVĚREČNÉ ÚPRAVY PIVA.....	28
1.4.1 Filtrace piva.....	28
1.4.2 Stabilizace piva	30
1.4.3 Pasterace piva.....	31
2 PIVO SPECIÁLNÍ, NEALKOHOLICKÉ A PŠENIČNÉ	33
2.1 SPECIÁLNÍ PIVO	33
2.2 NEALKOHOLICKÉ PIVO	33
2.2.1 Výroba nealkoholického piva vakuovou destilací	35
2.3 PŠENIČNÉ PIVO	35
3 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VÝSKYT V ALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH	37
3.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	38
3.2 BAKTERIE PODÍLEJÍCÍ SE NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ	40
3.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU A OSTATNÍCH ALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH.....	40
3.3.1 Biogenní aminy v pivovarských surovinách	41
3.3.2 Obsah biogenních aminů během výrobního procesu	42
3.3.3 Výskyt během skladování	42
II PRAKTICKÁ ČÁST	44
4 CÍL PRÁCE	45
5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE	46

5.1	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	46
5.2	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	49
5.2.1	Příprava vzorků derivatizací	49
5.2.2	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	50
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	52
6.1	VÝVOJ CELKOVÉHO OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ VE ZKOUMANÝCH VZORCÍCH.....	52
6.1.1	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku A	52
6.1.2	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku B.....	53
6.1.3	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku C.....	54
6.1.4	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku D	55
6.1.5	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku E.....	56
6.2	VÝVOJ JEDNOTLIVÝCH BIOGENNÍCH AMINŮ VE ZKOUMANÝCH VZORCÍCH.....	58
6.2.1	Obsah kadaverinu	59
6.2.2	Obsah putrescinu	60
6.2.3	Obsah tyraminu	62
6.2.4	Obsah spermidinu.....	64
6.2.5	Obsah sperminu.....	66
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
	SEZNAM TABULEK.....	80
	SEZNAM GRAFŮ	81

ÚVOD

Pivo je v České republice tradiční nápoj oblíbený pro své vyjímečné sensorické vlastnosti a celkový osvěžující charakter. Výrobě piva byla po staletí v naší zemi věnována náležitá pozornost a péče. Spolu s průmyslovou modernizací v různých výrobních odvětvích se postupně modernizovala i pivovarská výroba a zejména na konci minulého století zaznamenalo pivovarství v ČR významný posun k nejmodernějším trendům a technologiím. Dnes je již pivovarství u nás na vysoké technologicko-technické úrovni, která s sebou přináší vyšší stupeň automatizace, efektivnější sanitační a hygienické možnosti a větší požadovanou dynamiku produkce. Přesto však i dnes přetrvávají v pivovarské výrobě některé tradiční technologické prvky (například tradiční kvašení mladiny v otevřených kvasných kádích), které mohou na jedné straně být významným faktorem pro sensorickou kvalitu produkovaných piv, mohou pivu udávat jeho jedinečný, originální, nezaměnitelný, plný charakter. Avšak na straně druhé mohou být také potenciálně náchylnější pro případnou kontaminaci či vznik a vývoj některých nežádoucích látek.

Tato práce se zaměřuje na výskyt biogenních aminů v průběhu výroby vybraných piv. Biogenní aminy jsou dusíkaté látky vznikající především dekarboxylací aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů a v pivu mohou vznikat při výrobě a dále k jejich růstu může docházet i v hotovém výrobě během jeho skladování. Vzhledem k oblibě piva mohou vyšší obsahy biogenních aminů v tomto nápoji představovat i jisté riziko příjmu těchto látek při případné vysoké konzumaci. Z hygienického hlediska mohou biogenní aminy sloužit jako indikátory stupně kažení potravin. Biogenní aminy mají v potravinách i toxikologický význam a u vnímavých jedinců (alergiků, pacientů konzumujících léčiva s účinkem inhibitorů MAO-detoxikačních mechanismů) mohou představovat při vyšším příjmu i jisté zdravotní riziko. Např. u histaminu může jeho vysoký příjem u těchto lidí způsobovat pokles tlaku, bolesti hlavy, břišní křeče, průjemy, zvracení, dechové potíže a třes.

V České republice jsou stanoveny maximální povolené limity biogenních aminů pouze v rybách a produktech z ryb, i když lze předpokládat, že tyto látky vznikají i v dalších fermentovaných potravinách. Z tohoto pohledu je nutné sledovat produkci biogenních aminů i v dalších produktech se zaměřením na technologii výroby a dále jejich skladování.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA

Pivo je tradiční český nápoj s nízkým obsahem alkoholu vyráběný ze tří základních surovin – vody, sladu, chmele a za výrazného přispění kultury mikroorganismů pivovarských kvasinek. Charakteristický je zlatavou barvou, tvorbou kompaktní pěny po nalití do sklenice a v chuti vyniká svou typickou hořkostí docílenou chmelem nebo přípravky z něho vyrobenými. Právě pro své význačné sensorické vlastnosti je pivo oblíbeno nejen v Česku, kde má jeho výroba i konzumace hlubokou tradici, ale i celosvětově, neboť je považováno za řízný osvěžující nápoj.

Pokud bychom pivo vymezili legislativně pak dle Vyhlášky 335/1997 Sb. v platném znění jej můžeme popsat jako pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, který vedle kvasným procesem vzniklého ethylalkoholu a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu[1 – 3].

1.1 Suroviny pro výrobu piva

Příznivé podmínky k pěstování základních sladařských a pivovarských surovin - ječmene a chmele - spolu s dostatečným množstvím kvalitních vodních zdrojů významnou mírou přispěly k rozvoji a úspěchu pivovarského oboru u nás a také jeho prosazení na špičkovou světovou úroveň[2].

Suroviny pro výrobu piva můžeme rozdělit na

1. základní suroviny:

- vodu,
- slad,
- chmel,

+ pivovarské kvasnice

2. pomocné suroviny:

- enzymové přípravky,
- dobarvovací prostředky,

- přípravky pro úpravu pěnivosti piva,
- sladidla,
- stabilizační přípravky[1].

V následujících podkapitolách budou postupně charakterizovány tři základní pivovarské suroviny s ohledem na jejich stěžejní význam v procesu výroby piva.

1.1.1 Voda

Pivovary a sladovny patří v rámci potravinářského průmyslu k podnikům s vysokou spotřebou vody a to jak v rámci své technologie výroby tak i na sanitační a provozně technické účely. Na 1 hl vyrobeného piva je spotřebováno přibližně 12 až 15 hl vody.

Voda používaná při výrobě piva má podstatný vliv na konečný produkt, tedy na celkovou kvalitu finálního výrobku ale i na charakteristické vlastnosti určité značky piva. V současnosti je možné za pomoci moderních úprav zajistit základní chemické složení vody z hlediska požadavku na zastoupení makroelementů, nikoli však dosáhnout kompletní rovnováhy mikroelementů, plynů apod., které jsou specifické v podmínkách místa původu vody.

Z přírodních zdrojů vod se v pivovarství využívá jak spodních vod, tak povrchové vody. Do povrchové vody spadá voda říční, z údolních přehrad, rybníční, jezerní. Mezi spodní vodu můžeme zařadit vodu pramenitou, studniční, infiltrační z vrtů poblíž povrchových zdrojů.

Přírodní vody jsou po chemické stránce koncentrovanými roztoky iontů. Obsahují jak kationty (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) tak anionty (OH^- , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SiO_3^{2-}). Mezi významné rozpuštěné látky patří vápenaté a hořečnaté soli, které vytvářejí tvrdost vody a ta patří k důležitým faktorům při posuzování kvality vody pro pivovarské účely. Tvrdost vody může být buď stálá (nekarbonátová), anebo přechodná (karbonátová). Stálou tvrdost tvoří vápenaté a hořečnaté soli, které jsou stálé (sírany, chloridy, křemičitany aj.), zatímco přechodná tvrdost je tvořena hydrogenuhličitany, jež se varem částečně či úplně rozkládají. Celková tvrdost vody je pak součtem přechodné a stálé tvrdosti.[1, 2, 4, 5, 6]

Dle hodnoty tvrdosti můžeme vody dělit na [1]:

- měkké do $1,4 \text{ mmol l}^{-1}$
- středně tvrdé $1,3 - 2,5 \text{ mmol l}^{-1}$
- tvrdé $2,5 - 3,8 \text{ mmol l}^{-1}$
- velmi tvrdé nad $3,8 \text{ mmol l}^{-1}$

Pro světlá piva plzeňského typu (spodně kvašená) je vhodná měkká voda. Z technologického hlediska mají dále také význam reakce některých iontů vody s fosforečnany sladu, které způsobují snížení pH tedy zvyšují kyselost rmutů, sladiny a mladiny. Tímto způsobem působí především ionty vápníku a částečně i hořčíku pozitivně na činnost enzymů při rmutování. Naopak hydrogenuhličitanové a uhličitanové ionty mají opačný efekt, čili zvyšují pH a tak působí negativně na varní proces.

K základním úpravám vodních zdrojů používaných v pivovarství patří mechanické čištění, čiřením po němž následuje sedimentace a filtrace, odželezování a odmanganování, odstranění oxidu uhličitého a dezinfekce vody.[1] Přičemž varní voda musí splňovat normu pro pitnou vodu.[6]

1.1.2 Slad

Slad je řízeným procesem naklíčený a hvozděný ječmen, který po procesu sladování má potřebné enzymy a aromatické i barevné látky nezbytné pro výrobu určeného druhu piva. Základem sladování je vytváření příhodných podmínek pro klíčení ječmene, kdy dochází v zrna k aktivaci a tvorbě technologicky zásadních enzymů, zejména cytolýtických, proteolytických a amylolytických. Tak vzniká zelený slad, jenž se následným hvozděním, za působení zvýšených teplot vyvolávajících chemické reakce tvorby aromatických a barevných látek, přemění v hotový slad.[6]

Původně byl slad vyráběn v každém pivovaru, který si jej vyráběl pro svoji potřebu. Prodával se, příp. vyvážel surový ječmen. V polovině 19. století s nástupem průmyslové výroby i v pivovarství byla postupně modernizována také výroba sladu. Byly zakládány samostatné obchodní sladovny, které vyrobený slad prodávaly nejen domácím pivovarům, ale postupně jej začaly vyvážet i do zahraničí a v rámci pivovarského oboru tak vzniklo další samostatné odvětví – výroba sladu. S rostoucími nároky na kvalitu vyráběných piv rostou i požadavky na kvalitní kritéria sladu. Vedle vysoké extraktivnosti sladu (79 – 83 % sušiny), optimální hladiny bílkovin (9,5-11,5 %) a proteolytického (Kolbachovo číslo 36 – 41 %) i

cytolytického (β -glukany 0,5 – 1 % v sušině) rozluštění se zpřísnily požadavky na výrobu partií sladu nejvýše ze dvou odrůd ječmene a limitovaly se hranice koncentrací nebiologických kontaminací, především kancerogenních nitrosaminů, stejně jako sekundárních metabolitů mikrobiálních kontaminací (např. metabolity plísní, karcinogenní mykotoxiny). Zajištění těchto jakostních kritérií podmiňuje profit domácí produkce a znamená rovněž úspěch na zahraničních trzích[1, 2].

Nejčastěji vyráběné druhy sladů v České republice (ČR) jsou slad světlý a bavorský. Ostatní druhy sladů jsou v ČR vyráběny jen okrajově pro speciální účely. Světlý slad je typický příznivým extraktem a dostatečným enzymatickým potenciálem, s nízkou barvou kongresní sladiny vyjádřené v jednotkách EBC (European Brewery Convention). Tento typ sladu je zásadní pro výrobu světlého, lehkého a speciálního piva. Vlhkost hotového sladu je okolo 4 %. Bavorský slad je typický vysokou barvou, výraznějším aromatem, kterého je dosaženo hlubším rozluštěním (rozštěpením vysokomolekulárních látek na jejich štěpné produkty) během klíčení. Toho se dosahuje klíčením o 1 – 2 dny déle, oproti běžné době klíčení u světlého sladu, s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě. Bavorský slad je také odlišně hvozden, s cílem podpořit tvorbu melanoidinů a dotahovací teploty se pohybují okolo 105 °C. Obsah vody v hotovém sladu je okolo 2 % [5].

K výrobě tmavých a speciálních piv jsou připravované speciální slady. Liší se od běžných sladů zejména svou enzymovou aktivitou, redoxní kapacitou, kyselostí, barvou a vůní. Jejich použitím spolu s běžnými slady se dosahuje úpravy sensorických vlastností piva, zejména chuti, barvy, aromatických vlastností a pěnivosti. Mezi speciální slady řadíme slad karamelový, slad barevný, nakuřovaný slad, melanoidinový slad, diastatický slad, proteolytický slad, pšeničný slad [6].

Z ekonomických důvodů pro snížení nákladů na sypání sladu (pojem sypání označuje rozpis surovin, které vnášejí do várky extrakt, a určují tak její objem a koncentraci) se používají náhražky sladu. Můžeme je vymezit jako škrobové nebo cukerné surogáty, kterými lze do určitého množství nahradit základní pivovarskou surovinu ječný slad. Surogáty mohou být buď škrobnaté např. nesladovaný ječmen, rýže, kukuřice, maniok, škrob aj., nebo to mohou být cukernaté surogáty – především řepný a třtinový cukr, dále různé dextrinové a glukosové sirupy [1, 4, 5].

1.1.3 Chmel

Chmel, jako jednu z nezastupitelných surovin tvoří usušené chmelové hlávky samičích rostlin chmele evropského (*Humulus lupulus* var. *europaeus*). Má mimořádný sensorický význam ve vznikajícím pivu – je nositelem jeho typické hořké chuti i charakteristického pивního aroma a je tedy technologicky důležitou surovinou [1, 5, 6].

Na území našeho státu jsou pro pěstování chmele velmi příznivé podmínky z hlediska složení půd, množství srážek, klimatu, směru větrů a slunečního záření především v době květu a sklizně. Typickými odrůdami tradičně pěstovanými na území Čech a Moravy jsou polorané červeňáky, jejichž název je odvozen od načervenalé rostliny. Zabarvení rostliny má původ ve vyšším obsahu polyfenolů na rozdíl od odrůd zeleňáků pěstovaných v zahraničí[2].

Technologicky nejdůležitějšími složkami chmele jsou hořké látky, neboli chmelové pryskyřice dávající pivu hořkou chuť, dále jsou to silice, které zajišťují charakteristické aroma a polyfenolové sloučeniny pozitivně ovlivňující plnost chuti piva. Chmelové pryskyřice jsou složeny z řady chemicky podobných sloučenin, z nichž nejvýrazněji ovlivňují hořkost alfa-hořké kyseliny, které se skládají převážně z humulonu, kohumulonu a adhumulonu. Nižší účinnost mají beta-hořké kyseliny, nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice. Další složkou způsobující typické pивní aroma jsou chmelové silice, jež jsou tvořeny směsí několika stovek látek. Chmelové polyfenoly se uplatňují při srážení vysokomolekulárních bílkovin.

Většina produkce chmele ve světě se zpracovává na chmelové výrobky. Důvodem je nízké využití cenných složek při používání hlávkového chmele, a také chemická nestálost většiny obsahově cenných látek. Mechanickou úpravou jsou vyráběny mleté a granulované chmele. Fyzikální úpravou chmele je extrakce, jíž se připravují buď extrakty dvoustupňové, nebo jednostupňové. Chemickými postupy se produkují speciální izoextrakty, které se používají k tzv. studenému chmelení, jímž se obchází proces chmelovaru a tyto látky jsou dávkovány až do hotového piva[2, 4, 6].

1.2 Výroba mladiny

Výroba piva začíná na varně a získaný meziprodukt se nazývá mladina. Základním cílem zpracování ve varně je převedení extraktu sladu do roztoku za pomoci enzymů. Vzniklý

roztok sladiny je dále oddělen od nerozpustných zbytků a následně ohořčen chmelovými produkty. Tepelně stabilizovaná mladina je pak zbavena hrubých kalů a zchlazením připravená k zakvášení. Při výrobě mladiny probíhají následující technologické operace: šrotování, vystírání, rmutování, scezování, vyslazování, chmelovar, odloučení hrubých kalů, chlazení mladiny.

1.2.1 Šrotování sladu

Při šrotování dochází k mechanické dezintegraci sladových zrn, které jsou tímto způsobem přeměňovány na sladový šrot a tak nejlépe zpřístupněny následnému varnému procesu.

Cílem šrotování je dokonalé vymletí jádra sladu, aby byl zpřístupněn škrob a další látky pro štěpení ve varně. Obalové pluchy zrna během šrotování musí zůstat celistvé, protože fungují jako filtrační materiál při scezování sladiny. Jednotlivé části zrna mají rozdílné vlastnosti proto se slad těžko mele se zajištěním jednotného složení. Endosperm by měl být jemně rozemlet a při šrotování by se měl získat optimální podíl pluch, krupice a mouky.

Postupy šrotování jsou uzpůsobeny zpracovávanému sladu a technologickému postupu případně zařízení ve varně. Jsou-li varny vybaveny scezovací kádí, může se použít hrubší šrotování s minimálním poškozením pluch, nízkým podílem hrubé krupice a vysokým podílem jemné krupice. V případě, že jsou vybaveny sladinovým filtrem měl by mít šrot naopak dobře rozemleté pluchy vzhledem k odlišnému způsobu scezování s nízkou vrstvou mlátového koláče[5]. Při šrotování vlhkého sladu je plucha více chráněna před poškozením než u suchého sladu a proto se často používá vlhčení sladu neboli tzv. mokré šrotování. Při mokřém šrotování se slad před mletím máčí ve vodě o teplotě 10 – 50 °C po dobu 10 – 15 minut a vlhkost zrna se zvýší na 30 %. Máčecí voda obsahuje extraktivní látky a používá se k vystírání.

Zařízení, ve kterých probíhá mletí, se označují jako šrotovníky. Jedná se o válcové stolice, které jsou umístěny v samostatných prostorách (šrotovnách) v blízkosti varen. Válce mohou být rýhované nebo hladké a podle počtu válců rozlišujeme šrotovníky:

- dvouválcové,
- čtyřválcové,
- šestiválcové.

Práce šrotovníku má být systematicky kontrolována. Proto je pod každým párem válců zařízení pro odběr vzorku. Odebraný vzorek šrotu o hmotnosti 150 až 200 g se vytřídí na Pfungstädtském prosévači s pěti normalizovanými sítí. Optimálnímu složení šrotu z dobře rozluštěného sladu odpovídají pro scezovací kád' tyto podíly:

- pluchy 15 – 18 %
- hrubá krupice 18 – 22 %
- jemná krupice 30 – 35 %
- mouka 25 – 35 %.

1.2.2 Vystírání

Při vystírání se smíchává sladový šrot, příp. náhražky s vodou při předepsané teplotě a voda používaná na přípravu vystírky se označuje jako nálev. Pro světlá piva se používá řidší vystírka 3,5 – 4 hl na 100 kg sladu a pro tmavá piva se volí hustší vystírka 3 – 3,5 hl na 100 kg sladu. Teplota vystírací vody se volí podle kvality sladu a postupu rmutování.

Dle teploty vystírací vody rozlišujeme:

- 1) Studené vystírání – teplota vody je nižší než 20 °C. Na závěr se přidá k vystírce horká voda, aby se teplota vystírky zvýšila na 35 – 38 °C. Pro špatně rozluštěné slady se teplota zvýší až na 50 – 52 °C.
- 2) Horké vystírání – voda na vystírku má teplotu 55 – 60 °C, používá se pro vysoce enzymatické nebo přelouštěné slady. Minimálně se zde štěpí bílkoviny a dosáhne se plnější chuti a lepší pěnivosti piva.

Převážně se vystírá při teplotě 33 – 37 °C, což je optimální teplota pro zvýšení kyselosti (kyselinotvorná). Doba vystírání bývá cca 10 – 30 minut.

Prakticky se smíchávání sladového šrotu s vodou provádí ve vystírací kád' opatřené míchadlem. Ve vstupním vystěracím potrubí je umístěno vystěradlo, ve kterém dochází k dávkování sladu s vodou.

1.2.3 Rmutování

Cílem rmutování je štěpení a převedení optimálního podílu extraktu sladu do roztoku s potřebným zastoupením látek zásadních pro další technologické zpracování tedy především zkvasitelných cukrů. Při štěpení extraktu jsou aktivovány amylolytické, proteolytické, kyselinotvorné i oxidačně-redukční sladové enzymy[1]. Rmutováním vlastně pokračují

aktivně enzymatické procesy započaté v průběhu sladování ječného zrna, avšak s podstatně vyšší intenzitou a rychlostí štěpných reakcí s ohledem na působení teplot a prostředí vodného roztoku. Nejdůležitější reakcí, která při rmutování probíhá je štěpení škrobu na nízkomolekulární cukry, zejména glukosu, maltosu a dextriny.

Štěpení škrobu probíhá ve třech stupních:

- a) boplnání a mazovatění škrobu při teplotách 55 – 60 °C
- b) ztekucení škrobu, při němž se štěpením uvolňují dextriny a z mazu se stává tekutý škrob činností α -amylas
- c) zcukření s úplným rozštěpením ztekuceného škrobu na maltosu probíhá činností α - i β -amylas.

Doba potřebná k optimálnímu zcukření závisí na kvalitě dodaného sladu především stupni rozluštění zrna[8].

Při rmutování je také důležité štěpení vysokomolekulárních bílkovin. Bílkoviny jsou sice potřebné pro správnou pěnivost piva a také pro plnost chuti. Aminokyseliny jsou důležité při kvašení piva. Z hlediska stability a trvanlivosti piva je však jejich štěpení rmutovacím procesem zásadní, aby jejich obsah v mladině nebyl příliš vysoký. Štěpení bílkovin probíhá aktivací proteolytických enzymů při teplotách okolo 50 °C[7].

Rmutování probíhá postupným zahříváním vystřené díla na rmutovací teploty, při kterých probíhá štěpení jednotlivých složek sladu, a následným povařováním rmutů dle příslušného rmutovacího způsobu. Technologické teploty optimální pro aktivaci jednotlivých skupin enzymů se podle příslušných skupin také označují[4]:

35 – 38 °C - kyselinotvorná

48 – 52 °C - peptonizační

60 – 65 °C - nižší cukrotvorná

70 – 75 °C - vyšší cukrotvorná

76 – 78 °C - odrmutovací teplota.

Podle způsobu vyhřívání se používají dvě základní rmutovací strategie tedy infuzní a dekokční postup. V některých případech se může použít i rozšířené varianty dekokčního způsobu např. třírmutový postup, nebo různé další modifikace základních postupů jako je zkrácený dvourmutový postup či rmutování skokem[1, 3].

1.2.3.1 Infuzní rmutování

Při infuzním rmutování se postupně zahřívá celý objem vystřeného díla bez rozdělování rmutu na více podílů a jedná se tedy o jednorumtový postup. Začíná se vystřením při teplotě 35 – 37 °C a výdrží na této teplotě (jednotlivé výdrže na technologicky důležitých teplotách se volí podle použité receptury, kvality sladu, intenzity rmutování v řádech desítek minut), poté se celé dílo zahřeje na teplotu 52 °C. Po výdrži se rmut zahřívá na 62 °C, následuje opět výdrž na této teplotě, delší než u teplot předchozích. Při zahřátí na vyšší cukrotrnou teplotu tedy na 72 °C je prodleva také delší oproti nižším rmutovacím teplotám. Po výdrži na této teplotě se provede kontrola zcukření jodovou zkouškou a celé dílo se zahřeje na závěrečnou odrmutovací teplotu 78 °C, kterou rmutovací proces končí. Tímto postupem nedochází k povařování rmutu a dosahuje se světlejší barvy a chuť piva je méně výrazná[3].

1.2.3.2 Dekokční rmutování

Dekokční způsob je charakteristický povařováním dílčích částí rmutovaného díla. Při dvourmutovém postupu se vystírá celý objem rmutu při teplotě 35 – 38 °C a po krátké prodlevě se celé dílo zapařuje na 52°C. Opět po krátké výdrži se pak dílo rozdělí na dva dílčí rmuty a první hustý rmut (asi 1/3 podílu celkového objemu) se postupně zahřívá na jednotlivé rmutovací teploty. Po zcukření (a její kontrole) se první rmut zahřeje do varu. Již před ukončením varu prvního rmutu se rozmíchává zbylý podíl ve druhé rmutovací pánvi, aby se po jeho následném smíchání s povařeným rmutem zvýšila teplota na 62 – 65 °C. Rmutovací proces poté pokračuje oddělením druhého řidšího rmutu. Ten se zahřeje na 72 °C a ponechá prodleva do úplného zcukření. Následuje opět zahřívání k varu a povaření tohoto podílu rmutu. Po ukončení varu druhého rmutu se tento za stálého míchání přečerpá k zbylému podílu. Smícháním obou podílů rmutu se teplota odrmutovaného díla ustálí na 78 °C a tím rmutování končí.

Klasický dvourmutový dekokční postup je nejvíce používán u světlých piv plzeňského typu a povařováním části vystírky piva získávají výraznější chuť[5].

1.2.4 Scezování a vyslazování mláta

Zcukřený rmut obsahuje roztok extraktu, který se označuje jako sladina a nerozpustné zbytky sladu nazývané mláto. Je tvořeno sladovými pluchami, střelkami a nerozpustnými bílkovinami. Pro výrobu piva se používá jen sladina, která se musí co nejdokonaleji oddělit

od mláta, což je cílem scezování. Následné vyslazování je vyloužení zbylého extraktu z mláta vyslazovací vodou[10]. Scezování je fyzikální proces a jedná se o filtraci. Je ovlivněno kvalitou sladu, složením sladového šrotu, intenzitou rmutování, vlastnostmi sladiny (teplotou a viskozitou), výškou vrstvy mláta. Hlavní podíl extraktu se získá tzv. stahováním předku (tj. s využitím filtrační vrstvy mláta oddělení hlavního podílu v suspenzi zadržené sladiny). Při jeho získávání probíhá ještě zcukřování α -amylasou u škrobu obsaženém v předku. Po získání předku následuje vyslazování mláta a získané podíly se označují jako výstřelky. Teplota vyslazovací vody se pohybuje kolem 75 – 78 °C, neměla by překročit 80 °C, aby nedošlo k inaktivaci α -amylázy. Provzdušnění předku a výstřelků by mělo být co nejmenší a sladina i výstřelky mají odtékat čiré. Předek by měl mít koncentraci extraktu o 3–5% hm. vyšší než je vyráběné pivo. Vyslazování se ukončí, když se dosáhne požadované koncentrace díla pohromadě, a nebo se vyslazuje maximálně do 0,5 % hm. extraktu v posledním výstřelku.

Nejpoužívanějším scezovacím zařízením je scezovací kád'. Jedná se o válcovou nádobu s plochým dnem a párníkem. Scezovací kád' má dvojité dno, vrchní děrované a spodní hladké. Ke spodnímu dnu je připojen systém scezovacích trubek, které ústí do hlavní trubky, ze které je scezovaná sladina odváděna čerpadlem. Vrstva mláta ve scezovací kádi se pohybuje okolo 20 – 40 cm pro dosažení optimálního filtračního účinku. Dále je scezovací kád' opatřena kypřidlem, které se skládá ze 2 – 8 ramen se svislými noži sloužícími na prořez mláta. Zároveň je kypřidlo vybaveno i opačným, rychlejším chodem a vyhrnovacími lištami, čehož se využívá k výhozu mláta po ukončení scezování[3].

1.2.5 Chmelovar

Při chmelovaru probíhá povařování sladiny s chmelem či chmelovými výrobky a výsledným produktem je horká mladina[5]. Během tohoto procesu dochází k vysrážení vysokomolekulárních látek, především bílkovin. Dále se zde zkoncentrovává mladina odpařením vody, dochází také ke sterilaci inaktivací mikroorganismů a hlavně převedení hořkých látek chmele do roztoku a tím dosažení požadované hořkosti piva.

Koagulace bílkovin je jedním z nejdůležitějších dějů při chmelovaru. Svým čířícím efektem výrazně ovlivňuje následnou chuť a koloidní stabilitu piva. Tento děj probíhá ve dvou stupních. V prvním stupni dochází k dehydrataci bílkovin a denaturované částice přejdou do labilní neuspořádané koloidní formy. Ve druhém stupni nastává samotná koagulace a vylučování nejprve jako jemné vločky, později hrubší kal označovaný jako lom mladiny.

ny[1]. Při nedokonalém lomu mladina obsahuje hodně vysokomolekulárních sloučenin a u piva se tvoří zákaly a získává bílkovinnou hořkost. Lom probíhá tím lépe, čím stálější a intenzivnější je var. Hotová mladina má být čirá s velkými dobře ohraničenými vločkami, což potvrzuje správný průběh chmelovaru[5].

Odpar vody při chmelovaru je asi 6 – 10 % objemu mladiny za hodinu. Dosahuje se tím požadované stupňovitosti mladiny a odstranění vyslazovací vody. Odpařováním se zvyšuje koncentrace extraktu.

Provařováním mladiny dochází rovněž k inhibici mikroorganismů (obvykle během 15 minut při pH 5,4 – 5,8. Také jsou inaktivovány zbylé aktivní enzymy.

V průběhu varu se barva mladiny mírně zvyšuje a dochází také k tvorbě melanoidinů. Vlivem melanoidinů a chmelových kyselin se také zvyšuje kyselost z pH 5,8 na pH 5,5.

Rozpuštěním a izomerací hořkých látek chmele je mladině dodána příslušná hořkost a aroma. Při chmelovaru je izomerováno 40 – 60 % α -hořkých kyselin a 5 – 15 % zůstává v původní formě.

Mladina se udržuje v intenzivním varu optimálně 80 – 110 minut, dle typu piva. Doba varu nemá být delší, jinak dochází k nepříznivému vlivu na lom. Hrubý lom se převaží, stane se jemně vločkovitý, mladina se zchladí a lom se těžko odstraňuje. Var by neměl začínat, dokud není dílo pohromadě.

Chmelení je dnes nejčastější ve formě chmelových granulátů a hojně se využívá i chmelový extrakt. Chmel se dávkuje do extraktorů umístěných vedle mladinové pánve a chmelí se většinou na třikrát. Do prvního extraktoru se předchystává chmelový extrakt a dávkuje se do várky asi 10 minut po zahájení varu. Granulovaný chmel se dává do várky ve druhém a třetím chmelení. Druhé dávkování chmele je optimální 50 – 60 minut před koncem varu, třetí pak 10 – 30 minut před koncem varu.

Po ukončení chmelovaru se provádí čerpání horké mladiny – tzv. vyrážení mladiny do připravené vířivé kádě.

1.2.6 Odloučení hrubých kalů a chlazení mladiny

Při chlazení dochází k odstranění hrubých a jemných kalů z mladiny. Probíhá vychlazení mladiny na zákvasnou teplotu a také její provzdušnění.

Při separaci kalů se odstraňuje hrubý kal (označovaný jako horký kal), jedná se vlastně o lom mladiny, který vznikl vysrážením bílkovin při chmelovaru. Hrubý kal obsahuje zejména bílkoviny a také polyfenoly, hořké látky. Hrubý kal se odstraňuje, aby nezanášel povrch kvasinek a nezpůsobil tak hrubou hořkost piva. Přítomnost kalů také zhoršuje pěni-
vost piva[3]. Velikost kalových částic je 30 – 80 μm . Lom je těžší než mladina, dobře se usazuje a nejsou problémy s jeho odstraněním.

K oddělování kalů se používá vířivá kád'. Jedná se o válcovou nádobu s kónickým dnem. Mladina je do kádě přiváděna tangenciálně trubkou umístěnou přibližně ve třetině výšky kádě. V kádi probíhá sedimentace hrubých kalů ve tvaru plochého kuželu při stálé rotaci mladiny. Po vyčeření a usazení kalů se mladina při spílání stahuje výpustěmi umístěnými 0,30 – 0,50 m nad dnem kádě a otvorem ve dně u stěny kádě. Po sespílání mladiny se kal vystříká vodou[8].

Po odstranění kalů ve vířivé kádi následuje chlazení mladiny před zakvašením. Mladina odcházející z vířivé kádě má teplotu 90 – 95°C a k jejímu zchlazení na zákvasnou teplotu 6 – 10°C se používají převážně deskové chladiče. Deskové chladiče jsou konstruovány z profilovaných desek z nerez oceli, mezi nimiž proudí střídavě a protiproudě v tenké vrstvě chladicího médium (ledová voda, solanka, ethylenglykol) a mladina[3].

Důležitá je i absorpce kyslíku při procesu chlazení, tedy provzdušnění mladiny, které nejintenzivněji probíhá při teplotách pod 40°C. Nasycení mladiny kyslíkem je důležité pro pomnožení kvasinek a pro dosažení požadovaného stupně prokvašení piva. Absorpce je podporována nízkou teplotou, pohybem mladiny a zároveň se mladina sytí přívodem vzduchu do potrubí. Pro správný průběh kvašení by měla mladina obsahovat 6 – 8 mg.l^{-1} absorbovaného kyslíku.

1.3 Kvašení mladiny a dokvašování piva

Fermentační proces při výrobě piva probíhá ve dvou stupních. Prvním stupněm je hlavní kvašení mladiny, jež probíhá v prostorách spilek, či moderních kvasíren. Následuje druhá fáze fermentace a tou je dokvašování a zrání piva, které je realizováno v prostorách ležáckých sklepů[1]. Při kvašení dochází k převedení extraktivních látek na alkohol a oxid uhličitý. Tento krok je realizován za pomoci mikroorganismů pivovarských kvasinek, které se pomnoží v řízeném procesu na potřebnou koncentraci a zkvasí podstatnou část využitelné-

ho extraktu. Kvasný proces ovlivňuje také chuťový charakter vznikajícího piva, zejména hlavními produkty kvašení, ale také obsahem vyšších alkoholů, esterů, ketonů, aldehydů, sloučenin síry aj[1, 5, 12].

1.3.1 Pivovarské kvasinky

Pro pivovarské účely se používají v zásadě dva druhy mikroorganismů procesu kvašení – kvasinky spodního a svrchního kvašení. Taxonomicky můžeme kvasinky vymezit jako mikroorganismy z říše *Fungi*, třídy *Ascomycetes*, čeledi *Saccharomycetaceae*.

Svrchní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* se používají pro výrobu piv typů „ale“, „porter“, „stout“ a také třeba pro piva pšeničná[5]. Optimální teplotní rozmezí je 18 až 22 °C a kvasnice jsou při kvašení většinou vynášeny do kvasničné deky[1].

Kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis* jsou používány pro výrobu piva typu ležáků[1]. Optimální teplota pro vitalitu kvasinek je 6 až 12 °C. Během kvašení kvasinky sedimentují, styk s kvasícím médiem je méně dokonalý a kvašení probíhá pomaleji. Po prokvašení kvasinky tvoří na dně kvasné kádě tuhou sedimentinu.

Příprava čisté pivovarské kultury násadních kvasnic probíhá při procesu propagace v laboratoři a následně v provozních podmínkách propagační stanice. Provozní propagace spočívá v pomnožení laboratorní kvasničné kultury za aseptických podmínek tak, aby získaný objem postačoval k zakvašení příslušné výrobní jednotky. Kvasnice se propagují v provozní mladině, která je napuštěná do vyčištěného a propařeného propagátoru. Zde je mladina nejprve sterilována 30 minut při teplotě přesahující 90 °C a následně zchlazována na zákvasnou očkovací teplotu pod 10 °C. Maximální teploty kvašení jsou většinou o několik stupňů vyšší než provozní teploty (běžně 14 až 16 °C). Při propagaci je kvasící mladina provzdušňována sterilním vzduchem. Po ukončení propagace je namnožená kultura, označovaná jako „kroužky“, převáděna do provozu při zakvašování spílané mladiny. Bezprostředně po vyprázdnění, stejně jako před napuštěním, musí být propagátor vysanitován, aby se zamezilo jakékoliv případné kontaminaci[1, 5].

1.3.2 Hlavní kvašení

Během hlavního kvašení se kvasničná násada pomnoží 3 – 4 krát. Při procesu kvašení jsou zkvasitelné sacharidy (glukosa, maltosa a maltotriosa) přeměněny na ethanol a oxid uhličitý anaerobním kvašením[4].



V průběhu hlavního kvašení ovlivňuje tento proces řada rozhodujících faktorů. Teplota je důležitá při regulaci kvašení[1]. Pro spodní kvašení je uplatňováno v tradiční technologii studené vedení při optimálních teplotách 5 – 10 °C, a nebo teplé vedení s teplotním opti- mem 12 – 16 °C. Při svrchním kvašení se teploty pohybují mezi 15 – 22 °C.

Na průběh kvašení i kvalitu piva má vliv také druh a dávka kvasnic. Ze začátku se nasazuje nová čerstvě vypropagovaná kultura, která se používá opakovaně, může se použít 5 až 6 krát a pak se opět zakváší novou čistou kulturou. Dávkuje se zpravidla 0,5 l hustých kvas- nic na 1 hl mladiny. Vyšší dávkou se dosahuje rychlejší a hlubší prokvašení.

Kvašení ovlivňuje i složení mladiny. Základem je dostatek zkvasitelného extraktu. Extrakt je z 90 % tvořen sacharidy, nejdůležitějším sacharidem bývá maltosa. Dále jsou zde za- stoupeny dusíkaté látky, minerální látky – vápník, hořčík. Nevhodný je zvýšený obsah du- sičnanů, dusitanů, které mohou inhibovat metabolismus kvasinek, dále kalících a viskóz- ních látek (kvašení kalných mladin může mít vliv na organoleptické vlastnosti piva - látky způsobující tzv.starou chuť piva).

Dalším z důležitých faktorů je nasycení mladiny kyslíkem. Kyslík je důležitý pro pomno- žení kvasinek. Optimální koncentrace rozpuštěného kyslíku v zakvášené mladině je 5 až 8 mg.l⁻¹. Při trvalém nedostatku kyslíku v mladině se mění fyziologické a technologické vlastnosti kvasinek a zhoršuje se výtěžnost.

Podle vizuálních projevů můžeme v klasické technologii rozlišit několik stádií hlavního kvašení:

1. Zprašování – nastává asi tak 12 - 24 hodin po přidavku kvasnic. Od stěn se začíná tvořit bílá jemná pěna. Extrakt mladiny mírně klesá a teplota mladiny mírně stou- pá. Pěna se hromadí při okrajích kádě a rozprostírá se pak po celém povrchu.
2. Stádium nízkých bílých kroužků – bílé růžice pěny se vytváří na povrchu kvasící mladiny. Tato fáze začíná 24 – 36 hodin po naplnění kádě. Probíhá maximální vý- voj CO₂, pH klesá z 5,6 asi na 4,9 a extrakt klesá o 0,8 – 1%. Vytváří se postupně hustá bílá pěna.
3. Stádium vysokých hnědých kroužků – třetí až pátý den kvašení se kroužky pěny zbarvují do hněda kaly vystupujícími z kvasícího média[1]. Vysoká intenzita kva- šení s úbytkem extraktu o 1 až 1,8% za 24 h vykazuje i pokles hodnoty pH na 4,5. Teplota rychle stoupá a během této fáze je dosažená její maximální hodnota během

kvašení 8 – 12 °C. Tato teplota je udržována po dobu dvou dní a pak následuje řízené zchlazování[5].

4. Propadání deky – dochází k propadu hnědé pěny do prokvašeného piva. Pěna obsahuje chmelové pryskyřice, polyfenoly, vysokomolekulární dusíkaté látky, mrtvé kvasinky. Pěna se odstraňuje (sbírání deky), aby pivo nezískalo jejím propadnutím vysokou nepříjemnou hořkost.

Prokvašená mladina se označuje jako mladé pivo. Musí obsahovat přiměřené množství zkvasitelných látek, aby dokvašování bylo dostatečně živé a vytvořilo se potřebné množství CO₂.

1.3.3 Dokvašování a zrání piva

Dokvašování a zrání mladého piva je realizováno v prostorách ležáckého sklepa, kde v pivu pomalu zkvašuje zbylý extrakt při nízkých teplotách 1 až 3 °C. Pivo se číří, zraje a sytí se pod tlakem vznikajícího oxidu uhličitého v uzavřených ležáckých tancích[6]. Mladé pivo má obsah CO₂ kolem 0,2 % hm. a konečný obsah CO₂ ve zralém pivu je 0,5 % hm. Pivo zráním získává požadované organoleptické vlastnosti a prodlužuje se zároveň jeho stabilita.

Ležácké sklepy jsou situovány většinou v podzemních částech pivovaru, ale mohou se dnes realizovat, díky efektivním systémům chlazení a izolace, i v nadzemních pozicích. Ležácké tanky jsou konstruovány jako válcovité tlakové nádoby s klenutými dny. Jsou ocelové opatřené vnitřním ochranným nátěrem inertním vůči pivu (úponovány) a nebo z nerez oceli. Bývají uloženy horizontálně ve dvou řadách nad sebou. K chlazení sklepních prostor se využívá soustava trubek umístěných na stěnách nebo stropěch, chladí se solankou nebo ledovou vodou. Vnitřním chlazením jsou opatřeny i nádoby.

Sudovací teplota se pohybuje kolem 5 °C a v průběhu dokvašení probíhá pozvolný pokles teplot na 2 – 0 °C. Pokles musí být pozvolný z důvodu zabránění chladovému šoku kvasinek. Optimální je snížení o 1 °C za 1 den. Postupně zkvašuje i zbylý extrakt – nejrychlejší prokvašování je první 3 dny v důsledku promíchání a provzdušnění piva při sudování. Čířící efekt při dokvašování závisí na teplotě (čím je vyšší teplota tím delší je doba číření), množství kalů v pivě, na velikosti nádob a době dokvašování. Při dokvašování probíhá také zrání chutě a vůně. Je spojováno jednak s mechanickými ale i chemickými změnami v pivě. Mezi mechanické změny můžeme zařadit sedání kalů, adsorpce bílkovin, sedimentující kvasnice, usazování polyfenolů a bílkovin. Z chemických změn je to úprava koncentrace

SO₂, thiolů, acetaldehydu, vyšších alkoholů a esterů. Sycení piva CO₂ závisí na tlaku a teplotě, čím je nižší teplota a vyšší tlak, tím je v pivu větší sycení CO₂ a také jeho fixace. Během prvních 14 dnů se pivo nasytí CO₂ na koncentraci 0,4 – 0,45 % hm. a další doba ležení je potřeba pro jeho fixaci[1]. Zadržovaný CO₂ dodává pivu plnost a říz. Může docházet i k přepěňování piva, projevuje se při nadměrném sycení piva CO₂. Kontaminace piva nebo zvýšený podíl kovových iontů v pivu ruší vazbu CO₂ v pivu a nedochází k jeho fixaci.

Doba dokvašování a zrání piva závisí na množství kvasnic, množství zkvasitelného extraktu, na teplotě dokvašování a na typu vyráběného piva. Obecně je doporučováno pro výrobu výčepních piv 21 dnů, u ležáků a speciálních piv 70 dnů avšak postupy zvyšování hradícího tlaku a doba dokvašování jsou v jednotlivých pivovarech rozdílné i s ohledem na obchodně technickou a sezónní návaznost[1, 5].

1.4 Filtrace a závěrečné úpravy piva

Dokonale vyztřelé pivo se pro zlepšení organoleptických vlastností, zejména vzhledu, a pro zvýšení doby své trvanlivosti ve standardní jakosti podrobuje závěrečným úpravám celého technologického procesu. Mezi tyto operace zařazujeme zejména filtraci a pak také účinnou stabilizaci a pasteraci piva[6].

1.4.1 Filtrace piva

Cílem filtrace je odstranění kalických částic a dosažení požadované čirosti, dále pak zvýšení biologické a koloidní trvanlivosti piva. Při filtraci se využívá průtoku přes porézní filtrační přepážku. V technologii filtrace se uplatňují 3 fyzikální efekty:

- 1) Síťový efekt – je využíván při oddělování hrubých rozptýlených částic v pivu. Částice mají takovou velikost, že nemohou proniknout do filtrační přepážky a zachycují se na povrchu filtrační přepážky.
- 2) Efekt mechanického zachycení ve filtrační vrstvě – jemnější částice zůstávají uvnitř filtrační přepážky. Zachycení částic závisí na rozměrech těchto částic a na rozměrech pórů filtračního materiálu.
- 3) Adsorpční efekt – zachycení těch nejjemnějších částic uvnitř filtrační přepážky díky adsorpci k filtračnímu materiálu.

Filtračním postupem se z piva oddělují různé kalící koloidní částice především kvasinky, tříslovino-bílkovinné komplexy, chmelové pryskyřice, bílkoviny a třísloviny. Tyto částice můžeme podle velikosti rozdělit na 3 skupiny:

1. Hrubě disperzní podíly nebo hrubě rozpustné podíly – jsou to částice o velikosti 0,1 μm , označované jako mikroskopicky rozeznatelný zákal. Je tvořený kvasinkami, bakteriemi a tříslovino-bílkovinnými komplexy.
2. Koloidní částice – o velikosti 0,001 – 0,1 μm , kde můžeme zařadit bílkoviny. Zhoršují chemickou stabilitu piva, ovlivňují pěnivost a plnost chuti. Zařazují se zde i chmelové pryskyřice.
3. Částice molekulárně dispergované – jsou menší než 0,001 μm , nejsou detekovatelné mikroskopicky, za vyšších teplot jsou zcela rozpustné. Patří sem třísloviny, hořké polyfenolové sloučeniny.

Pro hrubou filtraci (tzv. předfiltraci) se většinou používají naplavovací filtry. Filtračním materiálem je křemelina naplavována na nosný element filtru a dále je po celou dobu filtrace dávkována do filtrovaného piva. Před zahájením filtrace se provádí náplav hrubou křemelinou smíchanou s vodou v cirkulačním okruhu. Vytvoří se vrstva asi 1,5 mm tlustá při dávkování křemeliny 700 – 800 g. m^{-2} . Druhý náplav se realizuje jemnou křemelinou, která je svým složením stejná jako ta, která je určena k dávkování v průběhu celé filtrace. Naplavuje se s vodou v cirkulačním okruhu a vytvoří se vrstva o tloušťce kolem 3 mm. Při dávkování v průběhu filtrace se používají speciální dávkovače křemeliny, které dávkují křemelinu do protékajícího piva na filtr. Nejčastěji se používá směs středně hrubé a jemné křemeliny.

Druhy filtrů pro hrubou filtraci:

Používají se sítové filtry – filtračním článkem je jemné drátové síto. Síta jsou umístěna za sebou v tlakové nádobě z nerez oceli, filtrát stéká sběrným kanálem v rámu nebo centrálním dutým hřídelem. Podle umístění sít mohou být vertikální nebo horizontální. Síta jsou vyrobeny z nerez oceli o velikosti pórů 70 – 80 μm [15].

Svíčkové filtry – ve filtru jsou umístěny svislé svíčky, které jsou tvořeny nosnou perforovanou trubkou asi 2 m dlouhou, na které je navinut profilovaný drát. Velikost štěrbin mezi dráty bývá 50 μm . Svíčky jsou zasazeny do rámu ve víku a umožňují odtok filtrátu z rámu.

Pro tzv. ostrou filtraci (dofiltraci) se používají deskové filtry s EK sterilními deskami (EK z německého Entkeimung=odzárodkovací, mají umožnit získat pivo bez mikrobiálních zárodků) nebo membránové filtry (ultrafiltry). Separční mechanismus při membránové filtraci využívá fyzikálně-chemické interakce mezi membránou a kapalinou, difuzi, dialýzu, adsorpci, iontové rovnováhy i prosté mechanické oddělování částic. Při ultrafiltraci je velikost pórů v membráně 3 až 50 nm a nejmenší zachycované látky v retentátě jsou makromolekuly a organické látky, zachycují se zde rovněž mikroorganismy, koloidy a zákal[1].

Jako filtrační materiál pro ostrou filtraci se používají estery celulózy nebo keramické materiály.

1.4.2 Stabilizace piva

Každý pivovar musí garantovat po dobu trvanlivosti piva biologickou, koloidní a chuťovou stabilitu. Hlavním cílem stabilizace je snížení náchylnosti piva k tvorbě koloidních zákalů, k organoleptickým změnám a přítomnosti mikroorganismů.

Pivo je koloidní roztok a mohou se v něm vytvářet různé typy zákalů:

- Chladový zákal – tvoří se při náhlém ochlazení piva na 0 °C a lze jej odstranit zahřátím na 20 °C. Dojde tím k rozpuštění koloidních částic, kterými bývají bílkoviny a polyfenoly.
- Stálý zákal piva – je nerozpustný i po zahřátí na 20 °C a rozpouští se až při teplotách 40 – 70 °C. Zákal tvoří částice větší než u chladového zákalu a vznikají vzájemnou reakcí bílkoviny – fenolových komplexů[5].
- Polysacharidový zákal – vzniká vysrážením cukrů následkem špatného rozštěpení škrobu. Bývá tvořen gumovitými látkami.
- Kovový zákal – bývá způsoben vyšším obsahem kovových iontů v pivu, zejména ionty železa, zinku a mědi. Dostávají se do piva z korodujícího zařízení a z pomocných materiálů.
- Křemičitanové zákaly – objevují se po úpravě stabilizačními prostředky, kdy se zvyšují podíly křemičitanů v pivě.
- Zákaly způsobené nárazy teplot – vznikají po zmrznutí a tání piva a jsou způsobené látkami polysacharidické povahy[1].

K odstranění stálého kalu způsobeného bílkovinami, polyfenoly a kyslíkem se používají stabilizační prostředky srážející nebo adsorbující látky bílkovinné povahy.

Mezi srážející prostředky můžeme zařadit tanin, který se používá při sudování piva v dávce $2 - 7 \text{ g. hl}^{-1}$ a pokud je dávka vyšší než 3 g. hl^{-1} zařazuje se mezifiltrace po 6 – 10 dnech, kterou se sníží obsah bílkovinných látek o 5 – 15 %.

Z adsorbujících přípravků se může použít bentonit. Přidává se do ležáckých tanků asi týden před stáčením v dávce $100 - 250 \text{ g. hl}^{-1}$. Dále silikagel, který se nejčastěji dávkuje společně s filtrační křemelinou při filtraci v množství $100 - 200 \text{ g. hl}^{-1}$. Snižuje obsah dusíkatých látek o 8 – 12 %.

Pro adsorpci polyfenolových látek se může použít PVPP (polyvinylpyrrolidon). Používá se s křemelinou při filtraci v dávce $20 - 50 \text{ g. hl}^{-1}$ nebo je součástí filtračních desek nebo se používá jako samostatný náplavový filtrační materiál místo křemeliny. Je regenerovatelný horkým roztokem NaOH.

1.4.3 Pasterace piva

Je ošetření a stabilizace piva z mikrobiálního hlediska a má zajistit dlouhodobou trvanlivost piva. V praxi se používá několik technologických variant pasterace piva[1].

Pasterace ostrou filtrací – provádí se EK filtry nebo se mohou použít i membránové filtry. Po ostré filtraci následuje vždy aseptické balení. Podmínkou použití této metody je dokonalá předfiltrace. Tento způsob je označován jako studená pasterace.

Průtoková pasterace – je to pasterace teplem. Používají se deskové průtokové pastéry. Jsou složeny z nerezových rýhovaných desek, v rozích jsou otvory pro potrubí a desky jsou sevrány mezi čela pastery zavěšené na nosných tyčích. Vytváří se navzájem oddělené prostory piva a teplotně izolované látky. Při průtokové pasteraci můžeme rozlišit 3 základní sekce:

- předeřívací sekce – pivo vstupující do pastery se ohřívá zahřátým pivem z pasterizační sekce, čímž se současně již zpasterované pivo ochlazuje[5]
- pasterizační sekce – pivo se ohřívá horkou vodou o teplotě $68 - 74 \text{ }^\circ\text{C}$ a pasterace trvá 30 – 40 sekund
- dochlazovací sekce – pivo se dochlazuje buď ledovou chlazenou vodou nebo solankou.

Vstupující pivo prochází první a druhou sekcí, pak jde zpět do první a potom do třetí sekce.

Pasterace lahvového piva – probíhá v tunelových sprchových pastérech. Tunelové pastéry bývají zařazovány za monoblok (plnič a zavírač lahví). Pastér je tvořený tunelem, kterým prochází pásový dopravník a umožňuje průchod lahví. Pasterační zařízení tohoto typu je rozděleno na několik zón, které tvoří základní sekce:

- 2 – 3 zóny vyhřívací sekce
- zóna pasterační
- 2 – 3 zóny chladící

Každá zóna bývá tvořena samostatným okruhem. Zóny jsou tvořeny jako ochrana před praskáním lahví v důsledku tepelného šoku. Vyhřátí celého objemu kapaliny v lahvi trvá zpravidla kolem 30 minut a udržuje se teplota 58 – 63 °C. Poté se obsah lahví chladí a celá pasterace trvá 1,5 – 2 hodiny.

2 PIVO SPECIÁLNÍ, NEALKOHOLICKÉ A PŠENIČNÉ

Výroba těchto skupin pív je z českého pohledu sice menšinová ve srovnání s produkcí klasických ležáků a výčepních pív, ale pro určitý okruh spotřebitelů a ke speciálním účelům mají tato piva své místo ve výrobním portfoliu tuzemských pivovarů.

2.1 Speciální pivo

Speciální pivo je podle platné legislativy produktem vyrobeným převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 13 hmotnostních procent a vyšším[50]. Tato piva mohou být vyráběna (stejně jako výčepní i ležáky) jako piva světlá, tmavá, polotmavá, případně řezaná[5].

Technologické odlišnosti od výroby běžných výčepních pív a ležáků jsou dány použitou recepturou (např. větší sypání a vyšší objem vystírky, úpravy rmutování-vynechávání některých teplot a úpravy časových prodlev na jednotlivých teplotách, delší doba hlavního kvašení a dokvašování piva). V základních výrobních krocích se však shodují s uvedenými skupinami, mají ovšem vysoký extrakt původní mladiny a hotové pivo má i vyšší obsah alkoholu než klasický ležák (ležáky 4,0 – 4,8 % obj., speciální piva > 4,8 % obj.).

Pivovary vyrábí speciální piva při různých příležitostech jako výroční speciály, při příležitosti výročí založení pivovaru, nebo pro různé soutěže, kde je hodnocená kategorie speciálních pív, či ke speciálním marketingovým účelům v podobě pivních novinek na různých propagačních akcích apod. V případě úspěšného zavedení některé značky se mohou tato speciální piva stát pravidelným doplněním běžného sortimentu vařených pív daného pivovaru.

Mohou to být např. světlá speciální piva s přídavkem medu během výroby. Med se přidává během přípravy mladiny na konci chmelovaru nebo až za studena v množství 0,6 – 1 % hm. I přes tento relativně malý přídavek med pivo zjemňuje a činí jej i chuťově bohatším.

2.2 Nealkoholické pivo

Výroba piva bez alkoholu (nebo jen s min. množstvím alkoholu) má několik důvodů:

- zajištění růstu výroby pomocí nových piv v oblastech, kde je trh nasycen a nelze předpokládat nárůst výroby běžných značek
- umožnění pití piva jako osvěžujícího nápoje ve fyzicky náročných profesích (sklářství, hutnictví, hornictví apod.)
- možnost pití piva pro řidiče
- u lidí nemocných, kteří nemohou konzumovat alkohol nabídnout nealkoholickou variantu oblíbeného nápoje
- možnost exportu piva do zemí, kde je konzumace alkoholu z politických či náboženských důvodů zakázána[54].

Nealkoholické pivo je v České republice legislativně vymezeno jako pivo s obsahem alkoholu nejvýše 0,5 objemového procenta (0,4 hmotnostního procenta)[50]. Způsobů přípravy nealkoholického piva je několik. Výrobní postupy je možno realizovat ve třech technologických variantách.

První možností je výroba tvořená recepturou omezující tvorbu alkoholu během výrobního procesu. Při přípravě nealkoholického piva úpravou technologie se využívají různé postupy:

- např. použití speciálních sladů s nízkou aktivitou β -amylasy a úpravy rmutovacího postupu,
- míchání piva s nezrzašenou sladinou nebo mladinou,
- oddělené zrzašení dvou mladin s různou koncentrací extraktu,
- zastavení nebo omezení kvašení

Druhou variantou je využití speciálních kvasinek či jiných mikroorganismů. Zde se využívají speciální postupy s použitím např. imobilizace kvasinek (regulace doby styku mladiny s kvasničním médiem) nebo geneticky modifikovaných kvasinek. Jako náhrada pivovarských kvasinek za jiné mikroorganismy se při přípravě nealkoholického piva může využít např. kmen *Saccharomyces ludwigii*, který zrzašuje glukózu, fruktózu a sacharózu, ale nezrzašuje maltózu a maltotriózu.

Třetí cestou je šetrné odstraňování alkoholu z piva. Technologické postupy založené na oddělování alkoholu z piva jsou sice energeticky a investičně náročnější, avšak z hlediska organoleptických vlastností se touto technologií dají vyrobit piva velmi podobná běžným pivům[1].

2.2.1 Výroba nealkoholického piva vakuovou destilací

Do skupiny výrobních postupů oddělujících alkohol z hotového piva patří např. vakuová destilace. Jedná se o dealkoholizační destilační proces za použití nízkých teplot. Teploty nepřekračují 30 až 45 °C, což minimálně ovlivňuje změnu barvy a chuti piva[1].

Jedním z nejnovějších progresivních systémů realizace vakuové destilace piva je zařízení vakuové destilační kolonové linky. Původní pivo (10 % EPM) je přiváděno do linky, kde se předeřívá na deskovém předeříváči na 38–40 °C. Dále je vedeno přes odlučovač CO₂ do horních pater destilační kolony odkud padá přes jednotlivá patra kolony do spodní části kde je umístěn vařák. Ve vařáku je pivo dále ohříváno kondenzátem na teplotu 44 – 45 °C. V destilační koloně dochází k postupnému odstraňování alkoholu z piva. Těkající alkoholové páry jsou vedeny přes separátor a kondenzátor lihových par do zásobních nádrží na líh. Dealkoholizované pivo je z přepadové části vařáku kontinuálně odčerpáváno a vedeno na deskový chladič, kde je zchlazeno na teplotu 3 °C. Pivo odcházející z linky má prakticky nulový obsah alkoholu (laboratorní zkoušky prokázaly obsah alkoholu 0,004 % obj.). Po zchlazení je pivo dosyceno oxidem uhličitým a plněno do přetlačného zásobního tanku. Pivo zbavené alkoholu se zfiltruje na křemelinovém filtru, pasteruje a plní do lahví[52].

2.3 Pšeničné pivo

Výroba pšeničného piva je hojně rozšířená např. v Belgii, Holandsku a také v Německu, kde má svou tradici (známé značky jako Kölsch, Weizenbier, Hefeweizen, Berliner Weisse aj.)[1]. U nás si pšeničné pivo také našlo a nachází své příznivce. Je netradičním doplněním v tuzemsku klasicky vyráběných piv.

Podle vyhlášky(č.335/1997sb.) je pšeničným pivem – pivo vyrobené s podílem extraktu z použitého pšeničného sladu vyšším než jedna třetina hmotnosti celkově dodaného extraktu[50].

V praxi se poměr pšeničného šrotu na celkovém sypání na várku pohybuje okolo 40–45 %. Příprava surovin na várku probíhá podobným způsobem jako u ostatních vyráběných piv. Pšeničný slad je distribuován většinou v pytlích po 50 příp. 25 kg. Nejprve se šrotuje pšeničný slad a následně se doplní zásobníky na sladový šrot sladem českým a přimílá se i malé množství karamelového sladu. Vystírání probíhá standardním způsobem při teplotě okolo 37 °C. Pšeničné pivo se rmutuje většinou infuzním jednormutovým postupem bez

povařování rmutu. Prodlevy na jednotlivých teplotách bývají delší a zajišťují tak dlouhodobější účinek působení enzymů na štěpený extrakt. Scezování sladiny i vyslazování mláta probíhá stejně jako u ostatních piv a také chmelovar má běžné parametry s mírnou úpravou chmelení, kdy se většinou vynechává dávkování chmelového extraktu a dávkuje se pouze granulovaný chmel většinou ve třech chmeleních. Zásadní technologický rozdíl při výrobě pšeničných piv je v hlavním kvašení. Pšeničné pivo je svrchně kvašeným typem piva a je tedy spíláno při vyšších teplotách (okolo 15 až 17 °C) a zakvašováno svrchními pivovarskými kvasinkami. Vedení hlavního kvašení probíhá také při vyšších teplotách v rozmezí 15 – 22 °C. Při kvasícím procesu jsou kvasinky vyplavovány do deky na hladinu kvasícího média na rozdíl od spodně kvašených piv, kde postupně sedimentují na dno kvasné kádě.

Některé studie prokázaly, že svrchní kvasinky výrazně přispívají k tvorbě typické chuti pšeničných svrchně kvašených piv (Madigan and McMurrough 1994, McMurrough and Madigan 1996). Specifickou chuť a vůni způsobuje 4-vinylguajakol, který vzniká tepelnou degradací nebo enzymovou dekarboxylací ferulové kyseliny, což je jedna z volných kyselin přítomných v ječném nebo pšeničném zrně, která může přecházet do sladiny [1, 53].

Dle smyslových požadavků na jakost by pšeničné pivo mělo být ve vzhledu čiré až slabě zakalené. Chuť a vůně piva by měla být sladová a chmelová, bez cizích vůní a příchutí s jemnou až výraznou hořkostí, s řízem vyvolaným CO₂. Přípustná je slabá příchut' a vůně ovocná až nakyslá [50].

3 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VÝSKYT V ALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH

Biogenní aminy můžeme chemicky vymezit jako organické látky, které vznikají především dekarboxylací aminokyselin[18]. Biogenní aminy v nízkých koncentracích jsou přirozenou složkou mnoha potravin. Jsou obsaženy v potravinách bohatých na proteiny. Spolu s peptidy přispívají těkavé aminy svým charakteristicky intenzivním aroma k vůni a chuti jídla[19, 20].

V této kapitole není cílem v textu popsat zevrubně výskyt biogenních aminů (BA) napříč jednotlivými druhy potravin, ale pouze nastínit význam sledování obsahů BA v jednotlivých skupinách potravin z důvodu jejich možného spolupůsobení po konzumaci různých potravin, které BA mohou potenciálně obsahovat ve zvýšeném množství.

Příliš vysoký obsah biogenních aminů v potravinách může naznačovat jejich kažení např. v rybách a mase během skladování (histamin, kadaverin, putrescin, tyramin). Vyšší množství biogenních aminů může být detekováno ve fermentovaných potravinách – alkoholických nápojích, trvanlivých salámech, kysaném zelí aj., kde vznikají probíhající mikrobiální činnosti[9, 21].

Přestože BA ovlivňují v organismu člověka různé fyziologické funkce, mohou při vyšším příjmu potravinami působit toxicky na organismus[18]. Nejznámější potravinová intoxikace způsobená BA je spojována s histaminem. Histamin vyvolává dilataci cév, což má za následek bolesti hlavy, arytmií, bušení srdce, kopřivku a svědění[18, 55]. Za běžných podmínek jsou exogenní aminy, které byly přijaty potravou rychle detoxikovány účinkem aminooxidáz. U alergických jedinců nebo v případě vysokého příjmu však je detoxikace narušena a BA se v organismu hromadí[18]. BA představují riziko také ve spojení s dalšími faktory, jako jsou léky – antidepressiva, alkohol[56]. Účinek histaminu a tyraminu může zvyšovat putrescin a kadaverin interakcí s aminooxidázami[22]. Zvýšený příjem tyraminu může způsobit hypertenzi, bolest hlavy a migrény[49].

Přestože zvýšený výskyt biogenních aminů v potravinách je spojován s negativními dopady na lidský organismus, legislativní limit je v EU stanoven Nařízením EP a Rady (ES) 2073 O mikrobiologických kritériích pro potraviny (2005) jen pro histamin, a to u produktů rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu. Legislativní limit je stanoven touto normou na $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

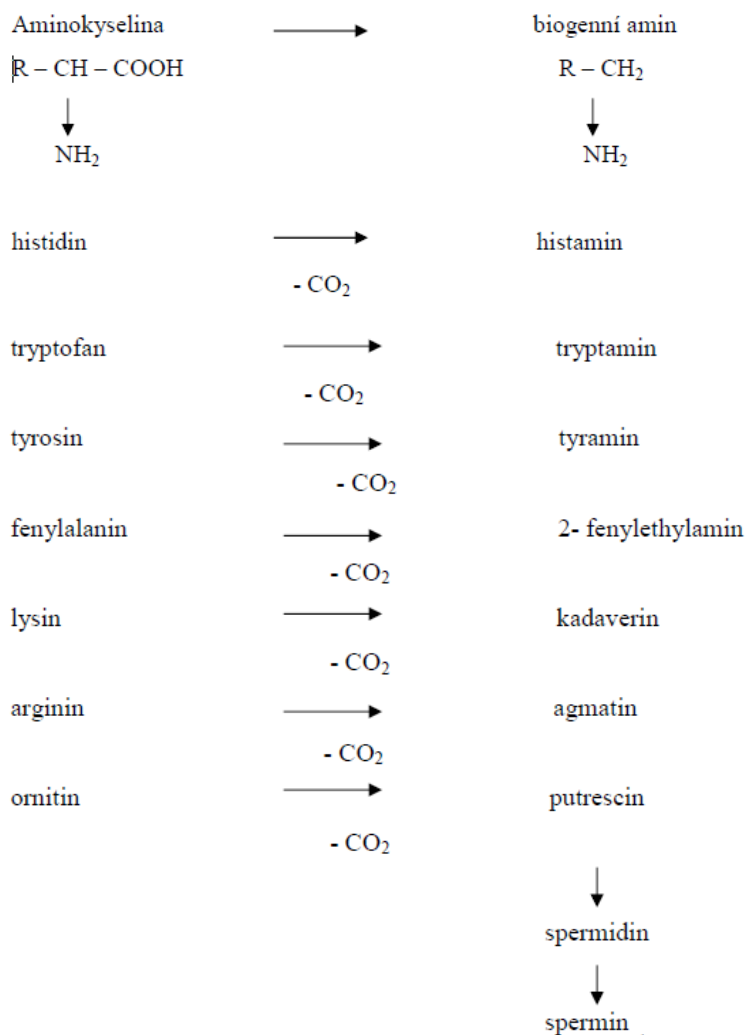
3.1 Vznik biogenních aminů

Proces dekarboxylace aminokyselin za vzniku biogenních aminů probíhá dvěma směry. Aktivitou endogenních dekarboxylačních enzymů, které jsou přirozeně obsaženy v potravinách, anebo působením exogenních enzymů, které jsou uvolňovány činností různých mikroorganismů. Dekarboxylace aminokyselin probíhá odštěpením karboxylové skupiny a vede ke vzniku odpovídajícího aminu[22].

Podle jejich chemické struktury můžeme biogenní aminy rozdělit na:

- aromatické – tyramin, fenylethylamin,
- heterocyklické – histamin, tryptamin,
- alifatické diaminy – putrescin, kadaverin,
- polyaminy – spermidin, spermin, agmatin[23].

Obr.č.1. : Schéma vzniku biogenních aminů z prekurzorů[23]:



Mezi různé faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů v potravinách, patří:

- množství dostupných aminokyselin a pyridoxal-fosfátu,
- množství a druhové zastoupení mikroorganismů,
- synergický efekt mezi mikroorganismy,
- pH,
- dodržování hygienických postupů během výroby,
- teplota skladování,
- přístup kyslíku[18, 24, 25, 26]

Množství dostupných aminokyselin ovlivňuje tvorbu biogenních aminů, protože představuje množství substrátu pro mikroorganismy s dekarboxylační aktivitou.

Význačná je přítomnost těchto mikroorganismů a skladovací podmínky umožňující jejich růst a množení[27].

Teplota má vliv na tvorbu biogenních aminů. S rostoucí teplotou skladování se zvyšuje obsah biogenních aminů. Přesto může mít vztah mezi teplotou a aktivitou různých mikroorganismů přítomných hlavně ve fermentovaných potravinách opačný účinek na tvorbu biogenních aminů. Tuto variabilitu ovlivňuje např. kinetika růstu, počet buněk nebo aktivita enzymů. Účinek teploty na aktivitu proteolytických a dekarboxylačních enzymů má rozhodující vliv na konečné množství biogenních aminů. Při vyšších teplotách probíhá proteolýza a dekarboxylace účinněji a tím dochází ke zvyšování obsahu biogenních aminů. Při teplotě 15 °C mohou bakteriální dekarboxylázy zůstat aktivní, přestože během skladování většina mikroorganismů dosáhla stacionární fáze růstu nebo fáze odumírání (nižší obsah biogenních aminů byl detekován u výrobků skladovaných při teplotě 4 °C než při teplotě 15 °C)[26, 28]. Pro tvorbu histaminu a tyraminu např. v sýrech je optimální pH = 5,0. U mořských ryb je optimum pro histamin nižší pH = 4,0. Při výrobě fermentovaných salámů ovlivňuje přídavek sacharidů produkci biogenních aminů, protože podporuje růst startovacích kultur. Nezanedbatelný vliv na tvorbu biogenních aminů má také dostupnost kyslíku. V anaerobních podmínkách např. syntetizuje *Klebsiella pneumoniae* méně kadaverinu než za přístupu kyslíku[18].

3.2 Bakterie podílející se na produkci biogenních aminů

Přítomnost mikroorganismů, které vykazují dekarboxylační aktivitu, je pro vznik biogenních aminů jednou ze zásadních podmínek[45]. Dekarboxylační aktivitu vykazují tyto rody bakterií:

- *Bacillus*
- *Citobacter*
- *Clostridium*
- *Escherichia*
- *Klebsiella*
- *Proteus*
- *Pseudomonas*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Pediococcus*
- *Streptococcus*
- *Lactobacillus*
- *Enterococcus*
- *Hafnia* [18, 46, 47].

Významnými producenty histaminu jsou *Proteus morgani*, *Klebsiella pneumonie* a některé kmeny *Hafnia alvei*. Ve fermentovaných potravinách se na tvorbě histaminu podílejí bakterie mléčného kvašení, konkrétně rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*[18, 48]. Histamin a tyramin jsou tvořeny *Escherichia coli* a *Pseudomonas spp.*[18]. Také některé kmeny rodu *Lactobacillus* se uplatňují při tvorbě tyraminu. Jde zejména o *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* a *Lb. buchnerei*, které jsou spolu s enterokoky hlavními producenty tyraminu. *Enterobacteriaceae* jsou spojovány s tvorbou kadaverinu a putrescinu[49].

3.3 Výskyt biogenních aminů v pivu a ostatních alkoholických nápojích

Biogenní aminy jsou přirozeně obsaženy v mnoha potravinách jako běžné produkty metabolismu přítomných mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Zvýšené obsahy těchto látek ve fermentovaných potravinách naznačují působení mikrobiální činnosti, a proto je zde vyšší výskyt biogenních aminů pravděpodobnější než u nefermentovaných potravin.

Na vzniku biogenních aminů se mohou podílet jak mikroorganismy pocházející ze zpracovávaných surovin, tak mikroorganismy uplatňující se při technologickém procesu[29, 30, 31].

Pivo, ač není svým charakterem potravinou bohatou na proteiny, disponuje poměrně značným obsahem volných aminokyselin, které mohou být dekarboxylovány příslušnými mikroorganismy za vzniku odpovídajících aminů. Těkavé aminy mají výrazné aroma a přispívají tak k sensorickému profilu piva. Aroma je uvolňováno při kontaktu nápoje s ústní dutinou. Prahové vnímání takto významných aminů (zejm. etylaminu, metylaminu a dimethylaminu) je při koncentraci 2 mg.l^{-1} . Zvýšená koncentrace aminů se může projevit sníženou intenzitou vůně piva a nepříjemnou chutí. V pivu i vínu je hlavním těkavým aminem dimethylamin[20]. Biogenní aminy obsažené v pivu mohou mít svůj původ v surovinách, mikrobiální kontaminaci během výrobního procesu i v závislosti na použité technologii, a nebo během skladování[5].

Biogenní aminy ve vínech mohou pocházet z různých zdrojů. Koncentrace histaminu se zvyšuje se vzrůstajícím pH. Produkuje jej *Pediococcus cerevisiae*, který se podílí na jablečno – mléčném kvašení[32, 33]. Obsah histaminu a tyraminu je obvykle v jednotkách mg na 1 litr vína, málo časté jsou hodnoty $10 - 30 \text{ mg.l}^{-1}$ histaminu a desítky až stovky mg.l^{-1} tyraminu[23].

Obsah biogenních aminů je obvykle vyšší u červených vín než u bílých. Biogenní aminy přecházejí do vína i při lisování hroznů. Přítomnost biogenních aminů ve víně spoluvytváří sensorický specifický charakter vína[20, 34].

3.3.1 Biogenní aminy v pivovarských surovinách

Ve sladovacím procesu během klíčení ječmene vznikají z tryptofanu protoalkaloidy gramin a N-methylgramin, v koříncích se nachází také derivát tyraminu hordein a kandicin. Maximální obsah graminu se vyskytuje během prvního týdne růstu. Částečným rozkladem graminu vzniká ve sladu dimethylamin[19].

Ve sladu a v kvasnicích byl zaznamenán vyšší výskyt putrescinu, spermidinu, sperminu a agmatinu než v chmelu. Obsah ostatních biogenních aminů v surovinách je také nižší. Slad lze považovat za největší zdroj zmíněných biogenních aminů, vzhledem k používanému množství při výrobě piva ve srovnání s ostatními surovinami. Během prvních pěti dnů bylo pozorováno zvyšování obsahu histaminu, fenylethylaminu, tryptaminu a kadaverinu

v klíčícím ječmeni. Na konečný obsah biogenních aminů ve sladu mají vliv technologické podmínky např. intenzita klíčícího procesu, teplota hvozdění a druh použitého ječmene[35, 36].

3.3.2 Obsah biogenních aminů během výrobního procesu

Nejvýznamnější biogenní aminy (vzhledem k nejvyšším koncentracím) výrobního procesu tyramin, histamin a kadaverin vznikají většinou při procesu hlavního kvašení[31, 37, 38]. V průběhu fermentace vznikají biogenní aminy působením dekarboxyláz a nebo dalšími biochemickými reakcemi během hlavního kvašení a dokvašování piva. Během těchto procesů dochází ke změně obsahu CO₂, mění se pH a vznikají další látky, se kterými biogenní aminy vstupují do reakcí. Spodní pivovarské kvasinky během fermentace nemají schopnost tvořit tyramin a histamin a podobné vlastnosti se předpokládají i u divokých kmenů kvasinek[31, 35].

Tyramin a tryptamin produkují během fermentace zejména bakterie *Pediococcus spp.* Sledování obsahu tyraminu je tak možno využít k indikaci výskytu *Pediococcus spp.* během fermentace. K redukci těchto bakterií bylo použito promytí kvasnic kyselinou fosforečnou. Rovněž *Lactobacillus spp.* se podílí na produkci biogenních aminů v pivu, zejména *Lb. frigidus*, *brevissimilis* a *brevis*. Různé druhy mléčných bakterií produkují biogenní aminy a jejich rozdílné schopnosti této produkce naznačují rozdílnost obsahu tyraminu a histaminu mezi různými pivovary i mezi várkami v jednom pivovaru. Při zjišťování obsahu volného tyrosinu v mladině nebyla prokázána souvislost s množstvím tyraminu během fermentace. Obsah této aminokyseliny se tedy nejeví jako kritický faktor pro tvorbu tyraminu[35].

3.3.3 Výskyt během skladování

Větší množství biogenních aminů během skladování produkují laktobacily než pediokoky[39]. Mezi laktobacily produkující biogenní aminy můžeme v tomto kontextu zmínit *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*[31, 35, 40]. Kontaminující bakterie mléčného kvašení zpravidla spolehlivě devitalizuje pasterace piva. Podobně i u piv filtrovaných membránovými technikami nebyl zjištěn větší nárůst biogenních aminů[41]. Pokud po dobu skladování dochází k nárůstu obsahu biogenních aminů, může to naznačovat nedostačnou pasteraci piva[42]. K nárůstu obsahu biogenních aminů může docházet i vlivem zvyšování teploty během skladování. U některých typů lahvových piv by mohlo dojít ke zvýšení obsahu biogenních aminů z důvodu sekundární fermentace[43].

Při výzkumu českých lahvových piv byl dle Kalač et. al. (2002) potvrzen vynikající pasterační efekt i po době tří měsíců. Obsahy nejčastěji běžně se vyskytujících biogenních aminů – histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu a spermidinu, byly velmi nízké a obsah tryptaminu a sperminu byl pod detekčním limitem či nebyl detekován vůbec[44]. Přesto je nutné sledovat množství biogenních aminů nejen v tržních druzích piv během jejich skladování, ale zejména také v průběhu jejich technologických procesů z důvodu zajištění finálního produktu, který nebude znamenat potenciální riziko pro konzumenta (např. v kombinaci s požitím jiné potraviny obsahující významná množství biogenních aminů).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je stanovení obsahu biogenních aminů v průběhu výrobního procesu vybraných vzorků piv vyráběných klasickým výrobním postupem.

Cílem praktické části bylo zejména:

- odebrat vzorky vybraných piv a jejich meziproductů během výrobního procesu,
- identifikovat potenciální rizikové fáze výrobního procesu,
- stanovit obsahy biogenních aminů v odebraných vzorcích,
- navrhnout možná řešení pro snížení obsahu biogenních aminů.

5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

5.1 Charakteristika vzorků

V experimentální části diplomové práce byl stanoven obsah biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) v odebraných vzorcích meziproduktů při výrobě piva a ve finálních výrobcích. Vzorky k analýzám (Tab. I) byly odebírány v provozu, kde bylo pivo vyrobeno technologií kvašení ve spilkách v otevřených kvasných kádích a dokvašování v tancích umístěných do ležáčkových sklepů.

Tab. I - Typy vyráběných piv použité k analýze a jejich kódování

Kódy vzorků vyráběných piv	Začlenění dle EPM	Začlenění dle barvy	Obsah alkoholu v hotovém pivu (% obj.)
A	ležák	tmavé	4,5
B	výčepní	tmavé	3,8
C	speciální	světlé	5,7
D	ležák	světlé	4,8
E	pšeničné	světlé	4,8

Všechny typy piv použité na vzorky byly vyráběny klasickou technologií, připravené jako samosladové várky bez další surogace. K sypání na várku byl použitý slad zpracovaný suchým šrotováním. Na jednotlivé vzorky byly použity tyto druhy sladů:

vzorek A : - slad barevný

- slad karamelový
- slad bavorský
- slad český

vzorek B : - slad barevný

- slad karamelový
- slad bavorský
- slad český

vzorek C : - slad český

vzorek D : - slad český

vzorek E : - slad pšeničný

- slad český

Vystírání proběhlo u všech vzorků stejně při teplotách 37 – 39°C.

Vzorky A, B, C a D byly rmutovány dvourmutovým dekokčním postupem, vzorek E infuzním jednormutovým postupem. Odrmutovací teplota na výstupu z rmutovací pánve byla shodná u všech vzorků 78°C.

Scezování bylo realizováno ve scezovací kádi. Stékání předku bylo u všech vzorků stejné. Následovalo vyslazování vodou o teplotě 79°C, u tmavých piv (vzorky A a B) na 2 výstřelky, u světlých piv (vzorky C, D a E) nepřetržitě.

Intenzivní chmelovar trval u vzorků A, C, D a E 95 minut, u vzorku B 85 minut. Chmelení bylo prováděno u všech vzorků na 3 krát. Ke chmelení vzorků A, B, C a D byly použity granulované chmelové preparáty:

- ŽPČ(Žatecký poloranný červeňák) - MM Invest, s. r. o., Žatec, CZ
- Premiant – Chmelařství, družstvo Žatec, CZ
- Hořká směs - TOP HOP spol. s.r.o., Praha, CZ
- chmelový extrakt v plechovce – Barth Extrakt, Nürnberg, DE.

Vzorek E byl chmelen stejnými preparáty mimo chmelový extrakt v plechovce.

Vzorky byly po ukončení chmelovaru čerpány do vířivé kádě, kde proběhlo odlučování kalů u všech vzorků 30 minut.

Spílání mladiny bylo zahájeno spuštěním spílacího čerpadla, které tlačí mladinu přes deskový chladič dále připravenou cestou spílacím potrubím na příslušné spilky, do připravené kvasné kádě. Vzorky A, B, C a D byly do kádě sespílány na zákvasnou teplotu 7 °C a vzorek E na teplotu 16 – 17 °C. Vzorek E byl spílán do samostatné pšeničné spilky, kde bylo kvašení vedeno kvasinkami svrchního kvašení.

Hlavní kvašení u všech typů vzorků trvalo 6 až 7 dní. Spodně kvašená piva (vzorky A, B, C a D) kvasila standardním způsobem postupně prokvašujícího média s pozvolným růstem teplot až do stádia vysokých kroužků (dosažení maximální teploty kvašení okolo 10°C – byla udržována po dobu 2 dny) a následným řízeným zchlazováním byla snižována postupně teplota cca o 1 °C za den až na teplotu okolo 6 °C při propadání deky. Vzorek E svrchně kvašeného piva kvasil při vyšších teplotách 18 až 24°C a na konci kvašení byla teplota snižována pod 20 °C.

Po hlavním kvašení byly vzorky sudovány do příslušných oddělení ležáckých sklepů sudovacími čerpadly při teplotě okolo 5 – 6 °C.

Dokvašování pšeničného piva probíhalo ve stejném oddělení jako vzorky A a B (ve sklepním oddělení č. I.), vzorek C dokvašoval v odd. č. IV. a vzorek D v odd. č. III. Při dokvašování piv klesala teplota postupně na 2 až 0 °C. Vzorek A dokvašoval 55 dnů, vzorek B 47 dní, vzorek C 40 dnů, vzorek D 35 dní a vzorek E 32 dnů.

Bezprostředně po dokvašení byly vzorky filtrovány přes naplavovací filtr pomocí křemelinou naplavené ve dvou vrstvách. Vzorek E nebyl filtrován, protože se jedná o nefiltrované pšeničné pivo.

Po filtraci byly vzorky distribuovány přes přetlačné oddělení na lahvářenskou linku ke stáčení. Před stočením do lahví byly všechny vzorky průtokově pasterovány při teplotě 68 – 70 °C po dobu 30 – 40 sekund.

Pro vzorkování byla zvolena odběrná místa v průběhu technologického procesu, kde je nejvyšší předpoklad změn koncentrace sledovaných látek. Bylo vybráno celkem 8 odběrných míst. Vzorky A, B, C, D, E byly postupně dle provozních možností odebírány v jednotlivých odběrných místech:

1...spílání, začátek hlavního kvašení (vzorek odebírán při spílání várky před začátkem hlavního kvašení)

- 2...konec hlavního kvašení (vzorek odebírán z kvasné kádě na konci hlavního kvašení před sudováním mladého piva do ležáckého sklepa)
- 3...sklep – 10 dní dokvašování (vzorek odebírán z ležáckého tanku 10 dní po sesudování)
- 4...sklep – 20 dní dokvašování (vzorek odebírán z ležáckého tanku po 20 dnech dokvašování)
- 5...sklep – konec dokvašování (vzorek odebírán z ležáckého tanku na konci dokvašování před filtrací piva)
- 6...filtrace, po zfiltrování (vzorek odebírán ze vzorkovacího kohoutu umístěného za filtrem)
- 7...finální produkt na začátku skladování (vzorek odebírán z lahve po stočení piva)
- 8...finální produkt na konci skladování – 20 dní skladování (vzorek odebírán z lahve po 20-ti denním skladování za standardních skladovacích podmínek).

Každý vzorek byl odebrán do uzavíratelné vzorkovnice v množství 50 ml a označen příslušným kódem série odběrů, druhu vzorku a číslem odběrového místa. Následně plná vzorkovnice byla uzavřena a uložena do mrazícího boxu. Postupně odebírané vzorky byly zmrazovány a při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ uchovávány do samotné analýzy.

5.2 Stanovení obsahu biogenních aminů

Stanovení obsahu biogenních aminů bylo provedeno ve dvou krocích. Nejprve byly vzorky připravovány derivatizací dansylchloridem a po přípravě vzorků následovalo stanovení biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Obecné schéma možného uspořádání kapalinového chromatografu je uvedeno na Obr. č. 2.

5.2.1 Příprava vzorků derivatizací

Pro přípravu byly odebrány 2 ml vzorku, v poměru 1:1 zředěny 0,6 M kyselinou chloristou (Sigma-Aldrich, USA) a dobře promíchány na vortexu. 1 ml takto zředěného vzorku byl nalit do derivatizační nádoby (každý vzorek připravovaný ve třech paralelních stanoveních). Okyselená směs byla podrobena derivatizaci (podle Dadáková a kol.)[57]. Do každého vzorku bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg.l^{-1}) a 1,5 ml uhličitanového pufru. Pufr o pH 9,2 byl připraven smícháním 50 ml rozto-

ku A (0,5 M NaHCO₃; Merck, SRN) a 12 ml roztoku B(0,5 M Na₂CO₃; Merck). Následně bylo v pufru rozpuštěno 16,65 g K₂CO₃ (Merck) a výsledné pH upraveno na 11,0 – 11,1. Poté byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g.l⁻¹ v acetonu. Takto připravené vzorky byly dobře uzavřeny a míchány na třepačce v temnu 20 hodin.

Následně bylo do každého vzorku napipetováno 200 µl roztoku prolinu (200 mg ve 2 ml H₂O; Sigma-Aldrich) a znovu byly uzavřeny a míchány na třepačce další hodinu. Poté byly přidány 3 ml heptanu, uzavřeny a 3 minuty protřepány. Z každého vzorku byl následně odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do připravené, označené vialky. Heptanová vrstva se pak nechala odpařit při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek se zředil 1,5 ml acetonitrilu.

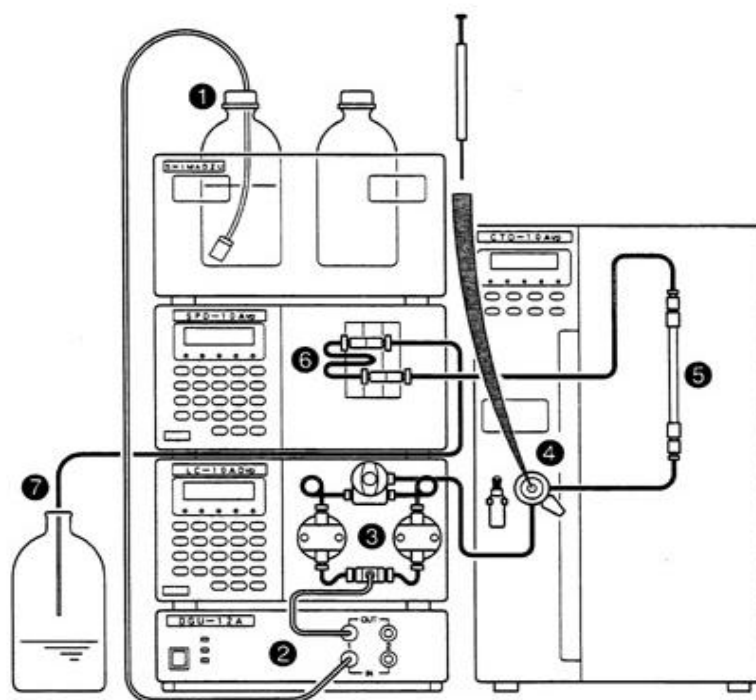
Takto připravený vzorek byl uchováván do doby analýzy v mrazícím zařízení při teplotách pod -18 °C. Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a poté dávkovány do chromatografického systému.

5.2.2 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Po derivatizaci byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr a poté nanášeny na kolonu (kolona Agilent Eclipse Plus C18 RRHD s rozměry 50 × 3 mm a velikostí částic 1,8 µm); termostat kolon Agilent 1260 Infinity, UV/VIS DAD detektor Agilent 1200, Agilent Technologies, USA; binární pumpa a autosampler LabAlliance, USA) s UV detekcí ($\lambda = 254$ nm) po předkolonové derivatizaci dansylchloridem. Podmínky separace a detekce sledovaných BA byly nastaveny podle Smělá a kol.[58]. Separace byla provedena gradientovou elucí (Tab. II). Každý ze vzorků byl derivatizován třikrát a každá derivatizovaná směs nanesena na kolonu ve dvojitěm opakování. Výsledné chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu Clarity a kalibračních křivek získaných analýzou směsí standardů.

Tab. II – Lineární gradientový eluční program HPLC

Čas [min]	10 % Acetonitril [%]	100% Acetonitril [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

Blokové schéma HPLC

Obr.č.2. : Blokové schéma kapalinového chromatografu [59].

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Na základě vytyčených cílů práce a použitých metodických postupů bylo analyzováno celkem 112 odebraných vzorků u pěti vybraných piv (resp. meziproductů při výrobě vybraných piv). Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních, tedy v souhrnu celkem 224 vzorků. Výsledky celkového obsahu BA ve zkoumaných vzorcích piv i obsahy jednotlivých BA jsou popsány níže v této kapitole.

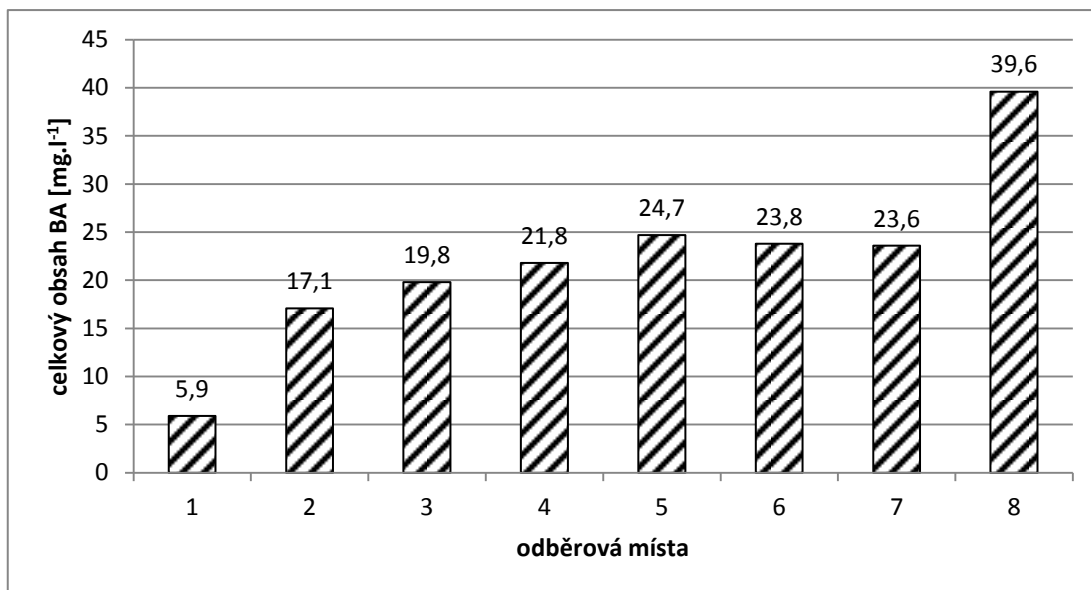
6.1 Vývoj celkového obsahu biogenních aminů ve zkoumaných vzorcích

Do měření celkového obsahu biogenních aminů v jednotlivých vzorcích bylo zahrnuto celkem 8 BA, konkrétně tedy tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin. V každém z pěti vytypovaných piv byly detekovány biogenní aminy (grafy 1-5) a celkové množství BA se pohybovalo od 4,9 mg.l⁻¹ (graf 4, vzorek D) až po 52,8 mg.l⁻¹ (graf 3, vzorek C). Uváděné hodnoty jsou vypočtené průměry celkového množství BA v daných vzorcích.

6.1.1 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku A

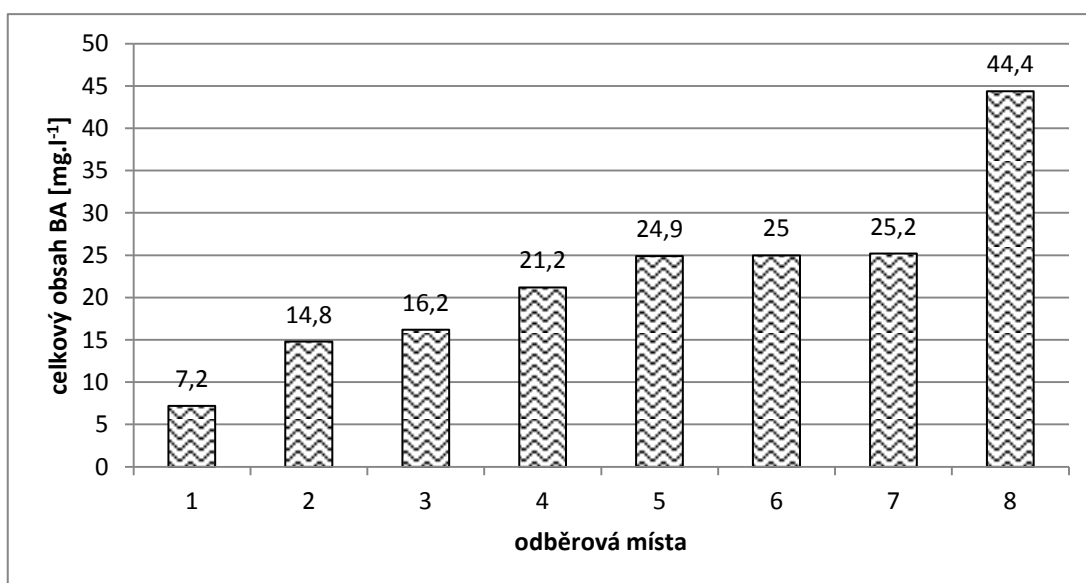
Vzorek A představuje tmavé pivo typu ležák s extraktem původní mladiny 12 % a obsahem alkoholu 4,5 % obj. v hotovém pivu. Trend vývoje celkového obsahu biogenních aminů v tomto vzorku je znázorněn v grafu 1.

V grafu je popsán celkový obsah BA v jednotlivých odběrových místech, kde byl vzorek v průběhu výroby odebírán. Nejnižší hodnota vzorku A 5,9 mg.l⁻¹ byla zaznamenaná v odběrovém místě č. 1 tedy při spílání mladiny, před začátkem hlavního kvašení. Během hlavního kvašení (mezi kontrolními body 1 a 2) došlo k poměrně výraznému nárůstu z 5,9 mg.l⁻¹ na 17,1 mg.l⁻¹. Následně obsah BA mírně rostl až do kontrolního místa č.5 (sklep - konec dokvašování), kde bylo detekováno 24,7 mg.l⁻¹. Poté obsah BA velmi mírně klesl do odběrného bodu č.7, kde hotové pivo vykazovalo 23,6 mg.l⁻¹. K nejintenzivnějšímu nárůstu obsahu biogenních aminů došlo během 20-ti denního skladování vzorku A (mezi odběrovými místy 7 a 8), kde se hodnota zvýšila až na 39,6 mg.l⁻¹.

Graf 1: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku A.

6.1.2 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku B

Vzorek B je označení pro tmavé výčepní pivo s extraktem původní mladiny 10 % a obsahem alkoholu 3,8 % obj. v hotovém pivu. Vývoj celkového obsahu biogenních aminů v tomto vzorku je sestaven do grafu č. 2.

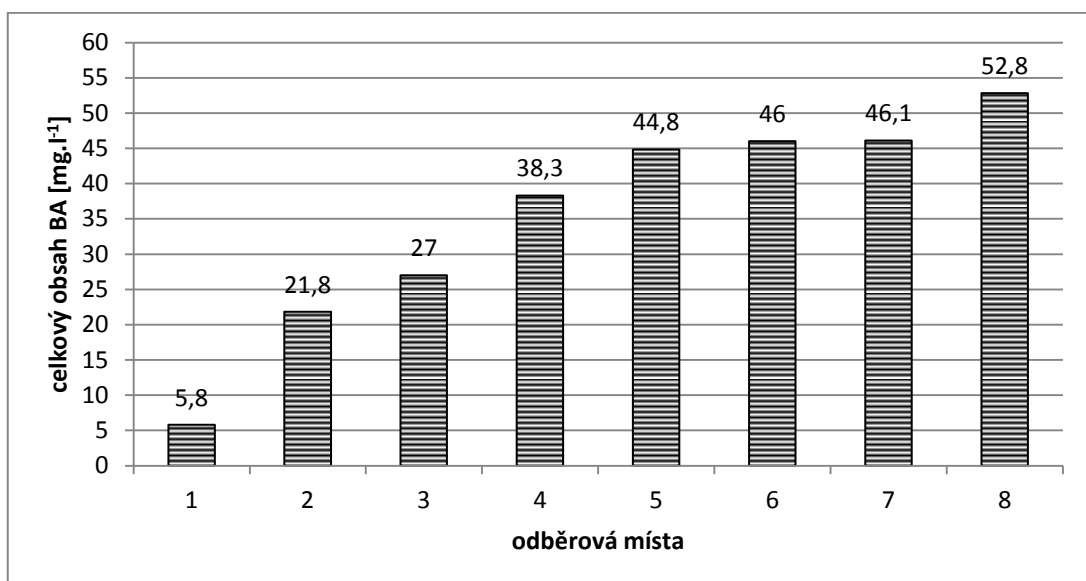
Graf 2: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku B.

Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku B je také nejnižší v prvním odběrovém bodě tedy při spílání mladiny a to $7,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Nárůst obsahu BA mezi body 1 a 2 byl nižší než u vzorku A a vykazoval hodnoty $7,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a $14,8 \text{ mg.l}^{-1}$. Z druhého odběrového místa obsah BA konstantně stoupal až do konce dokvašování (bod č.5), kde bylo naměřeno $24,9 \text{ mg.l}^{-1}$, poté obsah výrazněji nestoupal až do bodu č.7. Ovšem při 20-ti denním skladování byl nárůst naopak výrazný z $25,2 \text{ mg.l}^{-1}$ na $44,4 \text{ mg.l}^{-1}$, což je vyšší než u vzorku A (vzorek A nárůst o 16 mg.l^{-1} , vzorek B nárůst o $19,2 \text{ mg.l}^{-1}$). Nejvyšší hodnota byla detekována opět po skladování piva, kdy ve vzorku bylo naměřeno $44,4 \text{ mg.l}^{-1}$.

6.1.3 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku C

Vzorek C je světlé pivo speciální, které má extrakt původní mladiny 14 %. V hotovém pivu je obsah alkoholu 5,7 % obj. Následující graf č. 3 popisuje celkový obsah BA v tomto vzorku.

Graf 3: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku C.



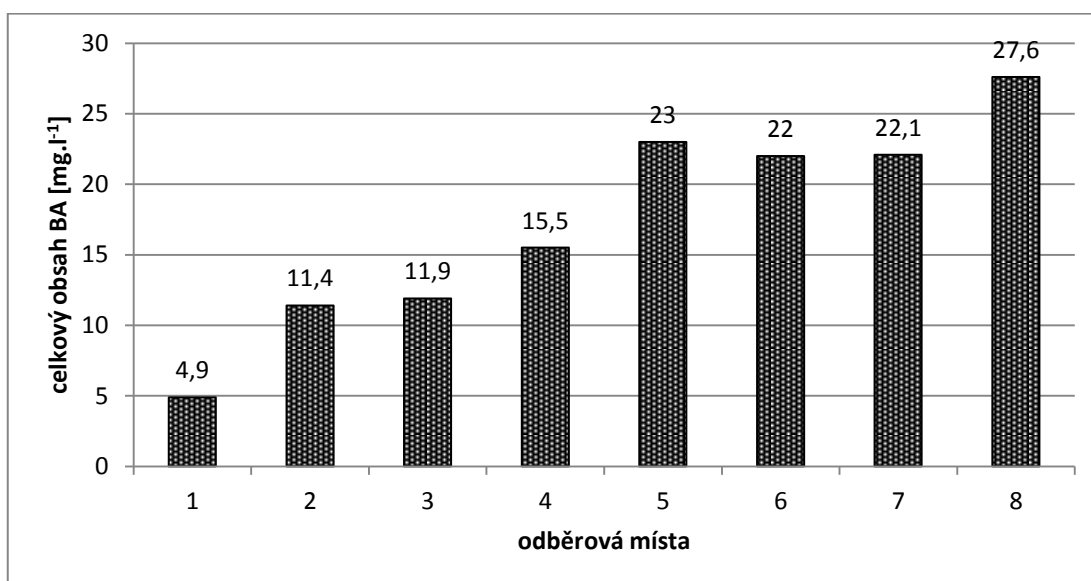
Vzorek C vykazoval rostoucí trend naměřených obsahů a hodnoty BA byly v tomto vzorku nejvyšší z pěti zkoumaných typů piv. Nejnižší hodnota celkového obsahu BA ve vzorku C byla detekována na začátku kvašení a vykazovala $5,8 \text{ mg.l}^{-1}$. Během hlavního kvašení byl zaznamenán výrazný nárůst z $5,8 \text{ mg.l}^{-1}$ v odběrovém místě č.1 na $21,8 \text{ mg.l}^{-1}$ v bodě 2. Poté celkový obsah BA dále stoupal směrem k dokvašování piva a další poměrně výrazný

vzestup jsme zaznamenali mezi kontrolními body 3 (10 dní dokvašování) a 4 (20 dní dokvašování) i 4 a 5 (konec dokvašování), kde byly hodnoty 27 mg.l^{-1} (odb.bod 3) a $38,3 \text{ mg.l}^{-1}$ (odb.bod 4) a dále $44,8 \text{ mg.l}^{-1}$ (odb.bod 5). Na konci dokvašování se tento stoupající vývoj obsahu poměrně zpomalil a až do bodu 7 se mírně zvýšil na $46,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Poslední vzestup byl zaznamenán mezi bodem 7 a 8, kde byl detekován obsah BA $52,8 \text{ mg.l}^{-1}$. Maximální hodnotu biogenních aminů vzorek C vykázal po 20-ti denním skladování finálního produktu, kde bylo zaznamenáno 52.8 mg.l^{-1} .

6.1.4 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku D

Vzorek D představuje pivo, které svým extraktem původní mladiny 12 % řadíme do kategorie ležák. Jedná se o světlý ležák s obsahem alkoholu 4,8 % obj. v hotovém pivu. Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku D znázorňuje graf č. 4.

Graf 4: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku D.



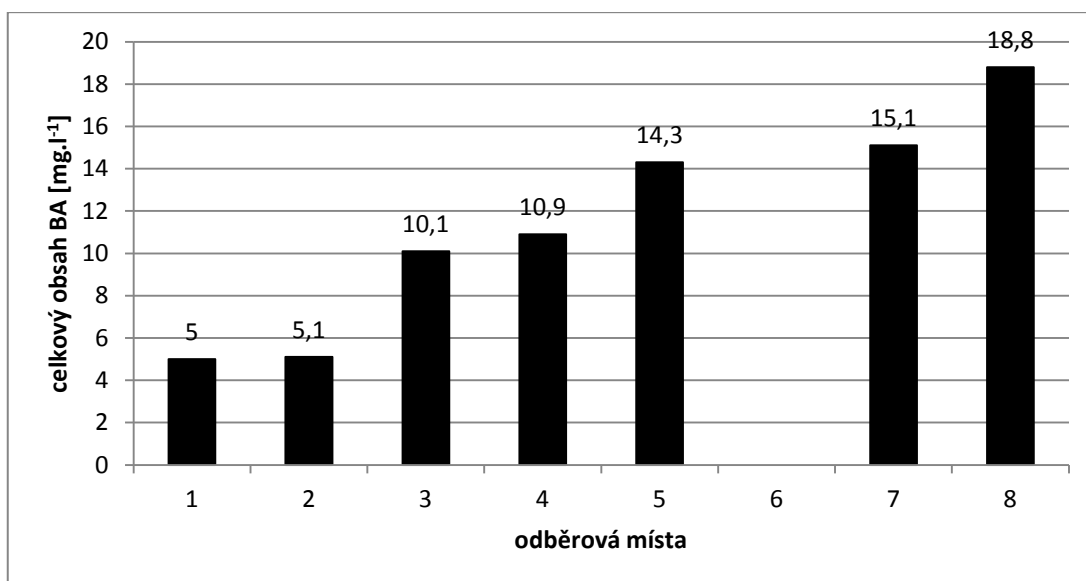
Vzorek D vykázal celkově nižší hodnoty ve srovnání se vzorkem C (obě světlá piva). Podíváme-li se konkrétně na trendy u tohoto vzorku můžeme zaznamenat opět významný nárůst ihned v počátku technologického procesu hlavního kvašení, tedy z $4,9 \text{ mg.l}^{-1}$ na $11,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Následně obsah BA mírně stoupal až do 20. dne dokvašování na $15,5 \text{ mg.l}^{-1}$, odkud se hodnota zvýšila až na 23 mg.l^{-1} na konci dokvašování piva. Poté byly hodnoty při filtraci a začátku skladování konstantní s velmi mírným poklesem z bodu 5, kde pak v hotovém

pivu bylo naměřeno 22,1 mg.l⁻¹. Po skladování byl zaznamenán opět vzestup na konečných 27,6 mg.l⁻¹. I v případě světlého ležáku (vzorek D) byla tedy během analýzy zjištěna nejnižší hodnota celkového obsahu biogenních aminů 4,9 mg.l⁻¹ v začátcích kvasného procesu. Naopak v odběrovém bodě č. 8 (po 20-ti denním skladování finálního produktu při teplotě okolo 15°C) byla zjištěna hodnota 27,6 mg.l⁻¹, což je maximum tohoto vzorku.

6.1.5 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku E

Pšeničné pivo světlé pro účely analýz bylo označeno jako vzorek E. Jedná se o pivo s extraktem původní mladiny 12 % a obsahem alkoholu 4,8 % obj. Celkové množství biogenních aminů zaznamenaných ve vzorku E je patrné z grafu č.5.

Graf 5: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l⁻¹) ve vzorku E.



Ve vzorku E byly naměřeny nejnižší hodnoty BA ze všech zkoumaných vzorků. Během hlavního fermentačního procesu se obsah biogenních aminů nijak výrazně neměnil. Významnější nárůst byl zaznamenán až od 3. odběrového místa tedy při dokvašování (rozdíl mezi bodem 2 a 3 je 5 mg.l⁻¹). V průběhu dokvašování obsah BA dále rostl až na hodnotu 14,3 mg.l⁻¹ na konci procesu dokvašování. Ve vzorku E bylo vynecháno odběrové místo č. 6, tedy vzorek odebíraný při filtraci, z důvodu absence filtrace v technologickém postupu přípravy tohoto typu piva, neboť se jedná o pivo nefiltrované. U hotového piva se při skladování ještě zvýšila hodnota z 15,1 mg.l⁻¹ na 18,8 mg.l⁻¹. Nejnižší hodnoty tedy byly opět

naměřeny na začátku hlavní fermentace, kde bylo detekováno $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ celkového množství BA. Nejvyšší hodnota celkového obsahu BA pšeničného piva byla detekována i v tomto případě v hotovém pivu po 20 dnech skladování a to $18,8 \text{ mg.l}^{-1}$.

Z celkového obsahu biogenních aminů v jednotlivých vybraných vzorcích piv je možno všimnout si společného trendu všech typů vzorků, a sice vzrůstající tendence obsahu BA napříč technologickým procesem výroby tedy z odběrného bodu č.1 (po sespílení na začátku hlavního kvašení) směrem k odběrnému místu č.8 (20-ti denní skladování hotového piva). U vzorku s nejvyššími hodnotami BA došlo mezi začátkem kvašení a 20-ti denním skladování hotového piva až k devítinásobnému navýšení celkového obsahu BA. Dále je možno konstatovat, že během filtrace se obsah BA nijak výrazně nezměnil, protože vzorky z konce dokvašování a po zfiltrování byly odebrány ve stejný den a obsahy celkových BA byly u všech vzorků velmi podobné (s výjimkou vzorku E, kde filtrace nebyla použita z důvodu nefiltrovaného finálního produktu). Nárůst celkového obsahu biogenních aminů naznačuje správnost volby jednotlivých odběrových míst, kde byl předpokládán výskyt a vývoj těchto látek a zároveň potvrzuje (jak dokládají práce Kalač P.[31], Erletti M. et. al.[37] a Romero R. et. al.[38]), že nejintenzivnější vývoj produkce BA je při procesu hlavního kvašení a dokvašování piva. Vyšší obsahy BA byly detekovány v těchto odběrových místech pravděpodobně z důvodu zvýšené aktivity mikrobiálních dekarboxylačních enzymů během fermentačních procesů. Komprda[60] uvádí, že jedním z důležitých faktorů této aktivity je dostupnost substrátu, tedy přítomnost volných aminokyselin a cukrů, což při fermentaci piva, zvláště v otevřených kádích, může ve spojitosti s mikrobiální aktivitou v tomto prostředí být nezanedbatelné při zkoumání výsledků celkových obsahů BA v analyzovaných vzorcích. V této souvislosti lze dle výsledků celkového obsahu BA identifikovat právě konec hlavní fermentace za potenciálně rizikové místo možného vzniku a následného vývoje BA během dokvašování, filtrace a skladování. A také během 20-denního skladování vzorků (mezi odběrovými body 7 a 8) docházelo k poměrně výrazným nárůstům detekovaných hodnot (např. u vzorku B až téměř o 20 mg.l^{-1}), což potvrzuje, že právě během skladování piv může docházet k dalšímu navyšování celkového obsahu BA, jak uvádějí některé studie obsahu BA při skladování (např. Buňka F. et. al.[61]).

Při porovnávání výsledků celkového obsahu biogenních aminů v jednotlivých vzorcích byly zjištěny nejmenší hodnoty u pšeničného piva (vzorku E), které kolísaly od 5 do $18,8$

mg.l⁻¹ a naopak nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorku C (tedy světlé pivo speciální), kde bylo naměřeno 5,8 až 52,8 mg.l⁻¹.

Obecně lze říci, že prostředí kvašení mladiny v otevřených kvasných kádích může být náchylnější na zvýšenou mikrobiální aktivitu a tedy i na případné dekarboxylační procesy provázející vznik BA. Původ kontaminujících mikroorganismů, které se mohou podílet na produkci BA ve zkoumaných vzorcích piv, může být právě v prostředí otevřených kádí, kdy kvasící mladina je v přímém styku s okolním prostředím spilek a udržení dokonalé čistoty v těchto prostorách je podstatně náročnější než např. sanitace uzavřených nádob. V tomto kontextu je možné zmínit výraznou souvislost vzniku BA s aktivitou některých mikroorganismů, zejména bakterií mléčného kvašení. Jak uvádějí ve své studii Kalač a Křížek [35], zejména může jít o bakterie *Pediococcus spp.* a *Lactobacillus spp.*, které jsou klíčovým zdrojem BA v pivu. V klasické technologii kvašení piva je tedy z pohledu tvorby biogenních aminů (a ne jenom BA) nutné klást vysoký důraz na hygienu a čistotu kádí i prostředí spilek a zároveň zvýšenou mikrobiologickou pozornost v prostoru přímého styku kvasného média s prostředím. Dalším možným zdrojem kontaminujících mikroorganismů mohou být i použité suroviny, zde se dá uvést (vzhledem k použitému množství na várku) především slad, který byl použit k výrobě. Různé druhy sladů používaných při výrobě jednotlivých typů piv jsou uvedeny v kapitole 5.1.

6.2 Vývoj jednotlivých biogenních aminů ve zkoumaných vzorcích

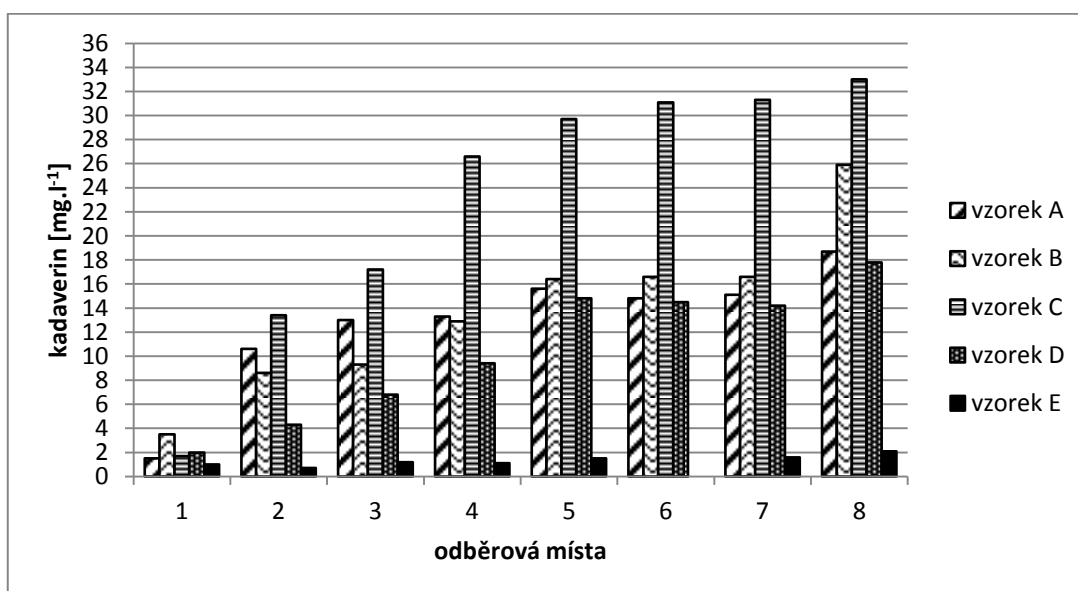
Při bližším zaměření na konkrétní biogenní aminy v odebraných vzorcích bylo zjištěno, že byly detekovány ve všech vzorcích: putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a ve vzorku A i spermin. Biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin a histamin v analyzovaných vzorcích nebyly detekovány. Výsledky uvedené níže (grafy 6 – 10) popisují trendy konkrétních detekovaných biogenních aminů ve zkoumaných vzorcích piv v průběhu výrobního procesu a následném skladování finálního produktu. Při popisu vývoje obsahu konkrétního BA a porovnání jednotlivých vzorků jsou uváděny trendy v pořadí od vzorků s vyššími hodnotami k nižším u putrescinu a kadaverinu. U tyraminu a spermidinu je vývoj popisován postupně od vzorku A po vzorek E. V jednotlivých místech jsou zkoumané vzorky srovnávány v nejvyšších a nejnižších hodnotách daných míst. Nejnižší hodnota byla naměřena u spermidinu 0,1 mg.l⁻¹ ve vzorku A na začátku hlavního kvašení (graf 9) a naopak nejvyšší hodnotu 33 mg.l⁻¹ můžeme přiřadit ke kadaverinu ve vzorku C po 20-denním skladování

(graf 6). Uváděné hodnoty jsou vypočtené průměry obsahu jednotlivých BA v daných vzorcích.

6.2.1 Obsah kadaverinu

Kadaverin byl zaznamenán u všech zkoumaných vzorků ve všech odběrných místech. Trendy vývoje kadaverinu v analyzovaných pivech jsou naznačeny v grafu č. 6, ve kterém je souhrnně uvedeno množství kadaverinu na jednotlivých kontrolních bodech výroby u všech vzorků.

Graf 6: Obsah kadaverinu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.



Obsah kadaverinu je výrazně nejnižší u vzorku E, kde se naměřené hodnoty pohybují od $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ do $2,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Naopak výrazně nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorku C, kde byl nejvyšší detekovaný obsah 33 mg.l^{-1} .

Vzorek C obsahoval nejvyšší množství kadaverinu ze všech vzorků, pouze na začátku kvasného procesu byl nižší než u vzorku B a D. Vysoký nárůst je patrný hned na začátku sledovaného výrobního procesu, kdy z 1. bodu (koncentrace kadaverinu $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$) vzrostl jeho obsah na hodnotu $13,4 \text{ mg.l}^{-1}$ na konci hlavního kvašení. Další vysoký nárůst byl zaznamenán v ležáckém sklepe mezi 10. a 20. dnem dokvašování, zde bylo detekováno $17,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a $26,6 \text{ mg.l}^{-1}$. V dalších odběrových místech dále obsah kadaverinu vzrůstal až na nejvyšší hodnotu 33 mg.l^{-1} po 20-ti denním skladování finálního produktu.

Vzorek B je zajímavý tím, že hodnota $3,5 \text{ mg.l}^{-1}$ kadaverinu na začátku hlavního kvašení byla nejvyšší ze všech vzorků. V bodech 2, 3, 4 byl vzorek B s nižším obsahem kadaverinu než vzorky A a C. Od konce dokvašování byl obsah zkoumaného BA vyšší než ostatní vzorky s výjimkou vzorku C. Vzorek B vykazoval také poměrně výrazný nárůst během kvašení, konkrétně z $3,5 \text{ mg.l}^{-1}$ na $8,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Další vyšší nárůst byl 10. a 20. den dokvašování, kdy z $9,3 \text{ mg.l}^{-1}$ stoupl obsah na $12,9 \text{ mg.l}^{-1}$. Obsah kadaverinu stoupl až do závěru dokvašování, kde bylo zjištěno $16,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Nejvyšší nárůst obsahu kadaverinu ve vzorku B byl patrný při skladování hotového produktu, kdy stoupla hodnota z $16,6 \text{ mg.l}^{-1}$ na $25,9 \text{ mg.l}^{-1}$.

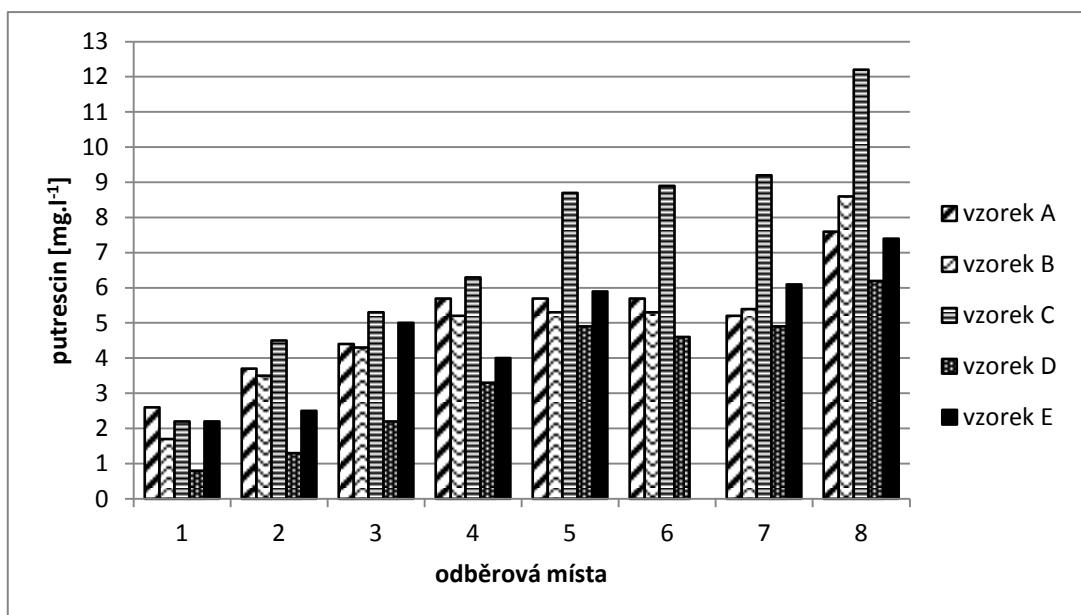
Vzorek A vykázal vyšší hodnoty ve srovnání se vzorky E, D a od konce kvašení až do 20. dne dokvašování i vyšší než vzorek B. V ostatních bodech byly hodnoty nižší než u vzorku B a také celkově nižší než ve vzorku C. Významný nárůst byl u tohoto vzorku zaznamenán hned na začátku procesu mezi body 1 a 2, kde z hodnoty $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ vzrostl obsah kadaverinu na $10,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Další nárůst tohoto BA již byl mírnější a pokračoval do odběrového místa 5, kde bylo naměřeno $15,6 \text{ mg.l}^{-1}$. V kontrolním bodu 6 obsah kadaverinu velmi mírně klesl na $14,8 \text{ mg.l}^{-1}$ a v dalších dvou bodech opět stoupl až na $18,7 \text{ mg.l}^{-1}$ po 20-ti denním skladování hotového piva.

Vzorek D obsahoval vyšší hodnoty kadaverinu než vzorek E a nižší než ostatní vzorky (s výjimkou začátku kvašení, kde byl obsah vyšší než u vzorku A, C i E). V odběrovém místě 1 bylo zjištěno 2 mg.l^{-1} a v následujících bodech obsah postupně rostl do bodu 4, kde bylo naměřeno $9,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Mezi 20. dnem dokvašování a koncem dokvašování můžeme zaznamenat opět výraznější nárůst na $14,8 \text{ mg.l}^{-1}$ v pátém odběrném místě. Další výraznější nárůst obsahu byl detekován po 20 dnech skladování, kde bylo naměřeno $17,8 \text{ mg.l}^{-1}$.

Vzorek E obsahoval jen malé množství kadaverinu. Na začátku hlavní fermentace bylo detekováno 1 mg.l^{-1} poté obsah ještě klesl na $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ a během dalšího výrobního procesu již nijak významně nestoupal. Po 20-ti denním skladování obsahoval vzorek $2,1 \text{ mg.l}^{-1}$ kadaverinu.

6.2.2 Obsah putrescinu

Putrescin byl zaznamenán u všech zkoumaných vzorků ve všech odběrných místech. Trendy vývoje putrescinu v analyzovaných pivech jsou popsány pomocí grafu č. 7, ve kterém je souhrnně uvedeno množství putrescinu na jednotlivých kontrolních bodech výroby u všech vzorků.

Graf 7: Obsah putrescinu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.

Podíváme-li se na trendy vývoje putrescinu ve zkoumaných vzorcích piv je patrný postupný nárůst obsahu u všech vzorků od bodu 1 směrem k bodu 8. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorku C, kde maximální obsah putrescinu dosáhl $12,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a nejnižší obsah byl zaznamenán u vzorku D v začátcích kvašení ($0,8 \text{ mg.l}^{-1}$). U vzorku E došlo mezi odběrovými místy v ležáckém sklepě -10 dní dokvašování (bod č.3) a 20 dní dokvašování (bod č.4) k mírnému poklesu hodnoty z 5 mg.l^{-1} na 4 mg.l^{-1} . Dále byl zaznamenán velmi mírný pokles obsahu putrescinu u vzorku A mezi 6 a 7 bodem z $5,7 \text{ mg.l}^{-1}$ na $5,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

U vzorku C byly detekovány vůbec nejvyšší hladiny putrescinu ze všech vzorků v sedmi odběrných místech, pouze na začátku kvašení bylo naměřeno méně než u vzorku A (vzorek C vykázal $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a vzorek A $2,6 \text{ mg.l}^{-1}$). Obsah putrescinu v tomto vzorku stoupl v bodě 2 na $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$ a dále stoupal. Po 20 dnech dokvašování bylo detekováno $6,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Z bodu 4 do konce dokvašování stoupla hodnota na $8,7 \text{ mg.l}^{-1}$ a pak se poměrně vzestup ustálil. Až v posledním odběrném místě bylo zvýšení obsahu v hotovém pivu výrazné z $9,2 \text{ mg.l}^{-1}$ na $12,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

Vzorek A vykázal nejvyšší hodnotu putrescinu ze všech vzorků na začátku hlavního kvasného procesu. Zde bylo detekováno $2,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Od prvního bodu obsah konstantně stoupal až do bodu 4 kde bylo zjištěno $5,7 \text{ mg.l}^{-1}$. Pak se tento trend zastavil a následovalo mírné snížení z této hodnoty na $5,2 \text{ mg.l}^{-1}$ v kontrolním bodu 7 a následné zvýšení obsahu v 20 dní skladovaném pivu na $7,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Ve srovnání s ostatními vzorky byl od začátku kvašení

do 20. dne dokvašování obsah vyšší než u vzorku B, D, E (pouze v bodě 3 byl u vzorku E vyšší o $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$). Na konci dokvašování byl obsah vyšší než u vzorku B, D a nižší než u vzorku E. Po zfiltrování byl obsah vyšší než u vzorků B a D. Na začátku skladování vykazoval vzorek vyšší hodnoty než vzorek D a nižší než vzorek B a E. Po 20 dnech skladování bylo naměřeno více jak u vzorku D, E a méně jak u vzorku B.

Vzorek E zaznamenal vyšší hodnoty putrescinu než vzorky D a B na začátku kvašení, kde bylo zjištěno $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Ve 2. bodě obsah stoupal mírně na $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (u vzorku B byl zde vyšší obsah $3,5 \text{ mg.l}^{-1}$). V kontrolním místě 3 se hodnota zvýšila na 5 mg.l^{-1} (opět vyšší než vzorek D a vzorek B), následně klesla v bodě 4 na 4 mg.l^{-1} (zde vyšší než ve vzorku D a nižší než ve vzorku B). Dále byl postupný nárůst do bodu 7, kde bylo naměřeno $6,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (vyšší hodnoty ve srovnání se vzorkem D a B). Následně se hodnota na konci skladování zvýšila na $7,4 \text{ mg.l}^{-1}$ (vyšší jak vzorek D, nižší jak vzorek B).

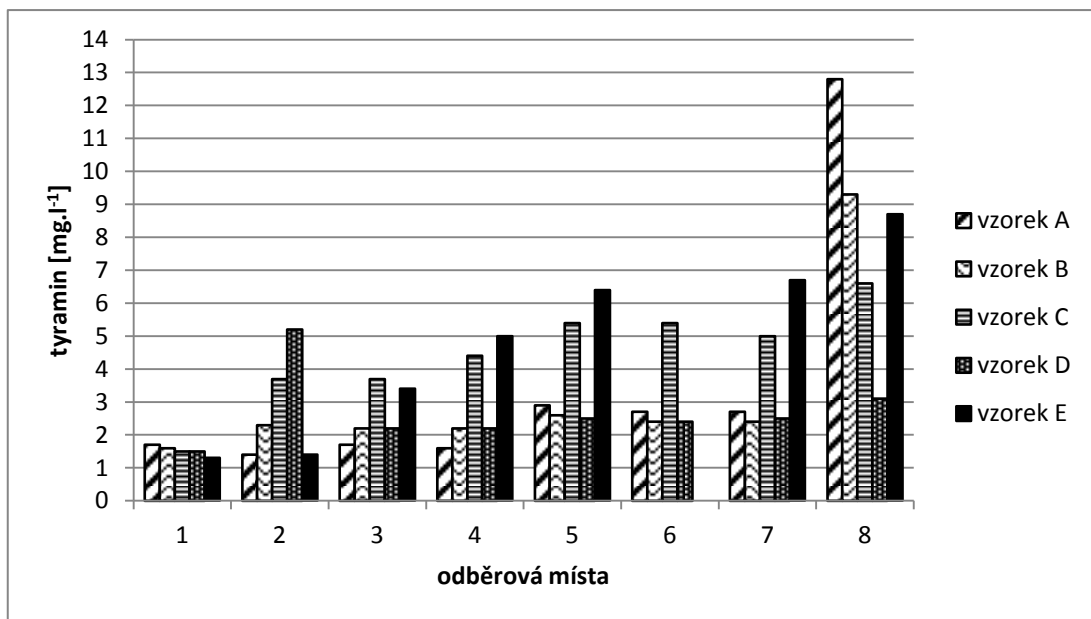
Vyšší hodnoty než vzorek D byly detekovány u vzorku B. Zde byl podobný trend vývoje hodnot jako u vzorku D, ale s vyššími obsahy putrescinu v jednotlivých odběrových místech. Hodnoty se konstantně zvyšovaly do 20. dne dokvašování, pak se obsah ustálil a výrazněji se zvýšil až v posledním odběrném místě. V bodě 1 bylo zaznamenáno $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$, v bodě 4 pak $5,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a v bodě 8 bylo detekováno $8,6 \text{ mg.l}^{-1}$.

Nejnižší obsah ve všech odběrových místech vykazoval vzorek D. Obsah putrescinu zde postupně rostl od $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ na začátku fermentace až do konce dokvašování s obsahem $4,9 \text{ mg.l}^{-1}$, kde se vývoj ustálil a následně se zvýšil až v posledním odběrovém bodě na $6,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

6.2.3 Obsah tyraminu

Při analýze vzorků byl zjištěn obsah tyraminu ve všech zkoumaných pivech. Tyramin byl detekován ve všech bodech vytypovaného výrobního procesu. Vývoj tyraminu je zachycen v grafu 8, kde jsou souhrnně zobrazeny všechny zkoumané vzorky.

Obsah tyraminu ve zkoumaných vzorcích nevykázal jednoznačné trendy nejvyšších a nejnižších hodnot daných vzorků (nejnižší hodnoty v některých místech se obrátily ve vyšší či nejvyšší hodnoty v jiných odběrových bodech). Z tohoto důvodu jsou trendy obsahu tyraminu popsány u jednotlivých vzorků postupně od vzorku A po vzorek E.

Graf 8: Obsah tyraminu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.

Vzorek A vykázal po sespílání v začátku hlavního kvašení nejvyšší hodnotu ze všech $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$. V dalším bodu jeho obsah velmi lehce klesl a zároveň v druhém kontrolním bodě byl nejnižší ze zkoumaných vzorků $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$. V dalších místech obsah výrazněji nestoupal, až na konci dokvašování piva, kde bylo detekováno $2,9 \text{ mg.l}^{-1}$. Dále byl obsah tyraminu konstantní až do bodu 7. V posledním odběrném místě však došlo k výraznému nárůstu obsahu z $2,7 \text{ mg.l}^{-1}$ na $12,8 \text{ mg.l}^{-1}$ což byl také nejvyšší zaznamenaný obsah tyraminu v daném místě.

Vzorek B vykázal poměrně vyrovnaný vývoj obsahu tyraminu v průběhu 1. až 7. bodu vytypovaného pro vzorkování. Hodnoty obsahů v těchto bodech se pohybovaly od $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (v kontrolním bodě 1) po $2,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (v kontrolním bodě 5). Až v posledním odběrovém místě se množství tyraminu v tomto vzorku výrazněji zvýšilo z $2,4 \text{ mg.l}^{-1}$ na $9,3 \text{ mg.l}^{-1}$.

Vzorek C obsahoval při zahájení kvasného procesu (v 1. odběrném místě) $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ tyraminu a následně se jeho obsah zvýšil v bodě 2 na $3,7 \text{ mg.l}^{-1}$. Poté stále stoupal až do konce dokvašování (kontrolního místa č. 5), kde bylo detekováno $5,4 \text{ mg.l}^{-1}$. V bodě 7 došlo k poklesu na 5 mg.l^{-1} a následně obsah tyraminu stoupl v posledním odběrovém místě na $6,6 \text{ mg.l}^{-1}$.

Ve vzorku D byl zaznamenán odlišný vývoj obsahu tyraminu než u ostatních vzorků. V prvním odběrovém místě bylo detekováno $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$, ale na konci hlavního kvašení (ve

2. bodě) došlo k výraznému vzestupu hodnoty na $5,2 \text{ mg.l}^{-1}$, což byla nejvyšší naměřená hodnota v tomto bodě. V dalším místě obsah opět výrazně klesl na $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a poté v následujících bodech se už hodnota nijak výrazněji nezměnila.

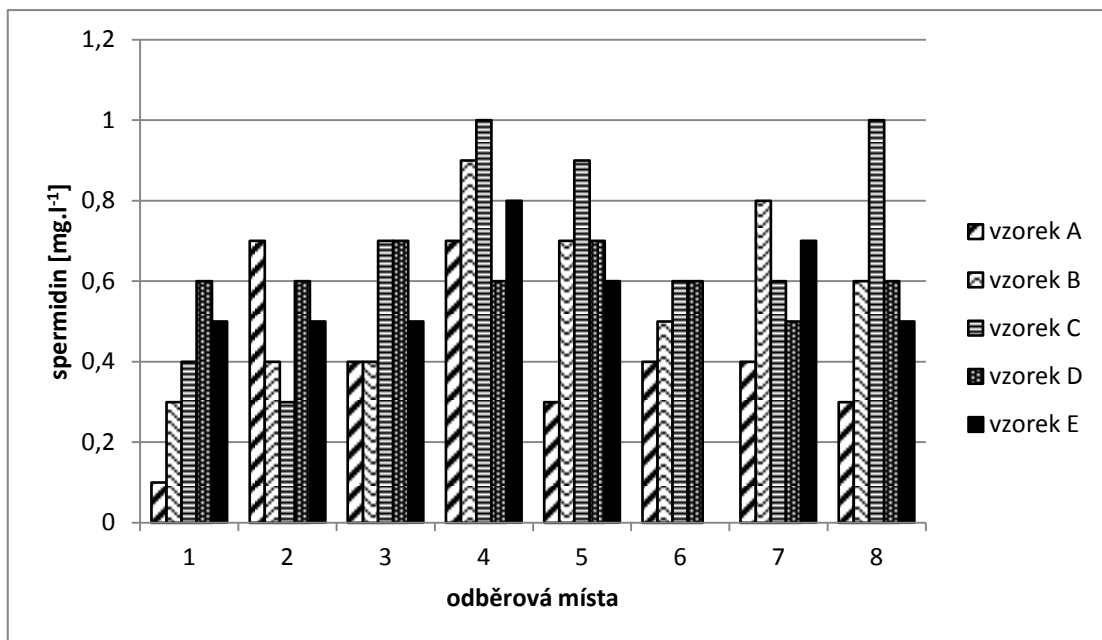
Ve vzorku E byl detekován nejnižší obsah tyraminu ze všech vzorků na začátku kvašení (v odběrovém bodě č.1), kde bylo naměřeno $1,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Dále došlo k výraznějšímu vzestupu po desetidenním dokvašování ve sklepě (v bodě 3 koncentrace $3,4 \text{ mg.l}^{-1}$). Hodnoty dále stoupaly směrem ke konci dokvašování, po 20 dnech a na konci dokvašování (v bodech 4 a 5) byly nejvyšší ze všech vzorků v daných místech (5 mg.l^{-1} a $6,4 \text{ mg.l}^{-1}$). Poslední výraznější vzestup byl u tohoto vzorku zaznamenán na konci skladování (v odběrovém místě č. 8), kde bylo detekováno $8,7 \text{ mg.l}^{-1}$.

6.2.4 Obsah spermidinu

Biogenní amin spermidin byl ve zkoumaných vzorcích piv detekován sice v malých množstvích, ale ve všech vzorcích na všech odběrových místech. Nutno však podotknout, že množství spermidinu ve vyráběných vzorcích nepřekročilo hodnotu 1 mg.l^{-1} . Obsah spermidinu zobrazuje graf 9, který popisuje vývoj spermidinu v jednotlivých vzorcích.

Vývoj spermidinu v jednotlivých vzorcích piv opět nevykazoval pouze rostoucí tendenci obsahu tohoto BA, nýbrž každý vzorek zaznamenal jak rostoucí, tak klesající trendy během výrobního procesu.

Ve vzorku A bylo po sespílání na začátku kvašení (v 1. odběrovém místě) detekováno nejmenší množství spermidinu ze všech vzorků. Hodnota jeho obsahu byla pouze $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Po hlavním kvašení (ve 2. bodě) obsah stoupl na $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$, což znamenalo zase nejvyšší detekované množství v daném místě. Poté obsah spermidinu opět klesl na $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ (nejmenší množství spolu se vzorkem B) a po 20 dnech dokvašení (v bodě 4) vzrostl na $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$. Na konci dokvašování (odběrové místo 5) byla zaznamenána opět nejnižší hodnotu spermidinu u vzorku A ($0,3 \text{ mg.l}^{-1}$). Následně se již trend obsahu do konce odběru nijak výrazněji nezměnil (v bodech 6, 7, 8 nejnižší obsahy ze všech).

Graf 9: Obsah spermidinu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.

Obsah spermidinu ve vzorku B v prvních třech bodech pozvolna stoupal (bod 1 obsahoval $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$, bod 3 $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$) a po 20-ti dnech dokvašování (ve 4. bodě) stoupl výrazněji na $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$. Poté byl zaznamenán pokles v bodech 5 i 6 až na $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, na začátku skladování hotového piva (v bodě 7) pak koncentrace vzostla na $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ (nejvyšší hodnota v tomto místě ze všech vzorků) a v posledním odběrném bodě opět pokles na $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$.

Vzorek C obsahoval na počátku fermentace (v 1. kontrolním bodě) $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$, ve 2. mírně klesl na $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ (nejnižší hodnota v tomto místě) a poté výrazněji stoupal na $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ po 10-ti denním dokvašování (v bodě 3) a 1 mg.l^{-1} po 20-ti denním dokvašování (v bodě 4) (nejvyšší hodnota v tomto místě). Od odběrového místa 4 obsah znovu klesal, na konci dokvašování (v bodě 5) bylo detekováno $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$ (nejvyšší hodnota v tomto místě ze všech vzorků). Pokles hodnot pokračoval až do začátku skladování hotového piva (do bodu 7), kde bylo detekováno $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$. V posledním odběrovém bodě obsah spermidinu ve vzorku C opět stoupl na 1 mg.l^{-1} (opět jednoznačně nejvyšší hodnota ze všech vzorků v odběrovém místě 8).

Vzorek D vykázal nejvyšší hodnotu ze všech vzorků na začátku kvašení (v odběrovém místě č. 1), kde bylo detekováno $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Dále mírně stoupal do bodu 3, kde bylo $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ a pak klesal v bodě 4, zde se obsah pohyboval znovu $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (nejnižší ze všech v daném bodě). Na konci dokvašování (v bodě 5) následoval opět vzestup a v odběrových

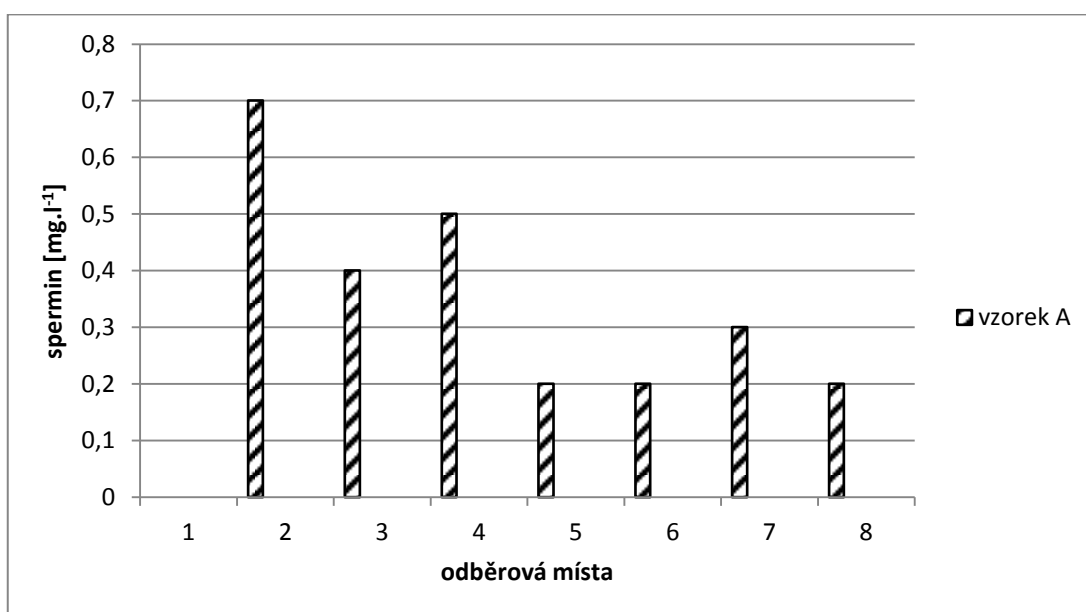
místech 6, 7 pokles až na $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, poté na konci skladování bylo opět pozorováno zvýšení obsahu na $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$.

Vzorek E vykazoval v prvních třech bodech vyrovnané hodnoty $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, které se zvýšily až po 20 dnech dokvašování (ve 4. bodě) na $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$, poté opět klesly na $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ na konci dokvašování. Na začátku skladování (v bodě 7) se ještě mírně zvýšily na $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ a po 20-ti dnech skladování (v 8. bodě) znovu klesly na $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$.

6.2.5 Obsah sperminu

Biogenní amin spermin byl detekován pouze u vzorku A. Spermin ve vzorku A nebyl zaznamenán ve všech odběrových místech – na začátku hlavního kvašení nebyl detekován. Obsah sperminu ve vzorku A je velmi nízký a je zaznamenán v grafu 10.

Graf 10: Obsah sperminu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.



Vývoj obsahu sperminu ve vzorku A můžeme sledovat od konce hlavního kvašení (od druhého odběrného místa), kde byla jeho hodnota nejvyšší $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$. Dále ve 3. odběrném bodě obsah poklesl na $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ a po 20 dnech dokvašování (ve 4. odběrovém místě) opět stoupl na $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Na konci dokvašování (v 5. odběrném bodě) byl zaznamenán pokles na nejnižší hodnotu $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a na této hladině obsah sperminu, s malým zvýšením na začátku skladování hotového piva (v bodě 7) na $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$, již zůstal.

Budeme-li se v této části diskuse zabývat výsledky vývoje jednotlivých biogenních aminů ve zkoumaných vzorcích, můžeme si povšimnout jak množství konkrétních BA ve vzorcích tak trendů, které vykazovaly během výrobního procesu.

Pokud se podíváme na výsledky jednotlivých BA je zde patrné, že analyzované vzorky piva obsahovaly některé biogenní aminy, které během procesu zaznamenaly vyšší hladiny (zejména kadaverin – maximální hodnota 33 mg.l^{-1} ve vzorku C, také putrescin – maximální hodnota $12,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ve vzorku C a případně u některých vzorků i tyramin – maximální hodnota $12,8 \text{ mg.l}^{-1}$ ve vzorku A). A pak některé BA s minimálními detekovanými hodnotami (u některých vzorků tyramin - např. $5,2 \text{ mg.l}^{-1}$ u vzorku D, dále spermidin – maximální hodnota 1 mg.l^{-1} ve vzorku C či spermin u vzorku A maximální hodnota $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$) nebo nebyly detekovány ve vzorcích vůbec (tryptamin, fenylethylamin, histamin). Křížek a Kalač[35] uvádějí, že biogenní aminy putrescin, spermidin, spermin a agmatin mohou pocházet spíše ze sladu, zatímco histamin, tyramin a kadaverin obvykle indikují aktivity kontaminujících mikroorganismů během výrobního procesu. V kontextu tohoto zjištění a návaznosti na výsledky zpracovávané práce je možné doporučit, zejména s ohledem na obsah kadaverinu ve zkoumaných vzorcích zvýšenou hygienicko - mikrobiologickou kontrolu zejména studené části výrobního procesu (spílání, hlavní kvašení a dokvašování piva).

Obsah kadaverinu poměrně výrazně vzrostl u některých vzorků (vzorky A, B, C) během hlavního kvašení (podobný trend během hlavní fermentace zaznamenal ve své práci Kalač et.al.[42], který detekoval během hlavního kvašení i tryptamin a histamin). Během zrání piva se obsah kadaverinu v těchto vzorcích dále zvyšoval, i když ne tak výrazně jako v předešlém technologickém kroku. U většiny zkoumaných vzorků došlo ke zvýšení obsahu kadaverinu také během 20-ti denního skladování hotových piv. K nejvyššímu zvýšení hodnoty od začátku skladování došlo u vzorku B (téměř o 10 mg.l^{-1}). Zvyšování hodnot kadaverinu i jiných BA během skladování piva uvádějí také Romero et.al.[38], Kalač et.al.[42],[44] a Loret et.al.[43]. Kadaverin byl podle dosažených výsledků analýzy biogenním aminem, který se svým nejvyšším obsahem ze všech BA, nejvíc podílel na celkovém obsahu BA ve zkoumaných vzorcích piva. V tomto kontextu vůbec nejvyšší množství bylo detekováno u vzorku C, který výrazně převyšoval ostatní vzorky a u něhož byla naměřena maximální hodnota 33 mg.l^{-1} po 20-ti denním skladování hotového piva (v 8. kontrolním bodě). Vzorek C dominoval také v obsahu putrescinu, tam ovšem s podstatně nižším maximem $12,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Z technologických odlišností od jiných vzorků, které by mohly

mít souvislost s vyššími obsahy zmíněných BA lze uvést větší sypání na várku (vyšší množství vstupní suroviny, která mohla BA obsahovat), dokvašování v jiném oddělení než ostatní vzorky. Naopak výrazně nejnižší hodnoty kadaverinu byly prokázány u vzorku E, který během celého výrobního procesu zaznamenal vyrovnaný trend vývoje tohoto BA (v rozmezí 0,7 – 2,1 mg.l⁻¹). Tento výsledek nepotvrzuje předpoklad o případném vysokém obsahu BA u pšeničných piv z důvodu výskytu bakterií mléčného kvašení jako součásti fermentační mikroflóry, jak publikoval ve svých závěrech Kalač et.al.[44]. V této souvislosti je možné říci, že kvasničná kultura vypropagovaná k zakvácení pšeničného piva byla dostatečně mikrobiologicky ošetřená a vedená v čistotě až do zakvácení, při kterém také nedošlo k výraznější kontaminaci, která by mohla znamenat i potenciálně zvýšené hladiny BA.

Druhým biogenním aminem s nejvyššími detekovanými koncentracemi byl putrescin s maximálním obsahem 12,2 mg.l⁻¹ ve vzorku C po 20 denním skladování. Trend významného zvýšení putrescinu při skladování (ale také kadaverinu, a u vzorku A, B, E i tyraminu) může indikovat (jak uvádí Kalač et.al.[44]) možnost tvorby těchto BA chemickým způsobem, v případě, že nebyly zaznamenány žádné sensorické změny piva způsobené mikrobiálním kažením. Poměrně malé koncentrace putrescinu obsahoval vzorek D (maximální hodnota 6,2 mg.l⁻¹ v hotovém pivu po 20 dnech skladování), který ovšem potvrdil trend všech vzorků v obsahu tohoto BA, tedy vzrůstající tendenci směrem od kvašení ke skladování finálního produktu.

Tyramin byl převažujícím aminem u vzorku E (hodnoty nad 5 mg.l⁻¹ byly detekovány po 20 dnech dokvašování piva a dále). Nejvyšší nárůst tyraminu během skladování byl zaznamenán u vzorku A (obsah vzrostl z 2,7 mg.l⁻¹ na 12,8 mg.l⁻¹) a také u vzorku B (z 2,4 mg.l⁻¹ na 9,3 mg.l⁻¹). Vzorky A a B byly meziprodukty při výrobě tmavých piv a při jejich výrobě byly použity 4 druhy sladů (barevný slad, karamelový slad, bavorský slad, český slad kap.5.1). Pokud by tyramin obsažený v těchto vzorcích pocházel z použitých surovin, nepotvrdila by se v tomto případě jen aktivita kontaminující mikroflóry během fermentace, jak uvádějí Křížek a Kalač[35], nýbrž původ BA i vně výrobního procesu. Velmi zajímavý je ovšem výrazný nárůst tyraminu během hlavní fermentace u vzorku D (ze 1,5 mg.l⁻¹ na 5,2 mg.l⁻¹), který naopak by mohl tyto tendence kontaminace během hlavního kvašení potvrdovat. Tyramin je také zmiňován v publikaci Izquierdo-Pulidem et.al.[36] v souvislosti s bakteriemi *Pediococcus* spp., kde se uvádí tyramin jako spolehlivý indikátor kontaminace těmito bakteriemi v procesu kvašení.

Obsahy spermidinu a sperminu ve zkoumaných vzorcích piv byly velmi nízké (pohybovaly se u spermidinu maximálně do 1 mg.l^{-1} a u sperminu do $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$). Pokud bychom obsahy těchto biogenních aminů vztáhli opět k použitým surovinám, Křížek a Kalač[35] v tomto kontextu zjistili, že spermidin a spermin obsažený ve sladu a pivovarských kvasnicích vykazoval vyšší hodnoty než v používaných chmelových preparátech. V této souvislosti můžeme uvést, že vezmeme-li v potaz množství používaných kvasnic a chmelových přípravků na jednu várku, pak slad je hlavním zdrojem BA pocházejících ze surovin. Spermin byl detekován pouze u vzorku A, kde bylo použito více druhů sladu (viz.výše) a tedy by mohl potvrzovat původ tohoto biogenního aminu v použitých surovinách.

Z vyhodnocených výsledků zpracovávané práce je zřejmé, že ve vybraných odběrových místech byly zaznamenány biogenní aminy a hlavně byl zaznamenán ve většině vzorcích postupný nárůst těchto látek směrem od meziproductů k finálnímu výrobku. Při tomto zjištění můžeme studenou část výrobního procesu, tedy hlavní kvašení, dokvašování mladého piva a skladování hotových výrobků označit za potenciálně rizikovou ve vztahu ke vzniku a vývoji biogenních aminů v pivu. Hlavně kadaverin, tyramin a histamin mohou mít svůj původ právě v těchto částech výroby piva. Zde je pozitivním faktem, že histamin ve zkoumaných vzorcích nebyl detekován vůbec, avšak kadaverin a tyramin naopak byly zjištěny u všech 5 analyzovaných typů piv. Nejvyšší obsahy kadaverinu byly detekovány u vzorků C, B a A. Dalším rizikovým faktorem v technologickém procesu výroby piva mohou být použité suroviny, zejména použitý slad, který může do piva vnášet biogenní aminy. Především detekovaný putrescin, spermidin a spermin mohou mít svůj původ v dodávaných surovinách. V tomto kontextu byl ve zkoumaných vzorcích nejvíce zastoupen putrescin, který vykazoval vysoké hodnoty zejména u vzorku C, na který bylo použito nejvyšší sypání (nejvyšší množství sladu na várku). Také vzorky A a B vykazovaly vyšší hodnoty putrescinu a zde je pravděpodobně významné použití 4 druhů různých sladů na jejich výrobu.

Pro snižování potenciálních rizik spojených se vznikem BA je tedy potřeba na pivovarskou výrobu nahlížet komplexně i se vstupními surovinami, což nemusí být v dnešní době jednoduché. Používaný slad se již nevyrábí v rámci jednoho podniku, nýbrž se pro pivovarské účely nakupuje v samostatných obchodních sladovnách. Z tohoto pohledu je nutné, aby dodavatelé vstupních surovin garantovali výrobci piva výtečnou kvalitu dodávaných surovin, prostých jakékoliv zvýšené kontaminace, která by mohla mít svůj původ při produkci těchto surovin. Pokud jde o snižování rizik vzniku BA spojených s technologickým pivovarským procesem, zde je nasnadě zaměření pozornosti na hygienickou kvalitu výrobního

procesu zejména v rizikových místech výroby (popsaných v tomto textu výše). Dále by mohla být zajímavá mikrobiologická návaznost na výsledky zjištěné v této práci. Zejména by se mikrobiologickým rozbořem dotčených míst výrobního procesu mohla potvrdit případná návaznost na mikrobiální kontaminaci během výroby. V tomto směru by mohla být zajímavá vyšetření zejména na mléčné bakterie – laktobacily i pediokoky. Případné sanitční nedostatky by bylo možné odhalit i pomocí stanovení mikrobiologické čistoty kvasnic.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na monitoring obsahu biogenních aminů během výrobního procesu u vybraných vzorků pív. V teoretické části byly popsány technologické principy výroby piva klasickou technologií a také výroba některých specifických skupin pív (pivo pšeničné, speciální a nealkoholické). Dále bylo v této části pojednáno o biogenních aminech s důrazem na jejich vznik a výskyt v pivu.

V experimentální části práce byla nejprve zvolena potenciálně riziková místa v průběhu technologického procesu výroby piva a ta byla následně označena jako odběrová místa, ve kterých byly postupně odebírány všechny vytypované vzorky. Všechny vzorky ze 3 sérií odběrů byly následně derivatizovány dansylchloridem a analyzovány metodou HPLC s UV detekcí. Vzorky byly analyzovány na tyto BA: tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin. Výsledky byly zpracovány a interpretovány ve dvou částech – nejprve celkový obsah BA ve zkoumaných vzorcích a poté byly diskutovány jednotlivé detekované BA.

Z uvedených BA nebyly ve vzorcích detekovány tryptamin, fenyletylamin ani histamin. Ostatní BA byly detekovány ve všech vzorcích (s výjimkou sperminu, ten byl prokázán pouze u vzorku A). Nejvyšší celkový obsah BA byl detekován ve vzorku C (světlé speciální pivo s EPM 14 %) v hotovém pivu po 20-ti denním skladování, zde bylo zjištěno 52,8 mg.l⁻¹. Při bližším zkoumání jednotlivých BA byly naměřeny nejvyšší hodnoty u kadaverinu, který tak můžeme označit jako limitující biogenní amin této pivovarské výroby. Opět nejvyšší obsah kadaverinu byl detekován u vzorku C, kde na konci skladování hotového piva bylo naměřeno 33 mg.l⁻¹.

Z výše uvedených výsledků je možné vyvodit závěr, že pivovarská výroba je z pohledu vzniku a vývoje biogenních aminů významná a výsledné detekce BA potvrdily zejména tyto rizikové fáze výroby:

- použité suroviny pro výrobu piva (zejména dodávané slady),
- hlavní fermentační proces v prostorách spilek v otevřených kvasných kádích,
- 20-ti denní dokvašování mladého piva až konec dokvašování v ležáckých tancích v prostorách ležáckých sklepů,
- skladování hotového stočeného piva (v této práci 20 dní v lahvi).

Legislativní limit pro BA je Nařízením EP a Rady (ES) 2073 O mikrobiologických kritériích pro potraviny (2005) stanoven jen pro histamin u ryb na $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U ostatních potravin žádné závazné limity obsahu těchto látek nejsou legislativně stanoveny. Tato práce (i četné další výzkumy těchto látek) svými výsledky obsahu BA (v této práci zejména také obsah kadaverinu) potvrzuje, že fermentované potraviny jsou potenciálně rizikové v souvislosti se vznikem biogenních aminů během jejich výroby a vyšší obsahu těchto látek v hotových výrobcích.

Pro snižování BA v pivovarské praxi je důležitá těsná návaznost na kvalitu dodávané suroviny a dále dobrá úroveň hygieny a sanitace zejména v nejrizikovějších fázích výroby a v neposlední řadě také dobře fungující mikrobiologická kontrola meziproductů výroby a výrobních prostor.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BASAŘOVÁ G., ŠAVEL J., BASAŘ P., LEJSEK T. *Pivovarství*. VŠCHT, Praha 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [2] BASAŘOVÁ G., HLAVÁČEK I. *České pivo*. 2. vyd. NUGA, Praha 1999. ISBN 80-85903-08-3.
- [3] KADLEC P., MELZOCH K., VOLDŘICH M. a kol. *Co byste měli vědět o výrobě potravin. Technologie potravin*. KEY PUBLISHING, Ostrava 2009. ISBN 978-80-7418-051-4
- [4] ROP O., HRABĚ J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. UTB, Zlín 2009. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [5] KOSAŘ K., PROCHÁZKA S. *Technologie výroby sladu a piva*. VÚPS, Praha 2000. ISBN 80-902658-6-3.
- [6] ČEPIČKA J. *Obecná potravinářská technologie*. VŠCHT, Praha 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [7] KADLEC P. *Technologie potravin II*. VŠCHT, Praha 2002. ISBN 80-7080-510-2.
- [8] PELIKÁN M., DUDÁŠ F., MÍŠA D. *Technologie kvasného průmyslu*. MZLU, Brno 2002. ISBN 80-7157-578-x.
- [9] BARTŮŇKOVÁ J. *Potravinové alergie* [online] Dostupný z [www:<http://www.vesmir.cz/>](http://www.vesmir.cz/).
- [10] LEJSEK T. *Hospodárnost vyslazování mláta*. KVASNÝ PRŮMYSL, Praha 1989. KVPRAB 35(7)193-224(1989).
- [11] BASAŘOVÁ G., ČEPIČKA J. *Sladařství a pivovarství*. SNTL, Praha 1985.
- [12] CHLÁDEK L. *Pivovarnictví*. GRADA, Praha 2007. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [13] ŠILHÁNKOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. ACADEMIA, Praha 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [14] BASAŘOVÁ G. *Vývoj teorie a praxe kvašení a dokvašování piva*. KVASNÝ PRŮMYSL, Praha 2002. 48(3).
- [15] KAHLER M., VOBORSKÝ J. *Filtrace piva* SNTL, Praha 1981.
- [16] ŠROGL J., FAMĚRA J., GUBIŠ J., BOUŠOVÁ P. *Příspěvek k problematice filtrovatelnosti piva*. KVASNÝ PRŮMYSL, Praha 1996. 42(9).
- [17] POSSIN K. a R. *Základní kniha zdravé výživy*. FONTÁNA 2002. ISBN 80-7336-013-6

- [18] SILLA-SANTOS M.H. *Biogenic amines: their importance in foods*. Int. J. of Food Sci. 1996. 29.
- [19] VELÍŠEK J. HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin II*. OSSIS, Tábor 2009, ISBN 978-80-86659-16-9
- [20] ANCÍN-AZPILICUETA C., GONZALES-MARCO A., JIMENEZ-MORENO N. *Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008. 48: 257 – 275, ISSN 1040-8398.
- [21] SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJDUS B., KUBÁŇ V. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. CHEMICKÉ LISTY, 2004, 98.
- [22] RUIZ-CAPILLAS C., JIMÉNEZ-COLMENERO F. *Biogenic amines in meat products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004. 44.
- [23] KRÍŽEK M., KALAČ P. *Biogenní aminy a polyaminy a jejich role ve výživě*. Czech J. Food Sci., 1998. 16.
- [24] GIUFFRIDA D., ZIINO M., VERZERA A., CONDURSO C., ROMERO V. *Biogenic amines in a typical „Pasta Filata“ italian cheese*. Acta Alimentaria, 2006. Vol. 35(4).
- [25] ÖZOGUL F., ÖZOGUL Y. *The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures*. Eur. Food Res. Technol., 2007. 225.
- [26] SUZZI G., GARDINI F. *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review*. Int. J. of Food Microbiology, 2003. 88. Issue 1.
- [27] KOMPRDA T., NEZNALOVÁ J., STANDARA S., BOVER-CID S. *Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage*. Meat Science, 2001. 59.
- [28] BOVER-CID S., IZQUIERDO-PULIDO M., VIDAL-CAROU M.L. *Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages*. Journal of Food Protection, 2000, Vol. 63 No.11.
- [29] HALÁSZ A., BARÁTH Á., SIMON-SARKADI L., HOLZAPFEL W. *Biogenic amines and their production by microorganismus in food*. Trends in Food Science and Technology, 5, 1994.
- [30] ROIG-SAGUÉS A.X., RUIZ-CAPILLAS C., ESPINOSA D., HERNÁNDEZ M. *The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on*

their formation. Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates, 2009.

[31] KALAČ P., GLÓRIA M.B.A. *Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut*. Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates. 2009.

[32] MAYER K. *Biogene amine in Lebensmitteln, Einige Untersuchungen in Wein und Sauerkraut*. Qualitas Planarum Plant Foods for Human Nutrition 26, 1/3, 1976.

[33] OTÁHAL J., KRAUSOVÁ J., ŠPINAR B. *Studium biogenních aminů v Jihomoravských vínech*. Zborník z XV. celoštátnej konferencie zo zahr. účast'ou. Cudzorodé látky v poživatinách (5), 1991.

[34] MORENO-ARRIBAS M.V., POLO M.C. *Wine chemistry and biochemistry*. Springer Science, Madrid, 2009.

[35] KALAČ P., KRŽÍZEK M. *Review of biogenic amines and polyamines in beer*. Journal of the institute of brewing, 2003, Vol. 109, No. 2.

[36] IZQULERDO-PULIDO M., HERNÁNDEZ-JOVER T., MARINÉ-FONT A., CARMEN VIDAL-CAROU M. *Biogenic amines in European beers*. Food Chemistry, 1996, ISSN S0021-8561.

[37] ERLETTI M., MARCONI O., BRAVI E., PERRETTI G., MONTANARI L., FANTOZZI P. *HACCP in malting and brewing production chain: Mycotoxin, nitrosamine and biogenic amines risks*. Italian Journal of Food Science, 21, 2009.

[38] 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, 376, 2003.

[39] KALAČ P., ŠVECOVÁ S., PELIKÁNOVÁ T. *Levels of biogenic amines in typical vegetable products*. Food Chemistry, 77, 2002.

[40] LORENCOVÁ E., BUŇKOVÁ L., PLEVA P., BUŇKA F., MATOULKOVÁ D., DRÁB V. *In vitro produkce biogenních aminů technologicky významnými bakteriemi mléčného kvašení*. In: Sborník Konference Proteiny, Zlín, 2011.

[41] 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, 100, 2007.

- [42] KALAČ P., HLAVATÁ V., KRÍŽEK M. *Concentration of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation*. Food Chemistry, 58, 1997.
- [43] LORET S., DELOYER P., DANDRIFOSSE G. *Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation proces: Data from Belgian samples*. Food Chemistry, 89, 2005.
- [44] KALAČ P., ŠAVEL J., KRÍŽEK M., PELIKÁNOVÁ T., PROKOPCOVÁ M. *Biogenic amine formation in bottled beer*. Food Chemistry, 79, 2002.
- [45] ROIG-SAGUÉS A.X., MOLINA A.P., HERNÁNDES-HERRERO I. *Histamine and tyramine – forming microorganismus in Spanish traditional cheeses*. Eur. Food Res. Technol., 215, 2002.
- [46] HUGAS M., GARRIGA M., AYMERICH M.T. *Functionalty of enterococci in meat products*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 88, Issues, 2003.
- [47] ÖNAL A. *A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods*. Food Chemistry, 103, 2007.
- [48] KUNG H.F., LEE Y-H., TENG D-F., HSIEH P-CH., WEI CH-I., TSAI Y-H. *Histamine formation by histamine-forming bacteria and yeast in mustard pickle products in Taiwan*. Food Chemistry. Vol. 99, Issue 3, 2006.
- [49] BOVER-CID S., HOLZAPFEL W.H. *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria*. Int. J. of Food Microbiology, 53, 1999.
- [50] ZÁKON č. 110/1997 sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. *Vyhl. č. 335/1997sb. 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*.
- [51] BASAŘOVÁ G. et. al. *Pivovarsko-sladařská analytika, část 3*, MERKANTA, Praha, 1993.
- [52] POTĚŠIL V. *Výroba nealkoholického piva vakuovou destilací*. KVASNÝ PRŮMYSL, 54(5), Praha, 2008.
- [53] MADIGAN D., McMURROUGH I. *Rapid determination of 4-vinyl guaiacol and ferulic acid in beers and worts by HPLC*. J. Am. Soc. Brew. Chem., 52(4), 1994.
- [54] BASAŘOVÁ G. *Jak se vyrábí nízkoalkoholické a nealkoholické pivo*. [on line] Dostupný z [www:http://www.vesmír.cz/](http://www.vesmír.cz/).
- [55] MAINZ L., NOVAK N. *Histamine and histamine intolerance*. Am. J. Clin. Nutr. 85

- [56] KOMPRDA T., DOHNAL V., ZÁVODNÍKOVÁ R. *Contents of some biologically active amines in Czech cheese*. J. Food Sci. Vol. 26 No. 6, 2008.
- [57] DADÁKOVÁ E., KRÍŽEK P., PELIKÁNOVÁ T. *Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography*. Food Chemistry, 116, 2009.
- [58] SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJDUS B., KUBÁŇ V. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chemické listy, 98, 2004.
- [59] *Chromatografické metody* [online]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B2.htm
- [60] KOMPRDA T. *Obecná hygiena potravin*. MZLU, Brno 2007, ISBN 978-80-7157-757-7
- [61] 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, 118, 2, 213 – 216.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

- EBC European Brewery Convention.
- EK Z německého Entkeimung=odzárodkovací.
- PVPP Polyvinylpolypyrrolidon.
- EPM Extrakt původní mladiny.
- BA Biogenní aminy.
- MAO Monoaminoxidáza.
- ŽPČ Žatecký poloranný červeňák.
- HPLC Vysoce účinná kapalinová chromatografie.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr.č.1. : Schéma vzniku biogenních aminů z prekurzorů str. 37
- Obr.č.2. : Blokové schéma kapalinového chromatografu str. 50

SEZNAM TABULEK

Tab. I - Typy vyráběných piv použité k analýze a jejich kódování	str. 45
Tab. II – Lineární gradientový eluční program HPLC	str. 50

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku A.	str. 51
Graf 2: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku B.	str. 52
Graf 3: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku C.	str. 53
Graf 4: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku D.	str. 54
Graf 5: Celkový obsah biogenních aminů (mg.l^{-1}) ve vzorku E.	str. 55
Graf 6: Obsah kadaverinu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.	str. 58
Graf 7: Obsah putrescinu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.	str. 60
Graf 8: Obsah tyraminu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.	str. 62
Graf 9: Obsah spermidinu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.	str. 64
Graf 10: Obsah sperminu (mg.l^{-1}) ve zkoumaných vzorcích.	str. 66