



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## STANOVENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ V ZAHRANIČNÍCH PIVECH

DETERMINATION OF SELECTED PARAMETERS IN FOREIGN BEERS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Burešová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1006/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Lenka Burešová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Stanovení vybraných parametrů v zahraničních pivech

### Zadání bakalářské práce:

- 1) zpracování literární rešerše k tématu práce
- 2) analýza vybraných polyfenolických látek ve vzorcích piv
- 3) analýza organických kyselin ve vzorcích piv
- 4) elementární analýza vzorků piv
- 5) zpracování naměřených výsledků, diskuse a formulace závěru práce

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Lenka Burešová  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Cílem této práce je stanovení vybraných polyfenolů, organických kyselin a prvků (makroelementů a mikroelementů) v zahraničních pivech. V teoretické části jsou kromě výroby sladu a piva popsány druhy piv a pivní styly a analytické metody pro analýzu piv jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie, iontová chromatografie a optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou. Experimentální část se zabývá přípravou vzorků, kalibračních roztoků, nastavením přístrojů a analýzou vzorků zahraničních piv. Celkem bylo analyzováno 14 zahraničních piv, z toho 11 vzorků bylo svrchně kvašených piv, 3 vzorky byly spodně kvašené. Celkem čtyři vzorky pocházely z Belgie, tři z Anglie, tři z Německa, dva z USA, jeden z Nizozemí a jeden z Polska. Výsledky práce podávají přehled o obsahu analyzovaných látek v zahraničních pivech.

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis is determination of selected polyphenols, organic acids and elements (major and minor) in a foreign beers. Production of malt, beer production, beer types and beer styles are described in the theoretical part. Also analytical methods of beer analysis such as high performance liquid chromatography, ion chromatography and inductively coupled plasma optical emission spectrometry are described. The Experimental part deals with preparation of samples and calibration solutions, setting devices up and analysis of foreign beers samples. There were analyzed 14 foreign beers of which 11 samples were top-fermented beers, 3 samples were bottom-fermented. Four samples were produced in Belgium, three in England, three in Germany, two in the US, one in Holland and one in Poland. The results give an overview of the contents of compounds in foreign beers.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

zahraniční piva, polyfenoly, organické kyseliny, prvková analýza, HPLC, IC, ICP-OES

## **KEYWORDS**

foreign beers, polyphenols, organic acids, elemental analysis, HPLC, IC, ICP-OES

BUREŠOVÁ, L. *Stanovení vybraných parametrů v zahraničních pivech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 51 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky a za čas, který mi věnoval.

# OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Suroviny pro výrobu piva.....	8
2.1.1	Slad.....	8
2.1.1.1	Výroba sladu.....	8
2.1.2	Chmel.....	10
2.1.2.1	Chemické složení chmelu.....	11
2.1.3	Voda.....	13
2.1.3.1	Významné ionty obsažené ve varní vodě.....	14
2.1.4	Kvasinky.....	16
2.1.4.1	Svrchní a spodní pivovarské kvasinky.....	16
2.1.4.2	Chemické složení pivovarských kvasinek.....	17
2.1.4.3	Tvorba metabolitů při kvašení.....	17
2.2	Výroba piva.....	18
2.2.1	Příprava mladiny.....	18
2.2.2	Kvašení mladiny a dokvašování piva.....	20
2.3	Druhy piv.....	22
2.4	Analytické metody pro analýzu piva.....	23
2.4.1	Chromatografie.....	23
2.4.2	Kapalinová chromatografie.....	24
2.4.2.1	Čerpadla.....	24
2.4.2.2	Zařízení pro dávkování vzorků.....	24
2.4.2.3	Detektory pro HPLC.....	24
2.4.2.4	Kolona ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	25
2.4.2.5	Náplně kolon pro HPLC.....	25
2.4.2.6	Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi, RPC.....	25
2.4.3	Iontově-výměnná chromatografie.....	26
2.5	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-OES).....	26
2.5.1	Instrumentace ICP-OES.....	26
2.5.1.1	Zmlžování vzorku, mlžná komora.....	27
2.5.1.2	Budicí zdroj.....	27
2.5.1.3	Optický systém.....	28

2.5.1.4	Detektory.....	28
2.5.2	Analytické využití OES.....	29
3	Experimentální část.....	30
3.1	Seznam chemikálií.....	30
3.2	Seznam laboratorních pomůcek.....	31
3.3	Přístroje.....	31
3.3.1	Ultrazvuk.....	31
3.3.2	HPLC.....	31
3.3.3	IC.....	32
3.3.4	ICP-OES.....	33
3.4	Popis analyzovaných vzorků .....	33
3.5	Příprava vzorků.....	35
3.6	Příprava kalibračních roztoků.....	35
4	Výsledky a diskuze.....	36
4.1	Analýza vzorků.....	36
4.1.1	Analýza polyfenolických látek pomocí HPLC.....	36
4.1.2	Analýza organických kyselin pomocí IC .....	41
4.1.3	Prvková analýza pomocí ICP-OES .....	43
5	Závěr.....	46
	Seznam použitých zdrojů .....	47
	Seznam použitých obrázků.....	50
	Seznam použitých zkratk.....	51

# 1 ÚVOD

Pivo a jeho výroba sahá hluboko do historie života člověka. Již před 7 000 lety se v Mezopotámii vyráběly kvašené nápoje z obilovin, které se považují za předchůdce dnešní podoby piva.

Tento celosvětově oblíbený alkoholický nápoj je hojně podrobován nejrůznějším analýzám a zkouškám za účelem zjištění celkového chemického složení, lepšího poznání vzniku a zániku sloučenin během fermentace piva nebo případných chemických změn při jeho zrání a skladování. Pivo jako komplexní matrice obsahuje mnoho sloučenin působících na lidské zdraví. Tento nápoj je významným zdrojem vitaminů (převážně skupiny B). Dále obsahuje minerální látky, např. sodík, draslík, fosfor, hořčík a vápník, které mají vliv na fungování lidského organismu. Pivo se také vyznačuje vysokou antioxidační aktivitou.

Teoretická část této práce se zabývá jednotlivými surovinami používanými v pivovarnictví, jejich chemickým složením a vlivem na organoleptické vlastnosti piva a výrobou piva. Dále se zabývá problematikou analytických metod, pomocí kterých se piva analyzují. Jednou z významných metod je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Díky ní je možné detekovat a identifikovat polyfenoly, které mají antioxidační účinky a mají vliv na koloidní stabilitu. Organické kyseliny, obsažené v pivu, je možné analyzovat pomocí iontové chromatografie. Pro analýzu minerálních látek je vhodná optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou.

Experimentální část bakalářské práce se zaměřuje na metodiku a postupy analýz. Klíčové je vhodné nastavení přístrojů pro analýzu daných látek, stanovení mezí detekce a kvantifikace a důležitá je také vhodná úprava vzorků a jejich případné ředění.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení vybraných látek v zahraničních pivech, porovnání výsledků analýz napříč pivními styly a nalezení případných shod mezi vzorky nebo s hodnotami uváděnými dostupnou literaturou.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Suroviny pro výrobu piva

#### 2.1.1 Slad

Sladařství je potravinářské průmyslové odvětví zabývající se výrobou sladu jako hlavní suroviny pro pivovarský průmysl. Hlavními produkty jsou světlé, tmavé a speciální slady. Pro výrobu sladu jsou základními surovinami ječmen a voda, popř. při výrobě pšeničného piva pšenice [1].

Pro účely sladařského průmyslu se využívá ječné zrnko (obilka), které se morfologicky skládá z obalových částí (pluch a plušek), zárodku (klíčku, embrya), z něhož při klíčení vycházejí podněty k aktivaci enzymů v celém zrně, a z endospermu, který zaujímá největší část obilky. Je hlavním zdrojem zásobních sacharidů, bílkovin a dalších složek nutných při vytváření charakteristických vlastností sladu a následně využívaných v pivovarském procesu [1].

U sladovnického ječmene se posuzují pěstitelské vlastnosti (výnos, odolnost, náročnost) a sladařské vlastnosti, tedy chemické složení a vhodnost pro výrobu sladu. Při chemickém rozboru se sleduje především obsah vody, škrobu a dusíkatých látek. Nejvíce jsou zastoupeny sacharidy, které tvoří 80 % hmotnosti zrna. Výrazně převažují polysacharidy, jež se dělí na škrobové ( $\alpha$ -glukany) a neškrobové ( $\beta$ -glukany) podle převažujícího typu glykosidových vazeb. Až 65 % hmotnosti zrna kvalitních sladovnických odrůd tvoří škrob. Škrob se v zrně akumuluje jako rezervní polysacharid  $\alpha$ -glukanového typu a je lokalizován v endospermální části zrna. Přibližně 10 % hmotnosti ječného zrna tvoří neškrobové polysacharidy jako je celulóza, hemicelulóza, pentosany a lignin. Zvýšený obsah  $\beta$ -glukanů ztěžuje sladařské a následně pivovarské zpracování z důvodu snížené přístupnosti škrobových zrn enzymům, dále dochází ke zvyšování viskozity roztoků a snížení koloidní stability piva. Dusíkaté látky jsou v zrně přítomny převážně ve formě rozpustných frakcí albuminů, globulinů, hordeinů a glutelinů. Pro sladařské a pivovarské účely je jejich obsah optimální v rozsahu 10–11,5 % [1].

##### 2.1.1.1 Výroba sladu

Ječmen po sklizni není schopen klíčit, a proto je nutné ho několik týdnů nechat dozrát. Jedná se tzv. dormanci ječmene, kdy dochází k oxidačnímu odbourávání inhibitorů a aktivaci stimulatorů klíčení [1].

Cílem sladování je vyrobit z ječmene slad, který obsahuje potřebné enzymy, aromatické a barevné látky klíčové pro výrobu piva. Sladováním ječmene se vytvoří optimální podmínky pro klíčení zrn, přičemž dochází v zrně k aktivaci a tvorbě cytolytických, proteolytických a amylolytických enzymů, při potlačeném růstu. Vzniká tak zelený slad a hvozdením za zvýšené teploty, kdy se tvoří aromatické a barevné látky, vznikne hotový slad [1].

#### Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene

Po příjmu se ječmen váží, zjišťuje se obsah vody, bílkovin, nečistot a také klíčivost. Poté je nutné ječmen zbavit prachu a nečistot a roztržít ho podle velikosti a kvalitativních znaků.

Skladovaný ječmen se nachází v klidovém stavu neboli dormanci, kdy je inhibitory dorminy potlačena jeho klíčivost. Oxidativním odbouráním dorminů a aktivací stimulatorů giberelinů je zrno schopné klíčit. Nezbytný je také přístup kyslíku, aby metabolismus zrna nepřešel z dýchání v kvašení [1].

### **Máčení ječmene**

Pro optimální průběh klíčení je důležité zvýšit obsah vody v zrně z 12–15 % na 42–48 %. Dosažený obsah vody v namočeném ječmeni se nazývá stupeň domočení. Příjem vody zrnem je ovlivňován teplotou vody, velikostí zrna, přístupem kyslíku, chemickým složením máčecí vody a také technologií máčení [1].

Do neporušeného zrna se voda dostává převážně jeho spodní částí přes zárodek a částečně horní částí. Přes polopropustné oplodí a osemení proniká pouze čistá voda, soli v máčecí vodě do zrna nepronikají a naopak ze zrna se nedostávají látky do prostředí [1].

S přibývajícím obsahem vody zrno začíná dýchat, spotřebovává tedy kyslík a uvolňuje do prostředí oxid uhličitý. Příliš vysoký obsah oxidu uhličitého může vést k nechtěnému zkvašování ječmene za vzniku ethanolu, proto je nutné zrno stále provzdušňovat a oxid uhličitý odčerpávat [1].

Máčení ječmene probíhá ve válcovitých nádobách s kónickým dnem zvaných náduvníky a celý proces trvá obvykle 60 až 90 hodin. Máčecí voda se několikrát vyměňuje [1].

### **Klíčení ječmene**

Klíčení probíhá ve velkých prostorách – humnech. Jedná se o fyziologický proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjí zárodky kořínků a listů pomocí zásobních látek umístěných v endospermu. Působením enzymů dochází ke štěpení rezervních látek, zvyšuje se rozpustnost a luštitelnost endospermu. Při klíčení je důležitá aktivace a tvorba určitých enzymů, jenž se řadí do skupin fosfatas, cytas, proteas a amylas. Fosfatasy napomáhají kyselým reakcím, a tím činnosti ostatních enzymů. Cytasy napomáhají k cytolytickému rozluštění ječmene, kdy se v zrně vlivem štěpení neškrobových polysacharidů zpřístupňuje škrob a bílkoviny v endospermu. Zrno je poté křehké a měkké. Rezervní škrob endospermu se amylasami štěpí na maltosu a glukosu [1].

Průběh enzymatických reakcí je ovlivňován stupněm domočení, teplotou hromad a přístupem kyslíku k zrnům. Obsah vody v ječmeni ovlivňuje rychlost přenosu zásobních látek a enzymů. Při nízké vlhkosti zrno klíčí velice pomalu, až zavadá a naopak vysoká vlhkost způsobuje zahřívání hromad. Oba případy vedou k vysokým ztrátám sladu. Teplota ovlivňuje průběh enzymových reakcí, optimální teplota hromady je 14–18 °C a liší se podle druhu vyráběného sladu. Kyslík je klíčový pro dýchání zrna. Oxid uhličitý vznikající při klíčení zpomaluje nebo až zatahuje aerobní dýchání, proto je nutné hromady ječmene přehazovat a provětrávat, aby se hromada vyvětrala a oxid uhličitý odstranil. Konečným produktem klíčení je zelený slad [1].

## Hvozdění ječmene

V zeleném sladu je nutné snížit obsah vody pod 4 %, aby došlo k zastavení vegetačních procesů a nedošlo k zastavení enzymové aktivity. Děje se tak sušením a hvozděním v nadbytku vzduchu při 20–60 °C a v slabém proudu vzduchu při 60–80 °C u světlého sladu a při 60–105 °C u sladu tmavého [1].

Při první, růstové fázi je slad sušen při teplotě nepřesahující 40 °C s vlhkostí vzduchu nad 20 %. V zrně stále probíhají vegetační procesy. Enzymová fáze probíhá při teplotách do 60 °C a vlhkost vzduchu je udržována po 20 %. V zrně se vegetační procesy zastavují za zachování enzymové aktivity. Při teplotách nad 60 °C a vlhkosti vzduchu pod 10 % probíhá chemická fáze, kdy v zrně dochází k chemickým reakcím a vytváří se barevné, chuťové a oxidoredukční látky. Tyto látky tvoří charakter sladu, jeho barvu, vůni a chuť. Aromatické látky vznikají interakcemi štěpných produktů monosacharidů a aminokyselin při vyšších teplotách. Maillardovou reakcí vznikají melanoidiny. Karamelizací sacharidických složek termickým štěpením cukrů, enzymovou oxidací a neenzymatickým hnědnutím jsou vytvářeny bezdusíkaté barevné a aromatické látky. Aby tyto sloučeniny vznikly, je nezbytné rozštěpení polysacharidů a bílkovin při klíčení ječmene. Melanoidiny, reduktony, melaniny, karamelizační produkty a další barevné a aromatické látky mají koloidní charakter a chrání koloidní roztoky před disperzními změnami. Dále mají tyto látky oxidoredukční vlastnosti, tím zlepšují koloidní stabilitu [1].

Zařízení určené k hvozdění se nazývá hvozd. Jedná se o vyhřívací systém s lískami, větracím systémem a regulačními a ovládacími prvky. Hotový slad se poté zbavuje kořínků neboli sladového květu v odkličovače [1].

### 2.1.2 Chmel

Chmel je nenahraditelnou surovinou při výrobě piva, protože tomuto alkoholickému nápoji dává svou typickou hořkost a aroma. Nejdůležitějšími látkami v chmelu jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly [2].

Z botanického hlediska bývá chmel zařazován do čeledi rostlin konopovitých, avšak systematika botanického zařazení chmele není jednoznačná, a proto v odborné literatuře můžeme najít chmel také v čeledích morušníkovitých nebo kopřivovitých [2].

Existují tři druhy chmele:

- chmel otáčivý (*Humulus lupulus*) je mnohaletá rostlina pěstovaná v mírných oblastech Evropy mezi 35° až 55° severní šířky včetně jižní části Austrálie, Nového Zélandu a jižní Afriky
- chmel japonský (*Humulus japonicus*) je jednoletá rostlina rostoucí v Číně a Japonsku, využívaná spíše jako okrasná rostlina nebo ke křížení za účelem zvýšení odolnosti vůči chorobám a k dosažení většího výnosu odrůdy *Humulus lupulus*
- *Humulus yunnanensis* pocházející z jižní Číny [3, 4].

Chmel otáčivý se z morfologického hlediska rozlišuje na tři poddruhy, jedním z nich je chmel evropský (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus*), jenž se dále rozděluje na tři variety – zakrslý, planý a kulturní (var. *culta*). Dnes se výhradně pěstuje chmel evropský kulturní

a v pivovarnictví se rozlišuje dále na subvariety červeňák nebo zeleňák podle zbarvení chmelové révy. Červeňáky se svou červenou až fialovou barvou způsobenou pigmentací anthokyanu jsou pěstovány hojně v Evropě, přesněji v České republice, Německu, Polsku a Slovinsku. Zeleňáky, které jsou pěstovány v Anglii, USA nebo Austrálii, anthokyanu neobsahují [2].

Chmel je vlhkomilná dvoudomá rostlina náročná na světlo<sup>1</sup>. Pro pivovarské účely se pěstují pouze samičí rostliny, kdežto samčí se používají při šlechtění. Hlavními částmi chmelové rostliny jsou kořenová soustava, réva s pazochy, listy a květenství, jenž se v období vegetace přeměňuje v chmelové hlávky. Kořenová soustava je mohutná a dobře vyvinutá, její základ tvoří zdřevnatělá babka, ze které vyrůstají vedlejší oddenky nazývané vlky. Ty je nutné odstranit, aby nevyčerpávaly z půdy rezervní látky. Hlavní kulové kořeny dorůstají do hloubky až 6 m, postranní kořeny rostou těsně pod povrchem. Réva vyrůstá z babky po dobu jednoho vegetačního období a vine se pravotočivě podle vodícího drátku. Na řezu je šestihránná a vyrůstají z ní přichytné chlupy. Na postranních větévkách neboli pazochách vyrůstá květenství. Chmelové hlávky se vyvíjí z květenství. Skládají se ze stopky, věténka, pravych a krycích listenů. Při oplození rostliny obsahují navíc semeno [2].

### 2.1.2.1 Chemické složení chmelu

Suché chmelové hlávky<sup>2</sup> obsahují významné látky ovlivňující průběh výroby piva a jeho kvalitu. Jsou to polyfenoly, které se extrahují z chmele vodou, poté silice, extrahované vodní párou, a chmelové pryskyřice. *Tabulka 1* poukazuje na rozdílné zastoupení jednotlivých složek chmelu, uváděných v různých literaturách. Souvisí to s analýzou různých odrůd chmelu v různých oblastech, různého stáří a použitím odlišných postupů stanovení [2].

*Tabulka 1: Chemické složení chmele uváděné různými autory [2].*

složka	obsah složky [% hm.]							
<b>voda</b>	10,0	8–12	9–11	10,0	10–11	8–12	10,0	10–11
<b>celkové pryskyřice</b>	15,0	–	18,0	15,0	10–25	–	15,0	–
<b>α-hořké kyseliny</b>	–	2–12	–	–	–	2–12	–	2–12
<b>β-hořké kyseliny</b>	–	2–10	–	–	–	1–10	–	2–10
<b>chmelové silice</b>	0,5	0,5–1,0	0,3–1,2	0,5	0,4–2,0	0,5–1,5	0,5	0,5–2,0
<b>lipidy a vosky</b>	–	–	–	3,0	3,0	0,2–0,5	3,0	2,0–4,0
<b>proteiny</b>	15,0	15,0	10–24	15,0	12–22	15,0	15,0	12–18
<b>aminokyseliny</b>	0,1	–	–	–	–	–	0,1	–
<b>polyfenoly</b>	4,0	2–5	4,6	4,0	4–14	2–5	4,0	2–5
<b>celulosa</b>	43,4	40–50	–	44,5	10–17	40–50	40,4	40–50
<b>cukry</b>	–	–	–	–	2–4	–	–	–
<b>pektiny</b>	2,0	2,0	–	–	–	2,0	2,0	1–2
<b>minerální látky</b>	8,0	10,0	6–10	8,0	7–10	10,0	8,0	7–9

<sup>1</sup> Kvalitní odrůdy chmele vyžadují průměrné trvání slunečního svitu ve vegetačním období 1800 až 2000 hodin [2].

<sup>2</sup> Po sklizni je nutné snížit obsah vody v chmelu ze 70 až 80 % na pouhých 10 až 11 % z důvodu konzervace a možnosti skladování. Nesprávně vysušené chmelové hlávky jsou náchylnější vůči napadení plísněmi [2].

Obsah **vody** ovlivňuje vlastnosti chmelu během jeho skladování. Příliš vysušené chmelové hlávky s obsahem vody pod 10 % se drojí a dochází u nich ke ztrátám hořkých látek, které jsou důležité při výrobě piva. Naopak zvýšený obsah vody nad 12 % má za následek zvýšené riziko napadení mikroorganismy. Chmel také více podléhá oxidačním a polymeračním změnám [2].

**Chmelové pryskyřice** patří k nejdůležitějším složkám chmele, tvoří až 30 % hmotnosti suroviny. Jsou deriváty floroglucínu a po izomeraci ve varném procesu jsou zodpovědné za intenzitu a charakter hořkosti piva. Základními složkami jsou měkké chmelové pryskyřice ( $\alpha$ -hořké kyseliny,  $\beta$ -hořké kyseliny), nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice<sup>3</sup>. Obecně se jedná o látky chemicky podobné, nepolárního charakteru, citlivé na oxidaci [2].

$\alpha$ -Hořké kyseliny jsou slabé kyseliny, ve vodě a vodných roztocích velice obtížně disociují. Jsou tvořeny směsí sedmi známých analogů humulonu – humulonu (35–70 %), kohumulonu (20–55 %), adhumulonu (10–15 %), prehumulonu (1–10 %) a posthumulonu (1–5 %). Jsou chemicky nestálé, a proto snadno podléhají izomeracím, oxidacím a transformacím postranních isoprenoidních řetězců. Izomerací, kdy se mění šestičlenný cyklus na pětičlenný, vznikají iso- $\alpha$ -hořké kyseliny. Tyto látky vznikají při chmelovaru a jsou nejdůležitějšími produkty zajišťujícími 85 % hořké chuti piva [5].

V chmelu jsou zastoupeny  $\beta$ -hořké kyseliny v rozmezí 3–5 %. Jedná se o směs analogů lupulonu (30–55 %), kolupulonu (20–55 %), adlupulonu (5–10 %), prelupulonu (1–3 %) a postlupulonu [6]. Tyto sloučeniny mají slabou esterovou vůni a nahořklou chuť. Jsou méně stábe než  $\alpha$ -hořké kyseliny, podléhají snadno izomeraci a převážně odštěpování postranních řetězců. Nejdůležitějším izomeračním produktem  $\beta$ -hořkých kyselin je hulupon, který dosahuje 50–75 % hořkosti iso- $\alpha$ -hořkých kyselin [7].

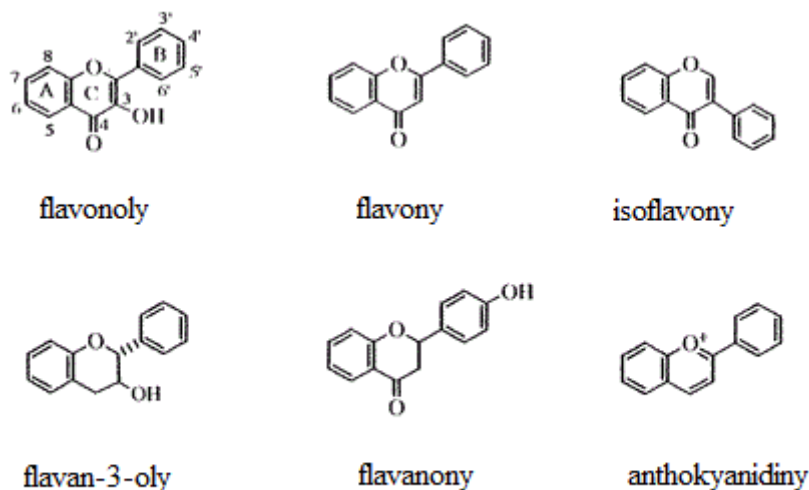
**Chmelových silic** obsahuje chmel 0,5–3 % hm. Jedná se o směs látek různého chemického složení, fyzikálních vlastností a aroma, jejichž celkové množství a zastoupení jednotlivých složek je závislé na genetických vlastnostech odrůdy, podmínkách pěstování, sklizně i skladování. Chmelové silice udělují pivu charakteristickou vůni [8].

**Polyfenoly** mají redukční schopnosti, a tím znemožňují oxidaci chmelových pryskyřic. Podporují číření piva vylučováním kalů reakcemi s dusíkatými látkami v průběhu chlazení mladiny a fermentace a také mají vliv na hořkost piva. Fenolové sloučeniny s nižším stupněm kondenzace a vyšším počtem hydroxylových skupin mají příznivý účinek na redoxní vlastnosti mladiny a piva [9]. Jsou to antioxidanty, zabraňují tvorbě zákalů nebiologické povahy a oddalují stárnutí chuti stočeného piva [2]. Chmelové polyfenoly se podílejí z 20 až 30 % na celkovém obsahu polyfenolů v pivu v závislosti na dávce a odrůdě použitého chmele [10]. Oxidací a kondenzací ztrácí polyfenolové sloučeniny své pozitivní vlastnosti, podílejí se na tvorbě zákalů, tmavší barvě a drsné chuti [2]. Mezi polyfenoly patří prenylované flavonoidy, fenolové kyseliny, jednoduché fenoly, flavanoly, hydroxykumariny, flavony, proanthokyanidiny, tanniny a amino fenolické sloučeniny [11]. K významným flavonolům chmele pa-

---

<sup>3</sup> Tvrdé pryskyřice mají v pivovarnictví nepatrný význam. Ve velmi nízké koncentraci se vyskytují v čerstvém chmelu a jejich podíl se zvyšuje skladováním za přítomnosti vzduchu a při vyšších teplotách [2].

tří kemferol, kvercetin a myricetin. Katechiny jsou bezbarvé látky, které tvoří převážnou část chmelových polyfenolů (3–6 % v sušině). Patří sem katechin, epikatechin a gallokatechin. V chmelu se nachází velké množství aromatických hydroxy- a methoxysubstituovaných fenolových kyselin odvozených převážně od kyselin 4-hydroxybenzoové a kávové. Kumariny mají antibakteriální a antifungicidní účinky. Fenolové kyseliny tvoří zejména hydroxyderiváty benzoové kyseliny, např. kyseliny gallová, 4-hydroxybenzoová, vanillová, deriváty kyseliny gallové a její oxidační produkty, deriváty skořicových kyselin, jako jsou kyseliny kumarová, kávová, ferulová a chlorogenová [2].



Obrázek 1: Obecná struktura hlavních flavonoidních látek.

### 2.1.3 Voda

Podle účelu se v pivovarnictví rozeznávají tři druhy vody:

- **varní voda** se používá jako jedna ze základních surovin pro výrobu piva. Musí to být voda pitná, zdravotně a hygienicky nezávadná. Voda tvoří 75–80 % hmotnosti piva. Její fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti ovlivňují průběh přípravy, kvalitu a specifické vlastnosti určité značky piva.
- **mycí a sterilační voda** nesmí obsahovat mikroorganismy, chemické kontaminanty a nesmí zapáchat.
- **provozní voda** se upravuje podle toho, jakých operací se účastní [2].

Z přírodních vod mají pivovary k dispozici spodní a povrchové vody. Spodními vodami se rozumí prameny, studně nebo vrty; povrchové vody jsou původem z řek, potoků, jezer a přehrad, a proto v porovnání s vodami spodními obsahují více mikroorganismů, organických a anorganických látek [2]. Ve vodě jsou rozpuštěné látky (ionizující soli, plyny) a suspendované látky (řasy, mikroorganismy, organické a anorganické látky) [1, 2]. V přírodních vodách nejčastěji zastoupenými kationty jsou kationty sodné, draselné, amonné, vápenaté, hořečnaté, manganaté, železnaté, železité a hlinité. Významnými anionty jsou chloridy, hydrogenuhličitan, uhličitan, dusičnan, dusitan, síran, fosforečnan a křemičitan [2].

Ve vodách tvoří zpravidla převažující podíl soli vápníku a hořčíku. Dříve se pro obsah těchto solí užíval termín tvrdost vody [1]. Tento pojem vyjadřuje součet obsahu vápenatých, hořečnatých a barnatých iontů nebo se považuje za obsah všech kationtů s nábojem větším než jedna. Uhličitanová tvrdost vody, někdy také nazývána přechodná, odpovídá obsahu hydrogenuhličitanů vápníku a hořčíku. Během chmelovaru se hydrogenuhličitanu alkalických kovů mění odštěpením oxidu uhličitého na více či méně rozpustné uhličitany. Neuhličitanová tvrdost vody (stálá) je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi kyseliny sírové, chlorovodíkové, dusičné, ale i jiných, které se varem nemění [1, 2].

Pomocí moderních úprav lze zajistit základní chemické složení vody podle požadavku na zastoupení makroelementů, nelze však docílit kompletní rovnováhy mikroelementů nebo plynů, které zajišťují podmínky místa původu vody. Rozlišují se různé druhy pivovarských vod na základě typu piva. Jedním z druhů je voda plzeňská. Z hlediska tvrdosti vody je měkká, má malý podíl anorganických složek a je vhodná pro výrobu silně chmelených spodně kvašených piv. Mnichovská voda je řazena mezi vody střední až tvrdé, obsahuje malé množství chloridů a síranů a naopak vysoké množství uhličitanů a vápníku. Dortmundská voda je velmi tvrdá, zde převažuje neuhličitanová tvrdost vody nad uhličitanovou. U vody vídeňského typu převládá uhličitanová tvrdost vody, pro piva s přechodem mezi světlým a tmavým je velice tvrdá. Pro výrobu vysoce chmelených, svrchně kvašených světlých piv typu Ale se používá voda Burton on Trend. Tato voda vykazuje vysokou tvrdost s vysokým obsahem síranů [2].

### *2.1.3.1 Významné ionty obsažené ve varní vodě*

V přírodních vodách jsou rozpuštěny různé plyny, především oxid uhličitý, kyslík, chlor a sulfan. Kromě plynů se také mohou vyskytovat organické sloučeniny, jejichž koncentrace jsou legislativně omezeny pro použití v potravinářském průmyslu. Nejčastější z nich jsou huminové látky, které jsou sice zdravotně nezávadné, avšak sensoricky nejsou příliš vhodné. Vodní zdroje, jenž se používají pro výrobu piva, se liší zastoupením jednotlivých iontů, jejich vzájemnými poměry a obsahem dalších složek. To má vliv na proces výroby, kvalitu i charakteristické vlastnosti určité značky piva [2].

Na poměru zastoupení **vodíkových** a **hydroxidových iontů** závisí aktuální hodnota pH. **Vápenaté ionty** mohou být ve vodě zastoupeny ve vysokém množství (až 200 mg/l). Přidávání chloridu nebo uhličitanu vápenatého tlumí přibarvování rmutů, vyluhování barevných látek, polyfenolů a kyseliny křemičité při vyslazování, a tím se snižuje nebezpečí nadměrného přibarvování mladiny. Vápník stimuluje činnost některých sladových enzymů, jež podporují stabilitu  $\alpha$ -amylasy před tepelnou denaturací. Vápenaté ionty snižují degeneraci buněk a kompenzují nadbytek hořečnatých iontů. Mají pozitivní význam ve flokulaci kvasnic. Se šťavelany reagují za vzniku nebiologických zákalů. Šťavelan vápenatý také způsobuje přepěňování piva, tzv. gushing [2].

**Hořečnaté ionty** v mladině a pivu z větší části pochází ze sladu a asi třetina pochází z varní vody. Hořečnaté soli jsou více rozpustné než vápenaté a neovlivňují tolik hodnotu pH. Hořčík stimuluje při fermentaci aktivitu kvasničných enzymů a je kofaktorem pro některé enzymy. Vyšší koncentrace hořečnatých iontů může nepříznivě ovlivnit chuť piva [2].

**Sodné a draselné ionty** se vyskytují ve vodě v nižších koncentracích, do piva se dostávají spíše ze sladu. Sodík má důležitou roli při regulaci transportu draslíku v metabolismu kvasinek. Draslík vykazuje inhibiční účinky na některé sladové enzymy při přípravě mladiny, avšak má pozitivní fyziologický význam v průběhu kvašení. Hydrogenuhličitan a uhličitan sodný nepříznivě zvyšují hodnotu pH rmutů a mladin, protože vznikající fosforečnany jsou rozpustné a mají alkalickou reakci. Piva po nich mívají drsnou příchut' [2].

Obsah **železnatých a železitých iontů** je v přírodních vodách nízký. Dvojmocné železo se snadno oxiduje na trojmocné a vylučuje se z roztoku. V nízkých koncentracích má železo příznivý účinek na biosyntézu enzymů dýchacího řetězce. Vysoké množství železa ve vodě zhoršuje kvalitu sladu. Slad je poté tmavší, zpomaluje se proces zcukření rmutů a způsobuje i jeho přibarvení. Je snížena také plnost chuti a charakter hořkosti piva. Železnaté ionty se z velké části vyloučí v mlátě a kalech [2].

**Manganaté ionty** jsou v nízkých koncentracích důležité pro množení a látkovou výměnu kvasinek. Působí jako kofaktory enzymů. Pozitivně působí v proteolytickém rozluštění sladu. Ve vyšších koncentracích mají stejné negativní vlivy jako ionty železa [2].

**Měďnaté ionty** mají stejné negativní účinky jako ionty železa, avšak jsou pro pivovarské kvasinky více toxické [2].

**Zinečnaté ionty** jsou důležité při kvašení mladiny. Podporují syntézu proteinů, růst kvasnic, stimulují fermentaci a omezují tvorbu sulfanu. Při vysokých koncentracích jsou však pro kvasinky toxické a zhoršují fyzikálně-chemickou stabilitu piva [2].

**Kationty hlinité, cínaté a olovnaté** jsou pro kvasinky toxické, negativně ovlivňují fyzikálně-chemickou a senzorickou stabilitu piva. Do něj se dostávají jako rezidua herbicidů, které se používají k ochraně chmelu [2].

**Síranové anionty** jsou při kvašení zdrojem oxidu siřičitého, který vykazuje antioxidační aktivitu a má pozitivní vliv na koloidní a senzorickou stabilitu piva. Síran vápenatý a hořečnatý zvyšují v reakcích s fosforečnany kyselost rmutů a sladů a konkrétně síran hořečnatý má za následek nepříznivou hořkou chuť piva [2].

**Chloridy** mohou inhibovat flokulaci kvasinek. Chlorid sodný do určité míry zvyšuje plnost chuti piva, avšak při vysokých koncentracích způsobuje slanou a drsnou chuť. V koncentracích 400 mg/l a vyšších zpomaluje fermentaci a zhoršuje čiření piva [2].

**Dusitany** jsou meziproductem biochemického rozkladu bílkovin a částečně vznikají při fermentaci redukcí dusičnanů. V pitné a pivovarské vodě je obsah dusitanových aniontů sledován, přípustná koncentrace je 0,1 mg/l, vyšší koncentrace může indikovat znečištění vody mikroorganismy [2].

Zemědělství používající intenzivní hnojení způsobuje zvyšování dusičnanů ve spodních vodách. Samotné **dusičnany** škodlivé nejsou, ale mohou být redukovány na dusitany, které jsou toxické pro kvasinky. Proto mohou být dusičnany přítomny v pivovarské vodě do 50 mg/l, v některých státech je hranice snížena až na polovinu [2].

**Fosforečnany** ovlivňují pH. Slad obsahuje v 1 kg 3–7 g fosfátů. **Fluoridy** přidávané do pitné vody v pivovarství nemají vliv na průběh kvašení, avšak již od 1 mg/l zvyšují intenzitu barvy piva, a to především v měkkých vodách [2].

**Křemičitany** sodné a hořečnaté se vyskytují ve vodách v koncentracích do 30 mg/l s výjimkou vulkanických oblastí, kde mohou být ve vodách koncentrace vyšší. Při koncentracích křemičitanu sodného nad 40 mg/l se zpomaluje fermentace a v pivě se tvoří zákal. Vysoké koncentrace tvoří pивní kámen a destabilizuje peptidy v pivu [2].

#### 2.1.4 Kvasinky

Kvasinky jako živé organismy pozoroval už Antoine van Leeuwenhoek (1632–1723) [2].

##### 2.1.4.1 Svrchní a spodní pivovarské kvasinky

V historii se postupně rozdělily a do dnešního dne přetrvaly pro výrobu piva dvě základní technologie. Použití kyselého praní kvasnic, které anglické pivovary převzaly již od Pasteura, zvýšilo biologickou stabilitu piva a vedlo ke kvašení při vyšších teplotách. Tyto kvasinky vytvářely na povrchu média kvasnou deku, a proto se vzniklá piva označovala jako svrchně kvašená. České a německé pivovary zajišťovaly biologickou stabilitu studeně vedeným kvašením a vyšší dávkou chmele. Kvasinky sedimentovaly na dno kvasných nádob a poté se sbíraly, a proto se označovaly jako kvasinky spodního kvašení [2].

Dnes se spodními pivovarskými kvasinkami rozumí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (*carlsbergensis*) nebo (*uvarum*), které se používají při výrobě piva typu ležáků v teplotním rozmezí 7–15 °C se sedimentací kvasnic na dně kvasné nádoby. Svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se používají při výrobě piv typu Ale a dalších druhů piv s teplotou kvašení 18–22 °C, kdy po prokvašení jsou kvasinky vynášeny na povrch média do kvasničné deky [1, 2].

Hlavními rozdíly mezi svrchními a spodními kvasinkami jsou:

- složení genetického materiálu
- složení buněčných stěn
- stupeň zkvašování  $\alpha, \alpha$ -rafinosy
- růst na specifických půdách
- obtížná sporulace spodních kvasinek
- rozdílné technologicky významné vlastnosti
- vyšší maximální teplota růstu u svrchních kvasinek
- vyšší tepelná odolnost svrchních kvasinek

Některé svrchní kvasinky mohou tvořit typickou chuť, kterou se vyznačují pšeničná svrchně kvašená piva. Jejich specifická chuť a vůně je způsobena 4-vinylguajakolem, 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. Schopnost dekarboxylovat kyselinu ferulovou spodní pivovarské kvasinky postrádají [2].

#### **2.1.4.2 Chemické složení pivovarských kvasinek**

Největší podíl v kvasince tvoří voda (65–85 %). Asi tři čtvrtiny z toho tvoří voda intracelulární, vázaná uvnitř buněk, a asi čtvrtinu voda hydratační a volná, která je vázaná povrchovými silami. Složení sušiny kvasničné buňky je proměnlivé na fyziologickém stavu a stáří kultury a mění se se změnami složení substrátu [2].

V sušině pivovarských kvasinek jsou přítomné sacharidy. Velký podíl polysacharidů (převážně mannanu a glukanu) obsahuje buněčná stěna. V cytoplazmě převládají polysacharidy glykogen a mannan. Svrchní pivovarské kvasinky obsahují více glykogenu než kvasinky spodní. Mannan je fyziologicky spjat se schopností kvasinek aglutinovat. Kromě organel se v cytoplazmě také nacházejí barvitelné inkluze bílkovin, lipidů a jiných zásobních látek [2].

Kvasinky obsahují téměř všechny formy dusíkatých látek. Hlavní část dusíkatých látek tvoří jednoduché a složené bílkoviny s různými prostetickými skupinami. Většinou jsou v buňce přítomny jako apoenzymy. Důležitou roli v redoxním systému má peptid glutathion. Aminokyseliny jsou přítomny za účelem proteosyntézy a metabolismu dalších látek [2].

Důležitou složkou buněčných membrán jsou lipidy. Skládají se z fosfolipidů, neutrálních lipidů a mastných kyselin. Některé lipidy regulují permeabilitu buněčné stěny a ovlivňují transport substrátu do buňky [2].

Steroly se také podílí na stavbě buněčných membrán a zajišťují jejich konzistenci a propustnost, podílejí se na transportu aminokyselin, pyrimidinů a na respirační aktivitě kvasinek [2].

V sušině kvasinek lze nalézt také minerální látky. Nejvíce zastoupený je majoritní prvek fosfor, který je přibližně z poloviny vázán v nukleových kyselinách, bílkovinách, lipidech a vitamínech. Dalšími významnými prvky jsou draslík, hořčík, vápník, sodík, síra, křemík a z minoritních a stopových prvků to je železo, mangan, měď a zinek. V kvasinkové buňce je také řada vitaminů [2].

#### **2.1.4.3 Tvorba metabolitů při kvašení**

Kvasinky získávají energii oxidací sacharidů. Uvolněná energie se skladuje ve formě sloučenin s makroergickými vazbami s vysokým obsahem volné energie, tj. energie využitelné. K těmto sloučeninám patří zejména ATP,  $\text{NAD}^+$  a jeho redukovaná forma NADH. Část energie z chemických vazeb se odvádí ve formě tepla – z poměrně velkého množství sacharidů se jen malá část převádí na výstavbu buňky. Proto buňka redukuje acetaldehyd na ethanol, čímž získává  $\text{NAD}^+$  potřebný pro oxidaci glukosy [2].

Při kvašení vznikají kromě ethanolu a oxidu uhličitého další významné látky ovlivňující výslednou sensorickou chuť piva. Jedněmi z nich jsou vyšší alkoholy, které vznikají jako vedlejší produkty metabolismu aminokyselin. Celkové množství vyšších alkoholů kolísá mezi 50–150 mg/l. Z alifatických alkoholů převládají propanol, 2-methylpropanol, z aromatických alkoholů se vyskytují 2-fenylethanol, tyrosol a tryptofol. S metabolismem sacharidů je spojena tvorba glycerolu, kterého pivo může obsahovat až 1 g/l. Těkávé fenoly vznikají dekarboxylací fenolových kyselin sladu [2].

Další skupinou sensoricky významných látek jsou estery. Ty mohou pocházet z meziproductů přeměny sacharidů a jejich množství vzrůstá s koncentrací původního extraktu, zákalem mladiny a množstvím zkvasitelných cukrů. Celkový obsah esterů se pohybuje mezi 20–100 mg/l. Největší podíl tvoří ethylacetát, vznikající za účasti acetyl-CoA v metabolických dráhách mastných kyselin a ketokyselin. Dále se v pivu nachází isoamylacetát, isobutylacetát, ethylkapronát a 2-fenylacetát [2].

Karboxylové látky se v pivu vyskytují v množství 10–50 mg/l. Nejvíce je zastoupen acetaldehyd, v nízké koncentraci glyoxal, methylglyoxal, furfural, benzaldehyd a další. Vicinální diketon biacetal je pro kulturní kvasinky extrémně toxický. Při slabé redukční schopnosti kvasinek zůstává biacetal v pivu a dává mu nepříjemnou vůni a chuť po čerstvém másle a medu [2].

Ze sirných sloučenin se nejvíce vyskytují sulfan a oxid siřičitý. Sulfan dává mladému pivu nepříjemnou vůni a chuť, později se ztrácí vymýváním proudem oxidu uhličitého při dokvašování. Sulfan navíc může reagovat s alkoholy nebo aldehydy za tvorby nežádoucích thiolů (merkaptanů). Oxid siřičitý v pivu pochází téměř výhradně z redukce síranů mladiny kvasinkami během hlavního kvašení. Dalšími sirnými metabolity jsou dimethylsulfid (DMS) a dimethylsulfoxid (DMSO), thioalkoholy, sulfidy, disulfidy, thioestery a thioaldehydy [2].

Kvašením rovněž vznikají organické kyseliny, které ovlivňují hodnotu pH piva. Acidita mladiny vzrůstá během fermentace kvůli spotřebě aminokyselin a vylučováním organických kyselin do mladiny. Patří zde netěkavé kyseliny mléčná, pyrohroznová, jablečná, citronová a další, těkavé kyseliny zahrnují zejména kyseliny s nižším počtem atomů uhlíku, nejvíce zastoupena je kyselina octová (asi 200 mg/l), dále propionová, máselná, isomáselná, kaprylová, kaprinová a isovalerová [2].

## **2.2 Výroba piva**

Výroba piva se skládá z několika základních technologických postupů. Jedná se o přípravu mladiny, kvašení mladiny a dokvašování piva, filtraci, pasteraci, stáčení a expedici piva.

### **2.2.1 Příprava mladiny**

Mladina se připravuje ve varně pivovaru ze sladu, vody a chmele.

Nejdříve je nutné rozemlít slad ve šrotovnicích na sladový šrot tak, aby došlo k dokonalému vymletí endospermu sladových zrn na vhodné podíly jemných a hrubých částic a zároveň se zachovala celistvost obalových pluch<sup>4</sup> [1]. Mletí sladu probíhá za účelem zpřístupnění extraktivních látek sladu a urychlení jejich rozpouštění. Hlavní podíl extraktu mladiny, který se uvolňuje ve varném procesu do roztoku, pochází z endospermu sladového zrna. Endosperm obsahuje převážně škrob, dále dusíkaté látky, neškrobové polysacharidy a enzymy. Množství a složení extraktu získaného ve varném procesu z rozemletého sladu

---

<sup>4</sup> Nepoškozené pluchy podmiňují tvorbu filtrační přepážky při scezování a vyslazování mláta. Pokud dojde k rozemletí pluch, tento proces se prodlužuje. Navíc dochází k uvolnění látek, které zhoršují organoleptické vlastnosti piva [2].

závisí na vlastnostech odrůdy ječmene, ze které byl slad připraven, na stupni rozluštění sladu, výsledku mlecího efektu a technologii přípravy mladiny [2].

Po rozemletí sladu je sladový šrot smíchán s varní vodou o teplotě 35–38 °C. Tento děj nazýváme vystírání [1]. Převod látek do roztoku při vystírání ovlivní celý další proces výroby piva i jeho kvalitu. Množství rozpuštěných látek závisí na sypání (množství a složení použitých surovin na várku) a na objemu vody v hlavním nálevu (při vystírání se smíchá se sypáním) [1, 2]. Pro světlá piva se volí větší nálev, aby se získal řidší rmut, protože při rmutování se urychlují enzymové reakce, podporuje se činnost amylolytických enzymů a dochází rychleji k zcukření sladiny. Řidší vystírka dává větší množství „ušlechtilého“ extraktu, světlejší barvu sladiny a jemnou chuť piva. Pro tmavá piva se naopak volí menší množství nálevu. Hustý rmut zachovává delší dobu působnost proteolytických enzymů. Tento proces podporuje vyluhování látek, které by nebyly vhodné pro piva světlá, ale vyhovují charakteru piv tmavých [2].

Po vystírání následuje rmutování, jehož cílem je převedení optimálního podílu extraktu surovin, především zkvasitelných cukrů, do roztoku působením amylolytických, proteolytických, kyselinotvorných a oxidačně-redukčních sladových enzymů. Pro správnou aktivitu enzymů je důležité dodržovat určitou teplotu. Kyselinotvorná teplota (35–38 °C) podporuje rozpouštění látek extraktu a zpřístupňuje působení sladových enzymů. Peptonizační teplota (45–50 °C) podporuje proteolýzu, štěpení fosforečanů a  $\beta$ -glukanů. Nižší cukrotvorná teplota (60–65 °C) zajišťuje při sdruženém působení amylolytických enzymů optimální podmínky pro aktivitu  $\beta$ -amylasy. V roztoku se zvyšuje podíl redukujících cukrů. Vyšší cukrotvorná teplota (70–75 °C) zajišťuje optimální působení termostabilní  $\alpha$ -amylasy. Klesá viskozita roztoku, přírůstek redukujících cukrů není již tak výrazný. Po ukončení rmutování se teplota zvyšuje až na tzv. odrmutovací teplotu (76–78 °C) [2].

Postupy rmutování se dělí na dekokční a infuzní. Dekokční postupy rmutování se vyznačují postupným vyhříváním jednoho až tří podílů rmutu. Po vystírání se část vystírky převede do rmutovací pánve, kde se zahřívá na technologicky důležité teploty (viz výše), poté se vrací zpět do vystírací pánve ke zbylému objemu. Tento postup se označuje jako jednormutový. V případě dvourmutového postupu se tento proces opakuje dvakrát, u třírmutového třikrát. Infuzní způsob zajišťuje rozpuštění a štěpení extraktu sladu s dlouhodobějším účinkem sladových enzymů bez povařování rmutu. Jedná se o zahřívání celého objemu vystírky ve vystírací pánvi, popř. rmutovacím kotli. Tento postup se používá pro svrchně kvašená piva [1, 2].

Po odrmutování následuje scezování ve scezovací kádi [2]. Jedná se o fyzikálně-chemický proces, při kterém se odděluje předek neboli sladina (roztok obsahující extraktivní látky sladu) od zbytků sladové šrotu – mláta [1]. Poté následuje vyslazování mláta horkou vodou a získané vodní výluhy, tzv. výstřelky se spojí s předkem a dávají celkový objem sladiny. Cílem scezování je získat čistou sladinu a maximum extraktu [2].

Sladina se následně vaří s chmelem. Cílem chmelovaru je odpařit přebytečnou vodu a docílit tím obsahu extraktu mladiny, která odpovídá typu vyráběného piva, odpařit těkavé

látky jako jsou chmelové silice a dimethylsulfid, inaktivovat enzymy, rozpustit a izomerovat hořké látky chmele a rozpustit další složky chmele, především polyfenoly [1, 2]. Také se zvyšuje acidita mladiny a koagulují bílkoviny. Chmelení se provádí v jedné, dvou nebo třech dávkách chmele. Chmelovar může probíhat za atmosferického tlaku nebo dynamickým varem, kdy se tlak zvyšuje a snižuje. Výsledkem chmelovaru je mladina, která se filtrací odděluje od chmelového mláta. Před zakvašením je nutné mladinu ochladit na zákvasnou teplotu a dostatečně provzdušnit [2].

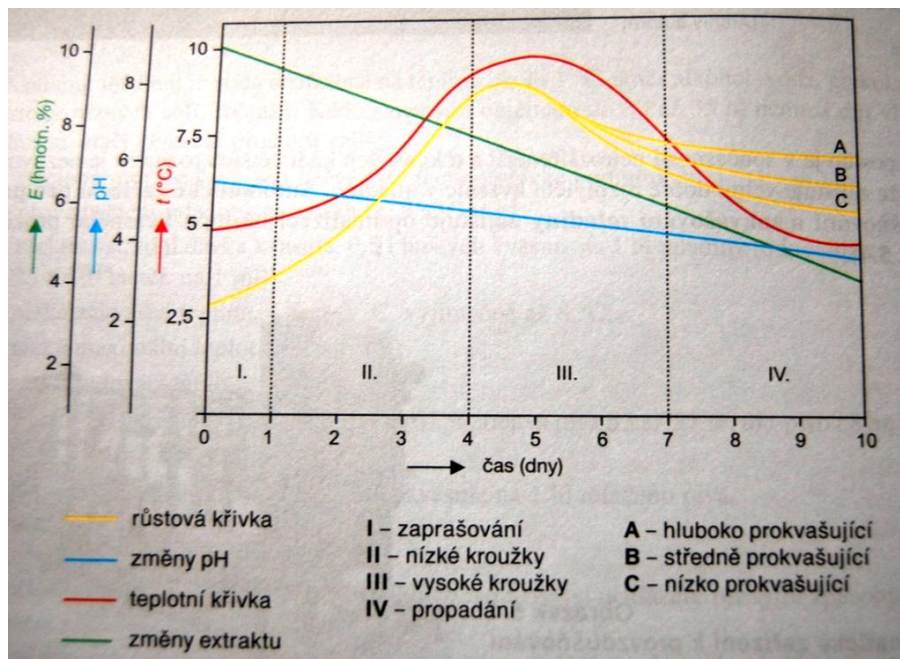
### 2.2.2 Kvašení mladiny a dokvašování piva

Kvašení neboli fermentace mladiny probíhá ve dvou fázích. V první fázi, která se nazývá hlavní kvašení, dochází k pomnožení pivovarských kvasinek a zkvašení podstatné části využitelných látek z mladiny. Ve druhé fázi fermentace, dokvašování a ležení piva, pomalu dokvašuje zbylý extrakt pod mírným tlakem, pivo se číří a sytí oxidem uhličitým.

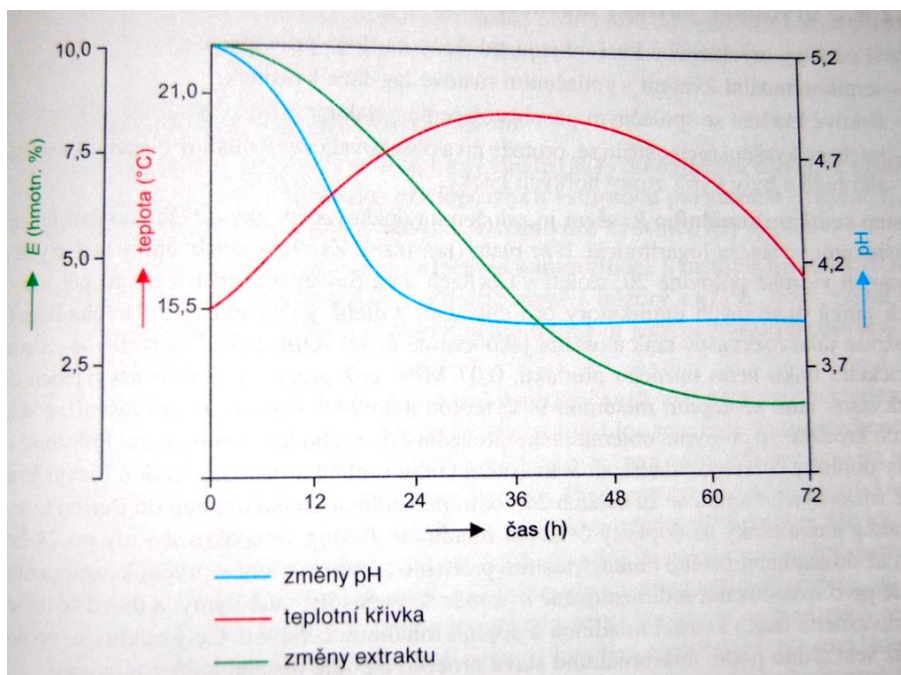
Pro průběh hlavního kvašení je důležité složení mladiny a její koncentrace, vlastnosti kmene kvasinek, teplotní průběh a doba kvašení, stupeň provzdušnění mladiny a kvasnic, druh fermentoru, cirkulace, podmínky tlaku, atd [2].

Podle druhu použitých kmenů kvasinek rozlišujeme kvašení spodní a svrchní. Svrchní hlavní kvašení trvá 2 až 8 dní, teplota by se měla pohybovat mezi 15–22 °C. Doba hlavního kvašení tradičním stacionárním postupem při použití spodních kvasinek je 7 až 12 dnů při studeném vedení v rozsahu teplot 5–9 °C, při teplém vedení se teplota pohybuje mezi 15–22 °C [1, 2]. Během tohoto období můžeme pozorovat čtyři stádia (viz *Obrázek 2, 3*):

1. Zprašování je tvorba pěny na hladině po zakvašení mladiny vyvolaná vznikajícím oxidem uhličitým [1, 2]. Začíná od stěn kádě během 12 až 24 hodin. Kvasinky se v porovnání s růstovou křivkou nacházejí v lag-fázi. Mírně klesá hodnota extraktu a pH, teplota mírně stoupá [2].
2. Nízké až vysoké bílé kroužky se tvoří po 24 hodinách od zakvašení. Kvasinky se nachází v exponenciální fázi růstu. Dochází k maximálnímu vývinu oxidu uhličitého, pH klesá až na hodnotu 4,7, hodnota extraktu klesá o 0,8 až 1,2 % a teplota stále stoupá [2].
3. Vysoké hnědé kroužky se tvoří třetí až pátý den. Zbarvují se hnědě kaly vynášenými z kvasícího média. Kvasinky jsou ve stacionární fázi růstu. Hodnota pH stále klesá na 4,4, extrakt klesá o 1,0 až 1,8 % za jeden den, teplota vzrůstá na maximum, na kterém se udržuje přibližně dva dny. V tuto chvíli je nutné začít s chlazením [2].
4. Propadání deky na hladině média způsobuje aglutinace a sedimentace kvasnic. Tuto tmavou vrstvu pěny je nutné sbírat, protože látky v ní obsažené by negativně ovlivnily organoleptické vlastnosti piva. Hodnota extraktu se snižuje pozvolna, kvasinky se na růstové křivce nachází ve zpomalení růstu [2].



Obrázek 2: Diagram fází spodního hlavního kvašení [2].



Obrázek 3: Diagram průběhu svrchního kvašení [2].

Hlavní kvašení probíhá v kvasných nádobách v prostorách zvaných spilka. Pro hlavní kvašení stacionárním způsobem se používají otevřené a uzavřené kvasné nádoby různé konstrukce. Materiál kvasných kádí musí být vůči pivu indiferentní [2]. Dokvašování piva probíhá v ležáckých nádobách [1].

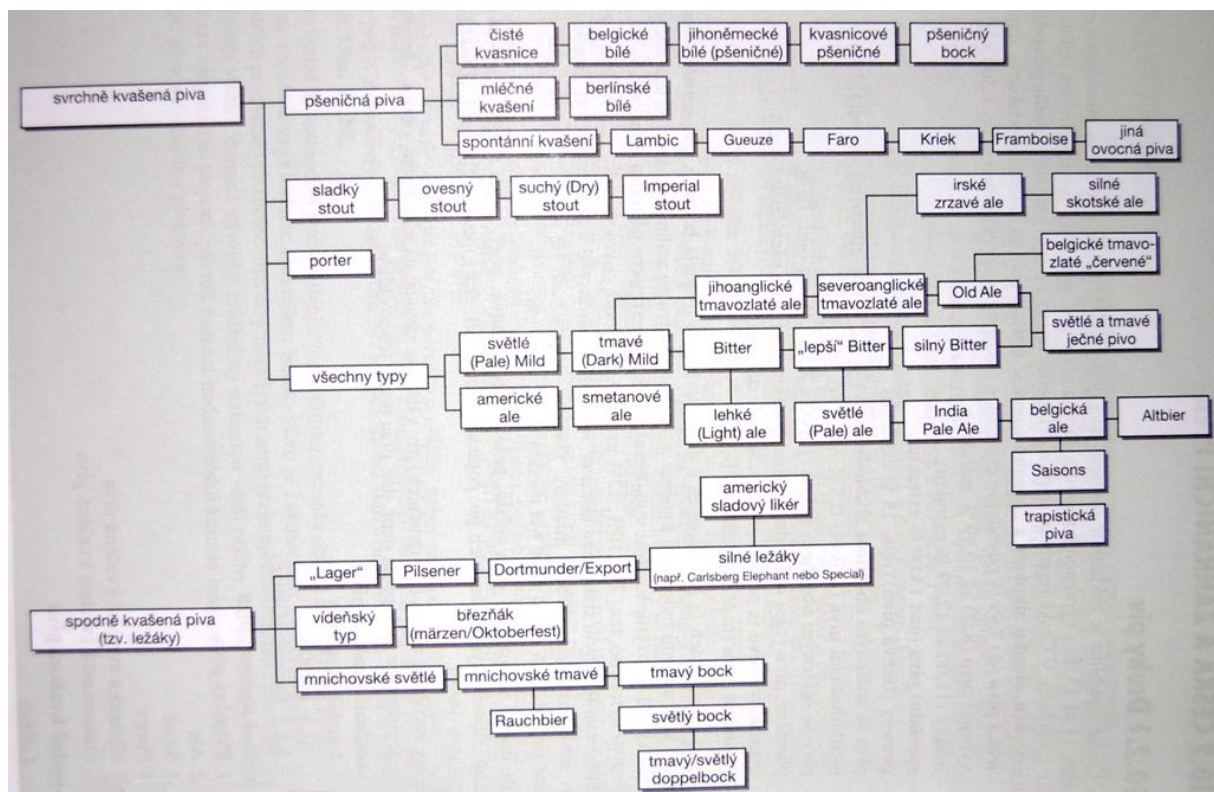
Dokvašování a zrání piva probíhá při nízké teplotě, teplota klesá z 5 °C na 2–0 °C. V prvních třech dnech je prokvašování zbylého extraktu nejrychlejší a klesá asi na polovinu. V dalším období je pokles extraktu pozvolný. Dále se upravuje chuť a vůně mladého piva

a přirozeným čířením se vylučují vysokomolekulární látky z roztoku. Složení piva se optimalizuje a pivo získává koloidní stabilitu. Při tradiční technologii je obvykle doba dokvašování u výčepních piv 21 dnů, u ležáků až 70 dnů [2].

Po dokvašování se pivo dále upravuje, aby se zvýšila jeho kvalita a trvanlivost. Odstraňují se kvasnice, pivo se filtruje nejčastěji přes křemelinové filtry, dále se může odstřeďovat, pasteruje se a poté se již stáčí do vhodných obalů [1].

### 2.3 Druhy piv

Podle barvy se rozlišují piva světlá, polotmavá a tmavá, popř. jejich směsi, tzv. řezaná piva. Česká piva se dělí podle původního extraktu, obsahu alkoholu a způsobu konečné úpravy na jedenáct podskupin: lehká piva, výčepní piva, ležáky, speciální piva, portery, piva se sníženým obsahem alkoholu, nealkoholická piva, piva se sníženým obsahem cukrů, pšeničná piva, kvasnicová piva a ochucená piva. Zahraniční piva se dělí podle druhu prokvašení na spontánně kvašená, svrchně a spodně kvašená piva. V rámci těchto druhů se dále větví na různé typy (viz *Obrázek 4*) [2].



India Pale Ale (IPA) označuje americké svrchně kvašené pivo s intenzivním chmelovým aroma, zlatavou barvou a jemně sladovou chutí. Imperial IPA někdy také označovaná jako Double nebo Triple IPA je silné, sladké a intenzivně chmelené pivo [2].

Název Lager (ležák) označuje spodně kvašené, standardní pivo. V Německu se označují názvem Keller nebo Zwickel kvasnicová piva. Märzen<sup>5</sup> česky březňák je středně silné pivo tmavší barvy [2].

Belgické označení Tripel se vztahuje k množství sladu používaného k vaření, podobně jako Dubbel nebo Qudrapel, přičemž číslovky označují násobky zvýšení dávky sladu proti obvyklé dávce. Tripel kombinuje sladkost pocházející z velkého množství sladu, cukru a alkoholu s hořkostí přírodního chmele. Belgian Strong Ale je plné pivo s vysokým obsahem alkoholu. Má světlou až tmavě hnědou barvu, lehké chmelové aroma a jemnou až silnou chmelovou chuť [2].

## **2.4 Analytické metody pro analýzu piva**

### **2.4.1 Chromatografie**

Ve všech chromatografických systémech je jedna fáze nepohyblivá (stacionární) a druhá fáze, mobilní, se vůči stacionární fázi pohybuje spolu se separovanými látkami [13]. Z hlediska charakteru mobilní fáze rozlišujeme plynovou chromatografii (gas chromatography, GC) a chromatografii kapalinovou (liquid chromatography), LC). Jak v GC, tak i v LC může být stacionární fáze tuhá nebo kapalná. V současné analytické praxi se při všech chromatografických technikách pracuje elučním způsobem, kdy se do protékající mobilní fáze dávkuje relativně malé množství vzorku [12].

Zatímco plynová chromatografie je vhodná především pro separaci těkavých, málo či středně polárních a tepelně stabilních látek, kapalinové chromatografie lze použít i pro separaci látek tepelně nestálých, silně polárních nebo i iontových a vysokomolekulárních přírodních či syntetických polymerů. Dále se kapalinová chromatografie vyznačuje dvojnásobnou možností geometrického uspořádání fázového systému, buď plošného při chromatografii na papíru (PC) či na tenké vrstvě adsorbentu (thin layer chromatography, TLC), nebo kolonového, kde je chromatografický systém uzavřen v hladké válcové trubici – koloně (kolonová kapalinová chromatografie). Moderní forma kolonové kapalinové chromatografie vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) se v současné době používá častěji než chromatografie v plošném uspořádání vzhledem k lepší reprodukovatelnosti, vyšší citlivosti a rychlosti separace, zejména při použití jemně zrněných částic náplně, vysokých pracovních tlaků a detektorů s průtočnými celami [12].

Kapalinová chromatografie umožňuje ovlivňovat separaci jak volbou stacionární, tak i mobilní fáze, která se většinou aktivně účastní interakcí se separovanými látkami a se stacionární fází [12].

---

<sup>5</sup> Dříve se tato piva vařila v březnu (odtud název) a nechávala se pomalu kvasit během letních měsíců [2].

## **2.4.2 Kapalinová chromatografie**

Přístroje pro kapalinovou chromatografii – kapalinové chromatografy – se skládají z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci jeho složek, jejich následnou detekci, záznam a zpracování signálu. Mobilní fáze ze zásobníku se přes zařízení pro zavádění vzorků dávkuje vysokotlakým čerpadlem na separační kolonu (nejlépe umístěnou v termostátované skříni pro dobrou reprodukovatelnost výsledků), z níž se zavádí do detektoru, poskytujícího elektrický signál jako odezvu úměrnou změně sledované vlastnosti eluátu, vytékajícího z kolony, při průchodu složky vzorku. Časová závislost elektrického signálu se zaznamená jako chromatogram. Elučních časů maxim chromatografických pík separovaných látek využíváme k jejich identifikaci, z výšek nebo ploch pík po kalibraci pomocí standardů látek určíme jejich obsah ve vzorku [12].

### **2.4.2.1 Čerpadla**

Čerpadla pro HPLC musí být konstruována z materiálů odolných vůči chemické korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází, mají být schopna dávkovat plynule kapaliny bez kolísání (pulzů) průtoku při pracovních tlacích až do 30–40 MPa s nastavitelnými průtoky pro určitý typ kolon [12].

### **2.4.2.2 Zařízení pro dávkování vzorků**

Vzorky se zavádějí na kolonu kapalinového chromatografu dávkovacími ventily se smyčkou naplněnou vzorkem bez přerušení toku mobilní fáze. Přepínání poloh automatických dávkovačů je ovládáno pneumaticky nebo elektricky a plnění smyčky i dávkování je řízeno počítačem, který se využívá i ke zpracování dat [12].

### **2.4.2.3 Detektory pro HPLC**

Detektory pro HPLC lze rozdělit do dvou skupin: na detektory selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluátu a na detektory univerzální, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku, tj. separované látky i mobilní fáze [12].

Spektrofotometrické detektory pracují v ultrafialové případně i viditelné oblasti elektromagnetického záření. Detegované látky musí absorbovat záření vlnové délky použité k detekci [12].

Vysoce selektivní a specifické jsou fluorimetrické detektory [13]. Detegovaná látka v cele detektoru absorbuje budící záření z ultrafialové oblasti, jehož část vyzáří ve formě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce, které se zpravidla měří pod úhlem 90° k záření budícímu. Jako zdroje budícího záření lze použít nízkotlaké rtuťové výbojky s interferenčním filtrem nebo laserů pro dosažení vysoké citlivosti detekce zejména v kapilární HPLC [12].

Univerzálním detektorem, který lze použít při gradientové eluci, je detektor rozptylu světla na tuhých částicích rozptýlených v proudu plynu po předchozím odpaření mobilní fáze (evaporative light-scattering detector, ELSD). K jeho úspěšné funkci je zapotřebí, aby všechny složky mobilní fáze měly dostatečnou větší těkavost než separované látky [12].

#### **2.4.2.4 Kolona ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii**

Komerční kolony pro HPLC nejčastěji tvoří rovné bezešvé trubice vyrobené z leštěné nerezové oceli, případně z tvrzeného skla, titanu nebo pevného polymeru opatřeného na koncích fritami, které v koloně zadržují částice náplně. Rozměry kolon se řídí podle účelu použití. K analytickým separacím většinou slouží konvenční kolony o délce 10–25 cm a vnitřním průměru 3–4,6 mm s částicemi o velikosti 3–10  $\mu\text{m}$ . Kratší kolony (o délce cca 3–6 cm) o stejném vnitřním průměru umožňují dosáhnout jednodušších separací za kratší dobu s významnou úsporou rozpouštědel. Separace na mikrokolonách o délce 15–25 cm a vnitřním průměru 1–2 mm umožňují ještě větší úspory mobilní fáze a dovolují vysokou hmotnostní citlivost detekce. Kolony používané pro gelovou chromatografii biopolymerů nebo syntetických polymerů jsou obvykle delší (25–100 cm) a širší (6–10 mm) než analytické kolony. Semipreparativní a preparativní kolony mají vnitřní průměr od 0,6 do 5 cm a pro průmyslové separace se používají spíše kolony s většími průměry [12].

#### **2.4.2.5 Náplně kolon pro HPLC**

Náplně se připravují jak z pórovitých anorganických materiálů, tak i z organických polymerů. Nejčastěji se používají materiály na bázi silikagelu, buď bez úprav, nebo jako nosiče, chemicky modifikovaného navázáním nepolárních nebo polárních stacionárních fází. Materiály na bázi silikagelu jsou méně stabilní v mobilních fázích o pH větší než 8,5. Proto se kromě silikagelu používají i jiné anorganické nosiče – oxid hlinitý, zirkoničitý, titaničitý nebo grafitický uhlík, které jsou chemicky odolnější a usnadňují tím separace bazických sloučenin, které většinou vyžadují mobilní fáze s vysokým pH (12–14). Pórovitost materiálů závisí na velikosti molekul separovaných látek [12].

#### **2.4.2.6 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi, RPC**

Tento chromatografický mód se v současné době HPLC používá nejčastěji, protože zpravidla umožňuje úspěšné separace velmi pestré škály vzorků, obsahujících nepolární, středně nebo silně polární a někdy i iontové či ionizovatelné látky. Princip separace využívá polárních a disperzních interakcí mezi analyzovanými látkami, mobilní a stacionární fází. Stacionární fáze jsou nepolární či mírně polární – většinou chemicky modifikovaný silikagel s vázanými oktadecylovými, oktylovými či jinými alkylovými či alkylarylovými, ale i nitrilovými skupinami. Méně často se používá chemicky modifikovaný oxid zirkoničitý či titaničitý, anorganické nosiče potažené vrstvou nepolárních polymerů, částice zesíťovaných lipofilních organických polymerů či speciálně připraveného pórovitého grafitického uhlíku s dostatečnou mechanickou stabilitou, dobře definovanou a stabilní strukturou pórů [12].

Mobilní fáze jsou vždy polárnější než fáze stacionární a skládají se většinou z vody a jednoho či více polárních rozpouštědel rozpustných ve vodě, nejčastěji se jedná o methanol, acetonitril nebo THF. Charakter organického rozpouštědla a v menší míře i typ chemicky vázané nepolární stacionární fáze ovlivňují velikost retence i selektivitu separace [12].

Systémy s obrácenými fázemi jsou nejvhodnější pro separace látek, které se liší velikostí hydrofobních částí molekul, případně počtem a charakterem polárních funkčních skupin. Jsou tedy velmi vhodné pro separace členů homologických nebo oligomerních řad, pro separace isomerů však vykazují menší selektivitu než systémy s normálními fázemi [12].

### 2.4.3 Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie využívá jako stacionární fázi měniče iontů – ionexy. Jedná se o makromolekulární matici nesoucí vhodné funkční skupiny, na které je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Tento protiion je vyměňován iontem stejného znaménka náboje obsaženým v kapalně fázi. Mezi ionty opačného náboje se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly [13].

Mobilní fáze musí obsahovat vhodné protiionty, které se separovanými ionty soutěží o interakce s opačně nabitými funkčními skupinami ionexů. Retence iontových látek klesá s rostoucí koncentrací protiiontů v mobilní fázi. K vodným mobilním fázím se často přidává organické rozpouštědlo a obvykle se pracuje při zvýšené teplotě, díky tomu se retence snižuje a mění se také selektivita separace organických iontových látek [11].

Ionexy, jejichž funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů, se nazývají anexy. Katexy mají funkční skupiny kyselé a slouží k výměně kationtů. Silné ionexy jsou ionizovány v celé oblasti pH, slabé katexy pouze v alkalické a slabé anexy pouze v kyselé oblasti pH [11, 13].

K detekci se obvykle používají detektory vodivosti. Avšak vzhledem k vysoce vodivému elučnímu činidlu by citlivost detektoru na ionty vzorku byla snížena. Proto se před detektor zařazuje supresor, který potlačuje jejich účinek [13].

## 2.5 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-OES)

Optická emisní spektrometrie (OES) je založena na registrování fotonů vzniklých přechody valenčních elektronů z vyšších energetických stavů na stavy nižší. Při OES se tedy měří záření emitované atomy nebo ionty v excitovaném stavu, které vzniká jejich zářivou deexcitací. Emisní spektrum má čárový charakter [14]. Pracuje se v oblasti vlnových délek 165–800 nm [13]. Jestliže jsou v emisním prostředí molekuly nebo radikály, zaznamenáváme také emisní pásy [14].

Zahříváním látky v plynném skupenství dochází postupně k atomizaci a ionizaci, až látka přejde na plazma. Plazma je definována jako ionizovaný plyn obsahující dostatečnou koncentraci elektricky nabitých částic, přičemž počet kladných a záporných iontů je stejný. Celá soustava je elektricky vodivá, ale celkově nevykazuje elektrický náboj, je quasi neutrální. Přechod plynu na plazma se uskutečňuje dodáním dostatečného množství energie, která převyšuje ionizační energii přítomných atomů. V plynu se začnou vlivem ionizace objevovat volně pohyblivé elektricky nabitě částice, přičemž nejdůležitější jsou velmi pohyblivé elektrony, které při srážkách odevzdají svou kinetickou energii těžším atomům a molekulám. Tím dochází k dalšímu zahřívání soustavy a k prohlubování atomizace a ionizace [14].

### 2.5.1 Instrumentace ICP-OES

Optický emisní spektrometr se skládá z budicího zdroje, vlastního optického spektrometru a výpočetní techniky [13].

### **2.5.1.1 Zmlžování vzorku, mlžná komora**

Vzorek vstupuje do zmlžovače, kde se převádí na aerosol. Zmlžovače mohou být pneumatické, ultrazvukové nebo tepelné. Tepelné zmlžování využívá rychlého ohřevu nad bod varu rozpouštědla v tenké kapiláře. U ultrazvukových zmlžovačů vzniká aerosol kmitáním keramické piezoelektrické destičky. Pneumatické zmlžovače jsou dvojího typu. Pneumatické zmlžovače se sacím účinkem používají průtoky vzorku 1–2 ml/l a vzorek je často transportován peristaltickou pumpou. Jejich nevýhodou je ucpávání v ústí kapiláry z důvodu krystalizace solí při vysokých koncentracích. Tyto zmlžovače mohou mít pravoúhlé nebo koncentrické (dle Meinharda) uspořádání kapilár. Pro viskóznější kapaliny nebo vzorky s vysokým obsahem solí jsou vhodné pneumatické zmlžovače bez sacího účinku [14]. Aerosol vzniká narušováním filmu kapaliny, který vzniká stékáním kapaliny po kulovém povrchu nebo žlábkem tvaru písmene V přes malý otvor, jímž je přiváděn nosný plyn [14, 15]. Ústí plynové kapiláry je neustále omýváno proudem kapaliny, takže nedochází k ucpání kapiláry [14].

Po zmlžení vzorku je aerosol přemístěn do mlžné komory, kde dochází k odstranění příliš velkých kapek aerosolu. Mlžné komory využívají inerčního záchyty, gravitační sedimentace, odstředivých sil nebo turbulencí [14].

### **2.5.1.2 Budicí zdroj**

Budicí zdroj dodává energii k emisi záření atomy vzorku. Používá se indukčně vázaný plazmový výboj ICP (Inductively Coupled Plasma), který umožňuje analyzovat vzorky v roztoku [13]. V ICP-OES jsou využívány vysokofrekvenční generátory pracující s frekvencí 27,12 MHz nebo 50 MHz. Výkony generátoru se pohybují v rozmezí 1–10 kW v závislosti na použitých pracovních plynech<sup>6</sup> a jejich průtocích. Celková spotřeba pracovních plynů se pohybuje mezi 1–100 l/min [15].

Výboj ICP má dvě odlišné oblasti. Indukční zónu, kde dochází k přenosu energie elektromagnetického pole cívky do plazmatu, a analytický kanál, v němž je soustředěn vzorek transportovaný plynem. Na rozhraní obou oblastí je velký teplotní gradient a dochází zde k významným odchylkám od termodynamické rovnováhy. Analytický kanál je vertikálně rozdělen na předehřívací, počáteční zářivou a analytickou zónu a chvost výboje. V předehřívací zóně dochází k desolvataci aerosolu, vypařování pevných částic a atomizaci většiny molekul a radikálů. V počáteční zářivé a analytické zóně probíhá ionizace a excitace atomů a iontů [14]. Výboj vzniká za atmosférického tlaku v proudu plynu [15].

Indukčně vázané plazma vzniká v plazmové hlavici, ve které se nachází tři toky plynu. Prostřední trubicí – injektorem – proudí argon transportující aerosol vzorku do plazmatu. Mezi injektorem a střední trubicí proudí vnitřní plazmový plyn [14]. Jako plazmový plyn se používá argon [15]. Vnější plazmový plyn je přiváděn tangenciálně do vnějšího mezikruží. Plazma vzniká přenosem vysokofrekvenčního proudu do proudu plynu a první ionizační impulz je plynu dodán z Teslova induktoru. Vzniklý ionizovaný plyn postupuje plazmovou hlavici a v prostoru indukční cívky začne vodivý ionizovaný plyn fungovat jako sekundární

<sup>6</sup> Pro Ar/Ar plazma se používá výkon maximálně do 2 kW [14].

zkratovaná strana transformátoru. Vzniklý sekundární vysokofrekvenční proud zahřeje proudící plyn na teplotu, kdy přejde na vodivé plazma, které se dále samo udržuje indukovaným vysokofrekvenčním proudem [14]. Indukční cívka je tvořena dvěma až pěti závitů, které jsou chlazeny nejčastěji vodou [15].

Tvar plazmatu má vliv na vnášení vzorku do plazmatu. Toroidní (prstencový) tvar plazmatu vylepšuje vlastnosti ICP. V prstenci je nejvyšší teplota dosahující až 10 000 K a prostřední částí prochází relativně chladnější analytický kanál, kam je možné zavádět aerosol vzorku bez rizika zhoršení stability plazmatu. Vzorek je situován převážně v centru a vypařuje se do teplejších oblastí. Díky tomu vzniká spojitě pozadí a je minimální riziko samoabsorpce. Důsledkem jsou dobré detekční limity a vysoká linearita kalibrací [14].

### **2.5.1.3 Optický systém**

Optický spektrometr rozkládá záření z budícího zdroje na jednotlivé spektrální čáry a měří jejich intenzitu [14]. Elektromagnetické záření, které vzniká v důsledku vybuzení vzorku, má polychromatický charakter [16]. Monochromátor je zařízení, které vstupující záření rozdělí na řadu monochromatických paprsků. Skládá se ze vstupní štěrbinou pro přiváděný paprsek, disperzního prvku a jedné výstupní štěrbinou pro paprsek vybrané vlnové délky [13]. Polychromátor je zařízení s více výstupními štěrbinami [16]. Optický spektrometr se skládá ze vstupní štěrbinou, systému čoček nebo zrcadel, disperzního prvku a výstupní štěrbinou. Záření různých vlnových délek dopadá na výstupní štěrbinou. Intenzita záření je měřena fotonásobičem za výstupní štěrbinou [13].

Jedním z disperzních prvků je hranol. Jedná se o trojboký hranol s úhlem lomu  $60^\circ$  vyrobený ze skla nebo křemene [16, 17]. Křemen propouští záření vlnových délek v rozmezí 185–3 500 nm, ale v praxi se využívá v rozmezí vlnových délek 200–600 nm, neboť při vyšších hodnotách vlnových délek je disperze lomu velice malá [16]. Ve viditelné oblasti se používá častěji sklo než křemen, protože vykazuje větší disperzi indexu lomu [17].

Dalším disperzním prvkem je optická mřížka. Skládá se z velkého počtu paralelních vrypů na povrchu destičky, vyrobené ze skla nebo křemene [16].

Sekvenční optické emisní spektrometry obsahují monochromátor, který měří jednu konkrétní spektrální čáru stanovovaného prvku. Pootočením difrakční mřížky a změnou polohy výstupní štěrbinou lze spektrální čáru zvolit. Simultánní OES měří současně pevně nastavené vybrané spektrální čáry. Obsahují více výstupních štěrbin nastavených na spektrální čáry prvků – jedná se o polychromátor. Za výstupními štěrbinami jsou fotonásobiče. Toto uspořádání umožňuje na rozdíl od sekvenční OES měřit až několik desítek prvků najednou [13].

### **2.5.1.4 Detektory**

Detektory zaznamenávají elektromagnetické záření, které je vysílané vybuzenou látkou v oblasti ultrafialového, viditelného a blízkého infračerveného spektra [16].

## Fotodetektory

Fotodetektory převádí optické záření na elektrický signál [18]. Mezi fotoelektrické detektory řadíme fotodiodu, fotonásobič, fotonku nebo fototranzistor. Fotonka je fotoelektrický detektor bez vnitřního zesílení, detektor s vnitřním zesílením sekundární elektronové emise je fotonásobič [16]. Fotonky umožňují detekovat záření na základě fotoelektrického jevu, kdy při dopadu fotonů na katodu dochází k fotoemisi elektronů. Vzniká fotoproud mezi katodou a anodou a jeho velikost je úměrná intenzitě dopadajícího záření [17]. Fotonásobič je fotonka s vnitřním proudovým zesílením vnitřních elektronů. Fotonásobič je umístěn za výstupní štěrbinou monochromátoru a skládá se z katody a soustavy dynod, které jsou z podobného materiálu jako katoda [16]. Záření dopadající na katodu vybudí fotoelektrony, které jsou urychlené a usměrněné elektrostatickým polem a dopadají na první dynodu. Z ní jsou vybudeny další elektrony, které dopadají na další dynodu, takže celkový proud elektronů dopadajících na anodu může být  $10^4$  až  $10^8$ krát větší [17].

### CCD detektory (charge coupled devices)

Nábojově vázané obvody neboli CCD detektory jsou složité integrované struktury, které jsou tvořeny fotocitlivými prvky, obvody pro zpracování signálu a pomocnými obvody [18]. Mohou být řadové, plošné, intenzifikované nebo CID detektory (charge injected device) [17]. CCD detektory pracují na principu zavedení optického signálu do struktury, jeho přeměny na elektrický náboj a zpracování a převedení na napětí [18].

#### 2.5.2 Analytické využití OES

Spektrální čáry tvoří skupiny zvané série. Do série patří čáry, které vznikají návratem elektronu do téže hladiny z libovolné vyšší hladiny. Hrana série odpovídá vlnovou délkou energii, potřebnou k přechodu elektronu z dané energetické hladiny do volného stavu [13]. Nejintenzivnější čáry ve spektru jsou tzv. rezonanční čáry, které odpovídají přechodům do základního stavu z takových vyšších hladiny, odkud je možný přechod pouze do stavu základního [14]. Kvalitativní analýza spočívá v identifikaci polohy spektrálních čar ve spektru, kvantitativní analýza je založena na intenzitě jednotlivých čar a charakterizuje koncentraci prvku ve vzorku [13, 14].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam chemikálií

Tabulka 2: Specifikace standardů pro prvkovou analýzu.

prvek	Koncentrace [g/l]	startovní materiál	matrix	výrobce	objem
draslík	1,001 ± 0,002	KNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	MERCK	500 ml
sodík	1,000 ± 0,002	NaCl 99,999 %	H <sub>2</sub> O	ASTASOL	500 ml
fosfor	1,000 ± 0,002	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 99,999%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05%	ASTASOL	500 ml
zinek	1,000 ± 0,002	Zn 99,999%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	100 ml
hořčík	1,000 ± 0,002	Mg 99,99%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	500 ml
vápník	1,000 ± 0,002	CaCO <sub>3</sub> 99,995%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	500 ml
měď	1,000 ± 0,002	Cu 99,999%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	100 ml
mangan	1,000 ± 0,002	Mn 99,98%	2% HNO <sub>3</sub>	ASTASOL	500 ml
křemík	1,000 ± 0,002	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 99,9%	H <sub>2</sub> O	ASTASOL	500 ml
železo	1,000 ± 0,002	Fe 99,999%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	500 ml

Tabulka 3: Specifikace standardů polyfenolů.

látka	Mr [g/mol]	čistota	výrobce	země původu	CAS
kvercetin	338,3	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	Švýcarsko	6151-25-3
hesperidin	610,6	80%	SIGMA ALDRICH	Švýcarsko	520-26-3
rutin hydrát	610,52	≥ 94 %	SIGMA ALDRICH	Německo	207671-50-9
kyselina galová	170,12	97,5–102,5 %	SIGMA ALDRICH	Čína	149-91-7
kyselina vanilínová	168,15	97%	SIGMA ALDRICH	Čína	121-34-6
kyselina kumarová	164,16	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	Velká Británie	501-98-4
katechin	308,28	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	Čína	225937-10-0
naringin	580,5	≥ 95 %	SIGMA ALDRICH	Německo	102-36-47-2
umbeliferon	162,14	99%	SIGMA ALDRICH	Ekvádor	93-35-6
kyselina ferulová	194,18	99%	SIGMA ALDRICH	Čína	537-98-4
kyselina skořicová	148,17	99%	Alfa Aesar	Německo	140-10-3
kyselina kávová	180,16	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	Německo	331-39-5

Tabulka 4: Specifikace standardů organických kyselin.

látko	Mr [g/mol]	koncentrace	výrobce	země původu	CAS
fumarát	116,08	95%	PENTA	Česká republika	110-17-8
acetát	60,05	1000 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	64-90-7
malát	134,09	1000 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	617-48-1
sukcinát	118,09	1000 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	110-15-6
laktát	90,08	1001 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	598-82-3
citrát	192,13	1000 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	77-92-9

Tabulka 5: Další použité chemikálie.

látko	Mr [g/mol]	čistota [%]	výrobce	země původu	CAS
kyselina mravenčí	46,03	98	Lachner	Česká republika	64-18-6
acetonitril	41,05	99,9	Sigma Aldrich	Německo	75-05-8
destilovaná voda	18,015	–	–	–	–

## 3.2 Seznam laboratorních pomůcek

Automatické pipety, zkumavky, vialky, mikrofiltry.

## 3.3 Přístroje

### 3.3.1 Ultrazvuk

Ultrasonic Compact cleaner PSO 3000A, PowerSonic s r.o.

### 3.3.2 HPLC

Tabulka 6: Nastavení HPLC.

přístroj HPLC Agilent 1260 Infinity	
objem nástřiku	5 µl
průtok MF	0,75 ml/min
složení MF	5 %–30 % acetonitril:kyselina mravenčí
teplota v termostatu	40°C
detekce	280, 290, 350, 360 nm
název a typ kolony	Poroshell 120 C18, (4,6x150 mm; 2,7 nm)
detektor	ELSD

Tabulka 7: Limity detekce a kvantifikace.

látka	LOQ [mg/l]	LOD [mg/l]
kyselina galová	0,006 24	0,001 87
kyselina kávová	0,030 91	0,009 27
kyselina kumarová	0,016 33	0,004 90
kyselina skořicová	0,024 94	0,007 48
kyselina vanilinová	0,002 70	0,000 81
kyselina ferulová	0,007 59	0,002 28
umbeliferon	0,007 47	0,002 24
rutin	0,007 09	0,002 13
kvercetin	0,000 94	0,000 28
naringin	0,003 88	0,001 16
hesperidin	0,014 02	0,004 20
katechin	0,005 35	0,001 61

### 3.3.3 IC

Tabulka 8: Nastavení IC.

přístroj	850 Professional IC
objem nástřiku	20 µl
průtok MF	0,6 ml/min
složení MF	0,5 mmol HClO <sub>4</sub>
teplota	30C
tlak	5,2 Mpa
název a typ kolony	Metrosep Organic Acids - 250/7,8
detektor	Conductivity detector

Tabulka 9: Limity detekce.

látka	LOD [mg/l]
kyselina citronová	0,120 0
kyselina jablečná	0,050 0
kyselina mléčná a jantarová	0,110 0
kyselina mravenčí	0,040 0
kyselina octová	0,080 0

### 3.3.4 ICP-OES

Tabulka 10: Nastavení ICP-OES.

Přístroj ICP-OES Horiba Ultima 2 (Horiba Scientific, Francie)	
Výkon generátoru	1200 W
Rychlost otáček čerpadla	15 otáček/min
průtok plazmového plynu	12 l/min
průtok pomocného plynu	0,2 l/min pro mikroprvky; 0,8 l/min pro makroprvky
zmlžovač	pneumatický dle Meinharda
Tlak ve zmlžovači	0,3 MPa
mlžná komora	cyklonová
spektrum vlnové délky	160–800 nm
Rozlišení	4–6 pm

### 3.4 Popis analyzovaných vzorků

Pro analýzu bylo použito 14 vzorků lahvových piv vyrobených celkem v 6 státech. Byla použita piva odlišné technologie kvašení, ale i různých pivních stylů. *Tabulka 11* blíže specifikuje piva, která k analýzám byla vybrána.

Tabulka 11: Identifikace analyzovaných vzorků pív.

vzorek	jméno pivovaru	název piva	kvašení	pivní styl	obsah alkoholu	země původu
18	Browar zamkowy Cieszyn	Double IPA	SV	DoubleIPA	8,0 % obj.	Polsko
19	Brouwerij Emelisse	American Pale Ale	SV	American Pale Ale	3,5 % obj.	Nizozemí
20	Flying Dog Brewery	K-9 Winter Ale	SV	Ale	7,4 % obj.	USA
21	Wychwood Brewery	Dr. Thirsty's No. 4 Blonde	SV	Golden Ale	4,1 % obj.	Anglie
22	Brouwerij Van Honsebrouck	Kasteel Hoppy	SV	Belgian Ale	6,5 % obj.	Belgie
23	Fuller's	Fuller's London Pride	SV	Premimu Bitter/ESB	4,7 % obj.	Anglie
44	Brouwerij Van Steenberge	Bornem Tripel	SV	Abbey Tripel	9,0 % obj.	Belgie
45	Brouwerij Bosteels	Pauwel Kwak	SV	Belgian Strong Ale	8,4 % obj.	Belgie
46	Brouwerij Van Steenberge	Augustijn Blond	SV	Belgian Strong Ale	7,5 % obj.	Belgie
47	Victory Brewing Company (ABV)	Victory DirtWolf Double IPA	SV	Double IPA	8,7 % obj.	USA
48	Klosterbrauerei Weltenburg	Weltenburger Kloster Anno 1050	SP	Amber Lager	5,5 % obj.	Německo
49	Spaten-Franziskaner-Bräu	Spaten Oktoberfestbier	SP	Oktoberfest/Märzen	5,9 % obj.	Německo
50	Kulmbacher Brauerei	Kulmbacher Mönchshof Kellerbier	SP	Keller/Landbier	5,4 % obj.	Německo
51	Fuller's	India Pale Ale	SV	IPA	5,3 % obj.	Anglie

SV – svrchní, SP – spodní

### 3.5 Příprava vzorků

Vzorky pív byly nejdříve odplyněny ultrazvukem po dobu 40 minut. Následně byly vzorky zfiltrány přes mikrofiltry a naředěny destilovanou vodou. Na analýzu organických látek pomocí iontové chromatografie bylo použito ředění 1:1, do zkumavek bylo tedy pipetováno 5 ml vzorku a 5 ml destilované vody. Na prvkovou analýzu byly vzorky ředěny 10x (1 ml vzorku a 9 ml destilované vody) pro analýzu mikroelementů, pro analýzu makroelementů byly vzorky ředěny 25x (0,4 ml vzorku a 9,6 ml destilované vody). Pro analýzu polyfenolů vzorky ředěny nebyly.

### 3.6 Příprava kalibračních roztoků

Pro analýzu polyfenolů byly připraveny kalibrační roztoky ředěním standardů o koncentraci 1 g/l. Do 25 ml odměrných baněk bylo pipetováno 0,002 5; 0,025; 0,25; 1,25; 2,5 a 5 ml. Odměrné baňky byly doplněny po rysku destilovanou vodou. Výsledná o koncentrace kalibračních roztoků byla 0,1; 1; 10; 50; 100 a 200 mg/l.

Pro prvkovou analýzu byly připraveny dva kalibrační roztoky – jeden pro makro a jeden pro mikroelementy. Kalibrační roztok makroelementů byl připraven do 25 ml odměrné baňky ředěním standardů o koncentraci 1 g/l. Do odměrné baňky bylo pipetováno po 0,25 ml standardu Ca, Mg, Na a 0,625 ml K a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace prvků v roztoku byla 10 mg/l Ca, Mg, Na a 25 mg/l K. Kalibrační roztok mikroelementů byl také připraven do 25 ml odměrné baňky ředěním standardů o koncentraci 1 g/l. Do odměrné baňky bylo pipetováno po 25  $\mu$ l Cu, Fe, Mn, Zn, P a 250  $\mu$ l Si. Výsledná koncentrace prvků v roztoku byla 1 mg/l Cu, Fe, Mn, Zn, P a 10 mg/l Si.

Pro analýzu organických kyselin byly připraveny kalibrační roztoky postupným ředěním standardů. Výsledná koncentrace organických kyselin v roztocích byla 10, 20, 50 a 100 mg/l fumarátu, acetátu, malátu a formiátu. U citrátu, laktátu a sukcinátu byla výsledná koncentrace 25, 50 a 100 mg/l.

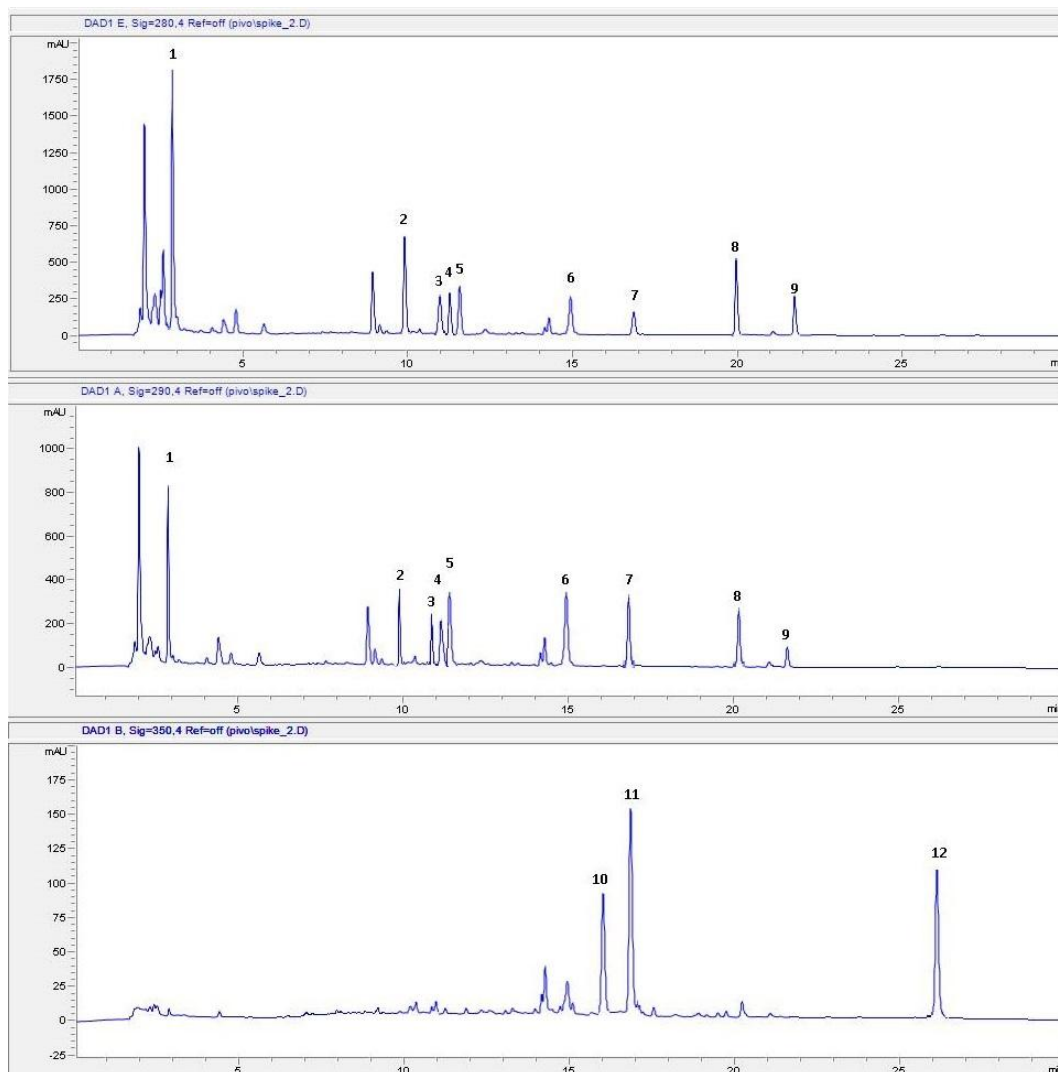
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Analýza vzorků

Vzorky pív byly podrobeny třem různým analýzám za použití třech různých metod. Pro stanovení polyfenolů v pivu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Organické kyseliny v pivu byly stanovovány pomocí iontové chromatografie a makroelementy a mikroelementy v pivu byly stanovovány za použití optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou.

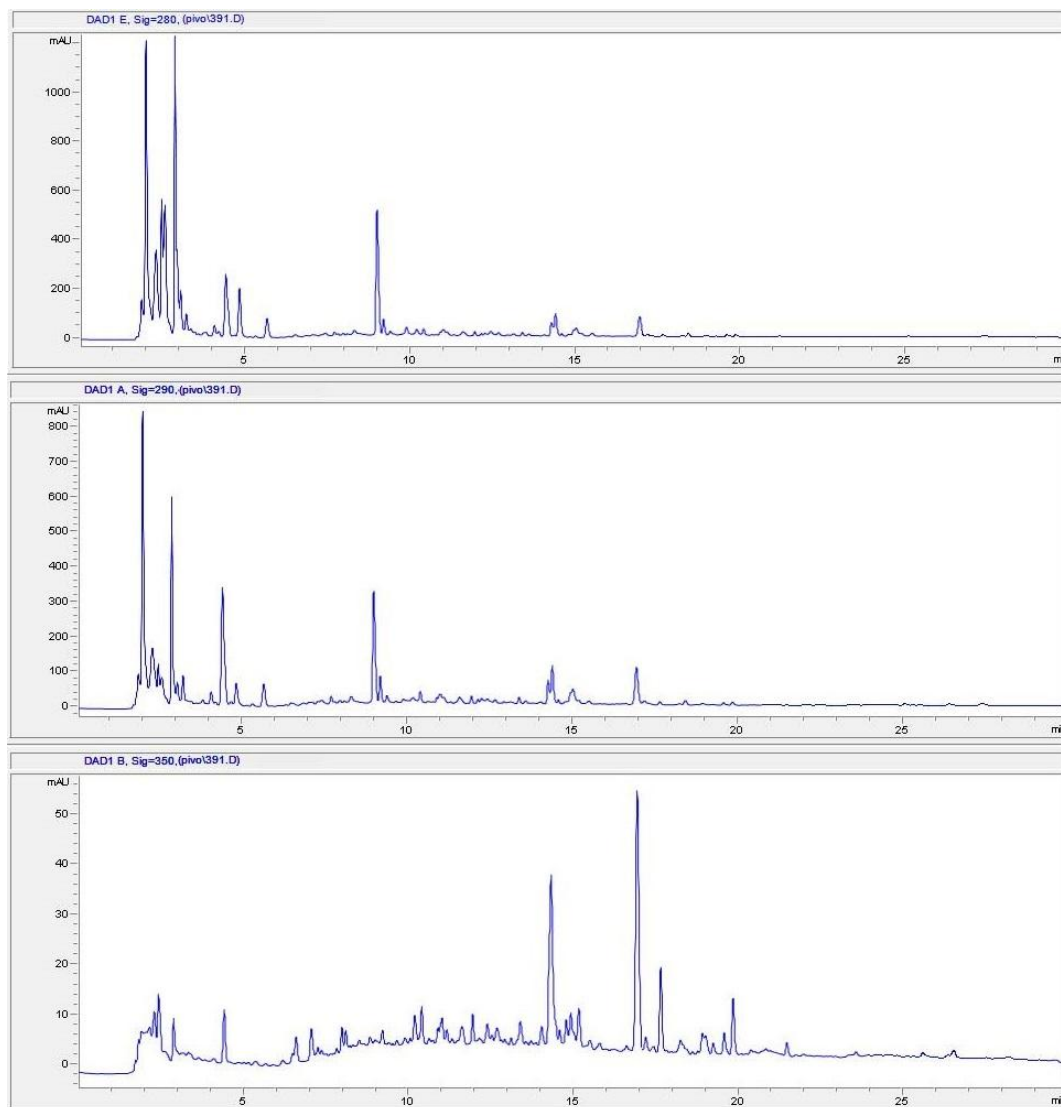
#### 4.1.1 Analýza polyfenolických látek pomocí HPLC

Ve vzorcích piva bylo stanovováno celkem 12 flavonoidních látek – kyseliny gallová, skořicová, kávová, vanilinová, kumarová, ferulová, dále katechin, naringin, hesperidin, umbeliferon, rutin a kvercetin. Vzorky pív byly měřeny při vlnových délkách 280, 290 a 350 nm. Chromatogramy uvedené na *Obrázku 5* popisují absorpci látek při různých vlnových délkách. Čísla nad píky zastupují názvy identifikovaných látek: 1 – kyselina gallová, 2 – katechin, 3 – kyselina skořicová, 4 – kyselina kávová, 5 – kyselina vanilinová, 6 – kyselina kumarová, 7 – kyselina ferulová, 8 – naringin, 9 – hesperidin, 10 – umbeliferon, 11 – rutin, 12 – kvercetin.



Obrázek 5: Chromatogramy naspikovaných polyfenolických látek při 280, 290 a 350 nm.

Látky byly ve vzorcích piva identifikovány pomocí retenčních časů standardů, které byly naspikované do vzorků piv. Na *Obrázku 6* jsou uvedeny chromatogramy vzorku piva. V porovnání s retenčními časy naspikovaných vzorků jsou retenční časy látek ve vzorku piva o několik desetin minut větší.



*Obrázek 6: Chromatogramy polyfenolických látek ve vzorku piva při 280, 290 a 350 nm.*

Pivo obsahuje řadu polyfenolů, z nichž většina pochází ze sladu, zbytek pochází z chmele [19]. Polyfenoly jsou důležité pro chemickou stabilitu a trvanlivost piva. Také ovlivňují jeho chuť (hořkost, trpkost, tvrdost) a barvu [11]. Fenolové sloučeniny mohou také působit jako antioxidanty v lidském těle, jako ochranné prostředky proti oxidaci kyseliny askorbové a nenasycených mastných kyselin [19].

Ve všech vzorcích piv tvořila největší podíl kyselina gallová. Na rozdíl od ostatních polyfenolických látek byla v pivu zastoupena v koncentraci desítek až stovek mg/l. Koncentrace kyseliny gallové ve vzorcích byla v rozmezí 28,726 0–111,299 8 mg/l. Nejmenší obsah kyseliny gallové byl ve vzorku č. 44. Jednalo se o belgické pivo pivního stylu Tripel.

Naopak nejvyšší koncentrace kyseliny gallové byla nalezena ve vzorku č. 20, amerického svrchně kvašeného piva.

Obsah katechinu v pivech literatura udává mezi  $1,41 \pm 0,04$ – $3,75 \pm 0,13$  mg/l [21]. Katechin byl pivu zastoupen v rozmezí  $0,667$ – $7,796$  mg/l. Nejmenší koncentrace katechinu byla ve vzorku č. 48 německého spodně kvašeného piva. Nejvyšší koncentrace byla ve vzorku č. 20.

Kyselina skořicová byla ve vzorcích v rozmezí koncentrací  $0,257$ – $3,076$  mg/l. Ve vzorku č. 23 byla koncentrace kyseliny pod mezí detekce. Tento vzorek piva je zařazován do pivního stylu Premium bitter. Tento pivní styl je odlišný od ostatních analyzovaných piv. Nejvyšší koncentrace kyseliny skořicové byla nalezena ve vzorku č. 47 amerického výrobce svrchně kvašeného piva.

Literatura udává koncentraci kyseliny kávové v pivech v rozmezí  $0,12 \pm 0,03$ – $1,22 \pm 0,05$  mg/l [22]. Kyselina kávová byla v pivu stanovena v nízké koncentraci. V několika vzorcích byla koncentrace pod mezí detekce (vzorek č. 20, 44, 46, 47) nebo kvantifikace (vzorek č. 49).

Literatura uvádí koncentraci kyseliny vanilinové od  $0,56 \pm 0,02$ – $2,43 \pm 0,44$  mg/l [23]. Kyselina vanilinová byla ve vzorcích zastoupena ve velmi rozdílných koncentracích. Ve vzorku č. 20 byla kyselina v nejvyšší koncentraci ze všech vzorků ( $2,602$  mg/l). Naopak nejmenší stanovená koncentrace byla ve vzorku č. 22 ( $0,082$  mg/l). Koncentrace kyseliny ve vzorku č. 21 byla pod mezí detekce.

Koncentrace kyseliny kumarové je literaturou udávána v rozsahu  $0,01 \pm 0,01$ – $2,00$  [24], [22]. Kyselina kumarová byla ve vzorcích zastoupena v rozmezí  $0,081$ – $3,044$  mg/l. Ve dvou vzorcích byla kyselina pod mezí detekce (vzorek č. 22, 49).

Ferulová kyselina je obsažena v ječmeni, sladu a pivu. Tato kyselina je účinným antioxidantem a má protirakovinné účinky in vitro [11]. V dostupné literatuře je koncentrace kyseliny ferulové v pivu uváděna v koncentracích  $0,10$ – $2,00$  mg/l [24, 23]. Kyselina ferulová byla pod mezí detekce u vzorku č. 44 a 45. U ostatních vzorků byla koncentrace kyseliny ferulové v rozsahu  $0,077$ – $3,585$  mg/l. Nejnižší a nejvyšší koncentrace byla stanovena u pivních stylů.

Koncentrace umbeliferonu byla stanovena pouze u pěti vzorků. Ve vzorcích č. 44–47 a 49 byla koncentrace umbeliferonu pod mezí detekce a ve vzorcích č. 23, 48, 50 a 51 byl umbeliferon pod mezí kvantifikace.

Rutin má protizánětlivý účinek, působí proti artritidě a má antifungicidní účinky. Inhibuje aldo reduktázovou aktivitu a může inhibovat angiogenezi. Jedná se o účinný inhibitor iontů železa při peroxidaci lipidů, neboť vytváří inertní komplexy železa, které nejsou schopny iniciovat peroxidaci lipidů. Rutin může mít ochranný účinek proti některým neurologickým poruchám jako je například Parkinsonova choroba [11]. Rutin je obsažen v pohance. O pohance se uvažuje jako o náhražce jiných obilovin při výrobě bezlepkových piv, neboť je podobná

ječmeni, a proto z ní lze vyrobit slad, ze kterého se může uvařit pivo bez gliadinů nebo hordeinů (proteinů, které společně tvoří gluten). Pivo je vhodné pro celiaky [11]. Koncentrace rutinu v pivech kolísá z 0,06 mg/l na 0,64 mg/l [24]. Nejvyšší koncentrace rutinu byla nalezena ve vzorku č. 18 (3,615 2 mg/l) a naopak nejmenší ve vzorku č. 44 (0,069 7 mg/l).

Koncentrace kvercetinu je v dostupné literatuře uváděna v rozmezí 0,06–0,16 mg/l [24]. Kvercetin ve vzorcích piv byl stanoven v koncentračním rozsahu 0,157 6–0,682 6 mg/l, v několika vzorcích byl pod mezí kvantifikace.

Koncentrace naringinu a hesperidinu byla u všech vzorků pod mezí detekce.

Zastoupení polyfenolických látek a jejich koncentrace v jednotlivých vzorcích piv je shrnuto v *Tabulce 12*.

Tabulka 12: Výsledná koncentrace polyfenolů v pivu [mg/l].

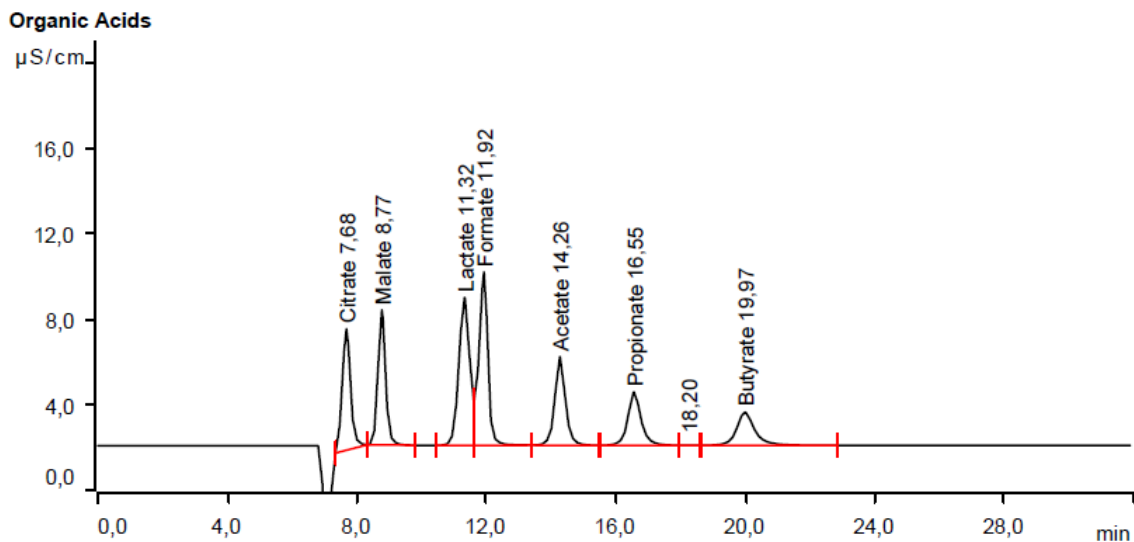
látko	$\lambda$ [nm]	18	19	20	21	22	23	44
kyselina gallová	280	86,6704	40,4540	111,2998	42,1549	32,6265	50,0165	28,7260
katechin	280	4,2052	3,3515	7,7963	2,1430	5,6758	2,7148	1,1635
naringin	280	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
hesperidin	280	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
kyselina skořicová	290	0,4893	0,2575	0,6156	0,3865	1,4103	< LOD	1,2225
kyselina kávová	290	0,4373	0,1291	< LOD	0,3099	0,2168	0,1424	< LOD
kyselina vanilinová	290	0,5185	0,6460	2,6022	< LOQ	0,0820	1,1303	0,0993
kyselina kumarová	290	0,5788	0,9586	1,4556	0,4493	< LOD	0,1034	0,1397
kyselina ferulová	290	3,5850	1,0157	2,6502	1,0757	0,6842	1,0386	< LOD
umbeliferon	350	0,2055	0,2196	0,1687	0,1711	0,1920	< LOQ	< LOD
rutin	350	3,1780	1,4733	1,8800	1,0033	0,8151	0,7597	0,0697
kvercetin	350	0,1576	< LOQ	0,1881	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

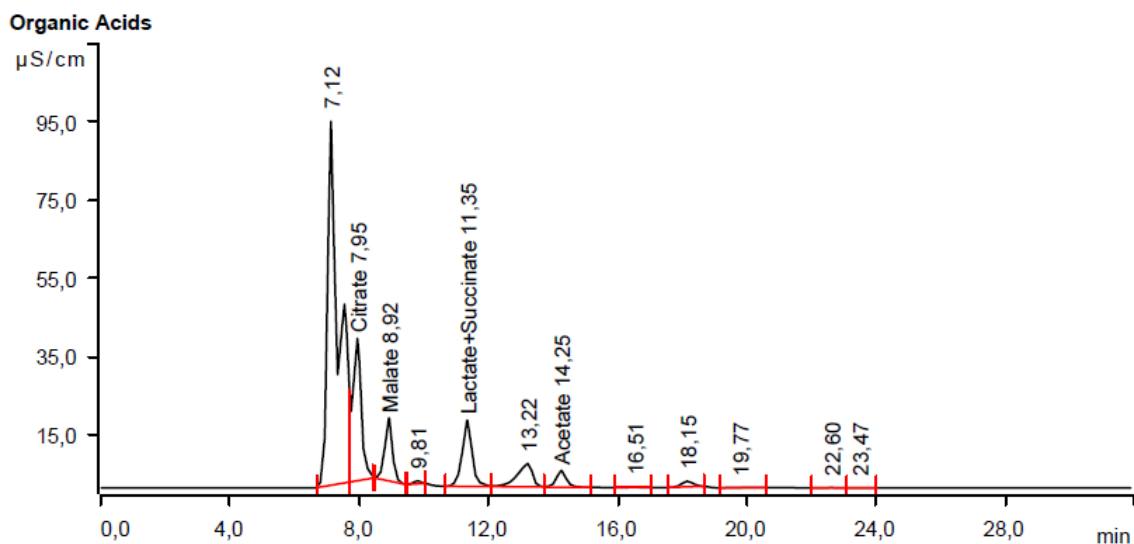
látko	$\lambda$ [nm]	45	46	47	48	49	50	51
kyselina gallová	280	77,2513	60,5767	61,1421	71,7644	86,1811	70,8322	73,1074
katechin	280	1,2786	1,9338	3,4706	0,6671	1,6539	3,7287	3,4766
naringin	280	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
hesperidin	280	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
kyselina skořicová	290	0,6264	2,2138	3,0765	0,7755	1,5154	1,5600	2,2027
kyselina kávová	290	0,0979	< LOD	< LOD	0,0624	< LOQ	0,1663	0,5632
kyselina vanilinová	290	0,3603	0,1883	1,0157	0,4834	0,9949	0,6376	0,9178
kyselina kumarová	290	0,1943	0,0813	3,0443	0,3968	< LOD	0,5867	0,4988
kyselina ferulová	290	< LOD	0,2238	0,1872	0,0996	0,1654	0,1631	0,0771
umbeliferon	350	< LOD	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOQ	< LOQ
rutin	350	0,2459	0,3443	3,6152	1,0651	1,1647	1,0493	1,6150
kvercetin	350	0,6826	0,3674	0,4164	0,2332	0,1768	< LOQ	0,4718

#### 4.1.2 Analýza organických kyselin pomocí IC

Pomocí iontové chromatografie bylo detekováno 6 organických kyselin – kyselina citronová, jablečná, mléčná, jantarová, mravenčí a octová. Protože se kyselina mléčná a jantarová neodseparovaly, byly stanovovány jako směs obou kyselin.



Obrázek 7: Chromatogram organických kyselin ve standardu.



Obrázek 8: Chromatogram organických kyselin ve vzorku piva.

V pivu bylo identifikováno více než 150 různých organických kyselin včetně mastných kyselin, di- a trikarboxykyselin, ketokyselin a aldokyselin, aromatických kyselin, fenolických kyselin a polyheterocyklických kyselin. Nachází se v něm šest hlavních nízkomolekulárních organických kyselin: jablečná, citronová, pyrohroznová, mléčná, octová a kyselina jantarová. Tyto kyseliny jsou důležité pro chuť piva, ale slouží i jako biomarkery fermentačního procesu

(převážně kyselina mléčná a pyrohroznová). Nízkomolekulární organické kyseliny neabsorbují světlo s vlnovou délkou větší než 210 nm, ale v pivu jsou obsaženy v relativně vysoké koncentraci (10–300 mg/l) [11].

V pivovarství jsou organické kyseliny metabolickými meziprodukty nebo vedlejšími produkty vylučovanými pivovarskými kvasinkami [11]. Pouze kyselina citronová a částečně kyselina jablečná mohou pocházet z použitých surovin pro výrobu piva. Ostatní kyseliny jsou převážně vedlejší produkty alkoholového kvašení [19]. Organické kyseliny jsou nezbytné pro stabilitu pH a chuť piva [11].

Výslednou koncentraci organických kyselin v analyzovaných vzorcích zahraničních piv shrnuje *Tabulka 13*.

Množství kyseliny citronové v pivu závisí především na její koncentraci v mladině, avšak i kvasinkové kmeny mohou ovlivnit její výslednou koncentraci [21]. Koncentrace kyseliny citronové se ve vzorcích pohybovala v rozsahu 202,991 0–556,612 5 mg/l. Nejmenší koncentrace byla nalezena ve vzorku č. 44. Naopak nejvyšší koncentrace kyseliny citronové byla stanovena ve vzorku č. 47.

Akumulace kyseliny jablečné během fermentace závisí především na kmeni použitých kvasinek [21]. Koncentrace kyseliny jablečné se pohybovala v rozsahu 90,228 0–264,412 0 mg/l. Nejnižší koncentrace kyseliny jablečné byla v pivním vzorku č. 50, nejvyšší ve vzorku č. 47.

Kyselina mléčná je při výrobě piva vylučována v období utilizace cukru. Konečná koncentrace kyseliny mléčné závisí také na použitém kvasinkovém kmeni. V porovnání s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* byla koncentrace kyseliny mléčné v pivu vyšší při použití kmene kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis*. Kyselina jantarová je ve velké míře vylučována při kvašení mladiny [21]. Koncentrace kyseliny mléčné a jantarové ve směsi se ve vzorcích piv pohybovala v rozmezí 98,199 3–385,645 1 mg/l.

Kyselina octová je známa jako hlavní složka těkavých kyselin v pivu a v některých případech může být indikátorem bakteriální aktivity. Většina kyseliny octové je produkována kvasinkami při kvašení [21, 25]. Koncentrace kyseliny octové vyrobené během alkoholové fermentace se může lišit v závislosti na kmenu kvasinek, složení sladiny a fermentačních podmínkách [25]. Kyselina octová se akumuluje v mladině v lag-fázi a na počátku fermentace, poté koncentrace klesá. Znovu se hromadí v mladině v pozdějších fázích fermentace a také při konečném využití cukru. Množství přírůstku kyseliny odpovídá poklesu hladiny pyruvátu, což naznačuje možnost, že se pyruvát převádí na acetát [21]. Koncentrace kyseliny octové v pivech kolísá mezi 50 a 200 mg/l. Vysoké koncentrace kyseliny octové přispívají k nežádoucí chuti piva a způsobuje výrazné snížení kvality. Z tohoto důvodu je kontrola výroby kyseliny octové při vaření piva důležitá [25]. Nejnižší koncentrace kyseliny octové byla naměřena v pivu č. 21, naopak nejvyšší v pivu č. 22.

Koncentrace kyseliny mravenčí byla ve všech vzorcích piv pod mezí detekce.

Tabulka 13: Výsledná koncentrace organických látek ve vzorcích pív [mg/l].

látko	18	19	20	21	22	23	44
<b>citronová</b>	477,2899	433,3221	482,9217	222,9410	267,1975	239,1541	202,9910
<b>jablečná</b>	259,6700	193,3060	205,5280	116,3680	234,0380	134,1780	205,7060
<b>laktát + sukcinát</b>	193,6533	98,1993	173,7932	144,5794	241,1001	101,5536	374,8958
<b>mravenčí</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>octová</b>	20,5360	22,0100	77,6100	16,4640	252,8940	49,9320	158,1700

látko	45	46	47	48	49	50	51
<b>citronová</b>	397,0488	414,6684	556,6125	335,7027	429,4171	344,5047	397,9988
<b>jablečná</b>	179,3020	162,6440	264,4120	114,2820	123,7980	90,2280	167,0520
<b>laktát + sukcinát</b>	230,9570	385,6451	190,2904	164,8798	173,2757	139,0975	113,2580
<b>mravenčí</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>octová</b>	41,6900	82,5700	58,9380	85,2540	121,5840	127,4300	114,2620

#### 4.1.3 Prvková analýza pomocí ICP-OES

Majoritní minerální prvky neboli makroelementy v potravinách bývají zastoupeny ve stovkách až deseti tisících mg/kg. Do této kategorie se řadí prvky Na, K, Ca, Mg, Cl, P a S. Minoritní minerální prvky, jež se v potravinách vyskytují v menším množství (desítky až stovky mg/kg), tvoří přechod mezi majoritními a stopovými prvky. Stopové minerální prvky neboli mikroelementy jsou obsaženy v koncentracích desítek mg/kg a méně. Patří sem například Al, Cu, F, Fe, Mn, Mo, Pb a Zn [26].

Majoritní, minoritní a stopové kovy jsou důležité při kvašení piva, neboť vytváří vhodné prostředí pro růst kvasinek a ovlivňují jejich metabolismus. Měď a železo mají vliv na stav a stárnutí piva prostřednictvím reakcí, které vedou k tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů. Tyto reaktivní formy kyslíku snadno oxidují organické látky přítomné v pivu a mají za následek změnu kvality pění piva i změnu v jeho chuti. Kovy v pivu mají také určitý nutriční význam, avšak jejich skutečný efekt závisí na tvorbě komplexů s nízkomolekulárními a vysokomolekulárními organickými ligandy, které se v pivu přirozeně vyskytují [27].

Prvkovou analýzou bylo detekováno pět mikroelementů (Cu, Fe, Mn, Zn, Si) a pět makroelementů (K, Ca, Mg, Na, P). Tabulka 14 shrnuje, při kterých vlnových délkách byly prvky detekovány.

Tabulka 14: Použité vlnové délky pro prvkovou analýzu.

prvek	$\lambda$ [nm]	prvek	$\lambda$ [nm]
<b>měď</b>	327,396	<b>zinek</b>	206,191
<b>železo</b>	259,94	<b>vápník</b>	393,366/422,673
<b>mangan</b>	257,61	<b>draslík</b>	766,49
<b>fosfor</b>	213,618	<b>hořčík</b>	285,213
<b>křemík</b>	251,611	<b>sodík</b>	588,995

S výjimkou křemíku byly mikroelementy ve vzorcích zastoupeny ve velmi nízkých koncentracích. Celkový přehled koncentrací makroprvků a mikroprvků popisují *Tabulka 15, 16*.

Obsah železa ve vzorcích kolísal z  $0,05 \pm 0,01$  mg/l na 0,42 mg/l, u manganu z 0,15 mg/l na  $0,40 \pm 0,01$  mg/l.

Dostupná literatura uvádí koncentraci mědi v pivech plzeňského typu a v tmavých pivech v rozsahu  $0,038 \pm 0,003$ – $0,155 \pm 0,007$  mg/l [28]. Koncentrace mědi v analyzovaných vzorcích byla stanovena od  $0,03 \pm 0,01$  mg/l do  $0,33 \pm 0,02$  mg/l. Ve vzorku č. 21 se nepodařilo měď kvantifikovat, koncentrace mědi byla pod mezí detekce přístroje.

Koncentrace manganu se pohybovala v rozmezí 0,15–0,40 mg/l, což koresponduje s hodnotami, které uvádí odborná literatura ( $0,110 \pm 0,005$ – $0,348 \pm 0,013$  mg/l) [28].

Obsah křemíku se dle dostupné literatury pohybuje v desítkách mg/l, nečastěji se jedná o 20–50 mg/l. Polská piva obsahují vysoké koncentrace křemíku, a proto patří k nejvýznamnějším zdrojům křemíku. Vyšší koncentrace křemíku v polských pivech se přisuzuje rozdílným postupům při výrobě piva (např. využití anorganických sloučenin křemíku jako čiridel). Naopak piva britská a německá vykazují spíše nižší koncentrace křemíku. V německých pivech se množství křemíku pohybuje mezi 10 a 40 mg/l [29]. Koncentrace křemíku v českých pivech se pohybuje v rozsahu 16–113 mg/l [30]. Koncentrace křemíku jsem stanovila v rozmezí  $24,91 \pm 0,15$ – $37,11 \pm 0,14$  mg/l. Pouze polské pivo č. 18 převyšovalo koncentraci 60 mg/l. Německá piva (vzorky č. 48, 49 a 50) obsahovala křemík do 40 mg/l.

Zinek byl v pivech zastoupen v nepatrném množství, a to v koncentracích od 0,02 mg/l do 0,09 mg/l. Vzorek č. 18 se od ostatních vzorků lišil, zde byla koncentrace zinku 0,31 mg/l. Naměřené koncentrace zinku se podobaly koncentracím zinku uváděných v odborné literatuře ( $0,052 \pm 0,002$ – $0,226 \pm 0,006$  mg/l) [28].

Z makroelementů byl v pivech nejvíce zastoupen draslík. Nejvyšší koncentrace draslíku byla naměřena u vzorku č. 18 ( $1201,68 \pm 9,57$  mg/l) a naopak nejnižší u vzorku č. 21 ( $406,90 \pm 21,85$  mg/l). Dále byl v pivu obsažen ve vysokých koncentracích hořčík ( $83,65 \pm 1,45$ – $269,25 \pm 7,24$  mg/l). Koncentrace vápníku byla ve vzorcích piv naměřena v rozsahu  $28,48 \pm 0,33$ – $150,52 \pm 3,63$  mg/l. U vzorků č. 18 a 47 byla naměřena nízká koncentrace vápníku v porovnání s ostatními vzorky. Ve vzorku č. 18 byla stanovena koncentrace vápníku  $37,11 \pm 1,99$  mg/l, ve vzorku č. 47 byla koncentrace vápníku  $28,48 \pm 0,33$  mg/l. Vzorky č. 48, 49 a 50, jež jsou německá spodně kvašená piva, obsahovaly podobné koncentrace vápníku. Sodík byl zastoupen v pivech v obdobných koncentracích jako vápník. Sodík byl v pivech naměřen v koncentracích  $11,49 \pm 0,29$ – $132,50 \pm 5,42$  mg/l. Nižší koncentrace sodíku obsahovala spodně kvašená piva, převážně vzorek č. 48 ( $11,49 \pm 0,29$  mg/l) a vzorek č. 49 ( $12,68 \pm 0,42$  mg/l). Nejvyšší koncentraci sodíku obsahovalo vysoce chmelené pivo č. 22. Koncentrace sodíku v tomto vzorku byla  $132,50 \pm 5,42$  mg/l. Odborná literatura uvádí průměrnou koncentraci fosforu v pivech  $349 \pm 4,6$  mg/l [31]. Koncentrace fosforu v zahraničních ležácích je v odborných člancích

udávána v rozmezí 210,81–379,36 mg/l [32]. Fosfor byl v pivu obsažen ve velkém množství, jeho koncentrace v pivech se nacházela v rozsahu  $145,08 \pm 3,75$ – $684,43 \pm 14,41$  mg/l. Vysoké koncentrace fosforu se vyskytovaly u vzorků, které se řadí do pivního stylu Double IPA.

Tabulka 15: Výsledná koncentrace mikroelementů ve vzorcích piv [mg/l].

vzorek	Cu	Fe	Mn	Si	Zn
18	$0,195 \pm 0,001$	$0,415 \pm 0,002$	$0,400 \pm 0,001$	$63,83 \pm 0,07$	$0,305 \pm 0,001$
19	$0,03 \pm 0,01$	$0,070 \pm 0,003$	$0,165 \pm 0,001$	$37,11 \pm 0,14$	$0,070 \pm 0,002$
20	$0,130 \pm 0,002$	$0,175 \pm 0,001$	$0,295 \pm 0,003$	$36,90 \pm 0,32$	$0,085 \pm 0,002$
21	$< 0,013$	$0,195 \pm 0,001$	$0,175 \pm 0,002$	$24,91 \pm 0,15$	$0,085 \pm 0,001$
22	$0,130 \pm 0,001$	$0,155 \pm 0,003$	$0,260 \pm 0,001$	$28,23 \pm 0,21$	$0,080 \pm 0,003$
23	$0,075 \pm 0,003$	$0,165 \pm 0,001$	$0,290 \pm 0,004$	$24,95 \pm 0,06$	$0,060 \pm 0,001$
44	$0,33 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,01$	$0,280 \pm 0,001$	$25,09 \pm 0,21$	$0,043 \pm 0,002$
45	$0,233 \pm 0,001$	$0,29 \pm 0,01$	$0,266 \pm 0,002$	$32,94 \pm 0,75$	$0,028 \pm 0,001$
46	$0,20 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	$27,46 \pm 0,47$	$0,034 \pm 0,003$
47	$0,26 \pm 0,01$	$0,067 \pm 0,002$	$0,22 \pm 0,01$	$36,43 \pm 0,35$	$0,034 \pm 0,002$
48	$0,11 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$27,61 \pm 0,65$	$0,021 \pm 0,001$
49	$0,13 \pm 0,01$	$0,086 \pm 0,003$	$0,22 \pm 0,01$	$30 \pm 1$	$0,016 \pm 0,002$
50	$0,14 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,145 \pm 0,002$	$30,55 \pm 0,29$	$0,035 \pm 0,001$
51	$0,07 \pm 0,01$	$0,113 \pm 0,004$	$0,40 \pm 0,01$	$27,81 \pm 0,22$	$0,023 \pm 0,001$

Tabulka 16: Výsledná koncentrace makroelementů ve vzorcích piv [mg/l].

vzorek	Ca	K	Mg	Na	P
18	$37,11 \pm 1,99$	$1201,68 \pm 9,57$	$227,45 \pm 1,33$	$33,51 \pm 1,04$	$651,66 \pm 11,11$
19	$51,65 \pm 3,35$	$518,5 \pm 13,2$	$83,65 \pm 1,45$	$52,00 \pm 0,96$	$252,21 \pm 2,81$
20	$55,505 \pm 2,275$	$1057,47 \pm 51,09$	$269,25 \pm 7,24$	$63,31 \pm 3,63$	$677,97 \pm 11,19$
21	$149,33 \pm 6,42$	$406,90 \pm 21,85$	$89,30 \pm 0,83$	$30,91 \pm 1,12$	$145,08 \pm 3,75$
22	$79,1 \pm 3,1$	$650,26 \pm 31,66$	$124,75 \pm 5,24$	$132,50 \pm 5,42$	$275,27 \pm 6,24$
23	$120,55 \pm 5,22$	$568,21 \pm 9,53$	$135,31 \pm 4,63$	$109,90 \pm 2,97$	$226,25 \pm 2,82$
44	$46,42 \pm 0,52$	$436,61 \pm 8,56$	$89,4 \pm 0,6$	$95,74 \pm 2,15$	$457,25 \pm 12,08$
45	$87,98 \pm 2,93$	$858,79 \pm 15,54$	$145,65 \pm 2,13$	$23,80 \pm 0,97$	$494,59 \pm 9,91$
46	$126,50 \pm 2,82$	$585,7 \pm 11,8$	$149,43 \pm 1,33$	$101,69 \pm 2,56$	$482,27 \pm 0,79$
47	$28,48 \pm 0,33$	$832,91 \pm 1,73$	$132,05 \pm 3,16$	$58,8 \pm 1,2$	$684,43 \pm 14,41$
48	$75,97 \pm 2,16$	$585,47 \pm 10,67$	$126,8 \pm 2,1$	$11,49 \pm 0,29$	$426,28 \pm 4,95$
49	$82,03 \pm 1,59$	$617,49 \pm 10,98$	$140,19 \pm 1,26$	$12,68 \pm 0,42$	$523,43 \pm 13,73$
50	$99,68 \pm 2,02$	$598,15 \pm 11,93$	$122,88 \pm 4,92$	$21,19 \pm 0,49$	$441,26 \pm 4,19$
51	$150,52 \pm 3,63$	$743,17 \pm 13,65$	$128,76 \pm 1,74$	$110,36 \pm 2,72$	$378,24 \pm 18,87$

## 5 ZÁVĚR

Pivo je komplexní matrice obsahující velké množství sloučenin, přičemž složení každého piva je odlišné a specifické použitými surovinami, jejich kvalitou a složením. Složení piva také ovlivňuje daná technologie výroby. V této práci bylo analyzováno celkem 14 zahraničních piv různých pivních stylů z 6 zemí, konkrétně z USA, Anglie, Nizozemí, Belgie, Německa a Polska. Cílem bakalářské práce bylo stanovit a kvantifikovat vybrané látky v zahraničních pivech pomocí moderních analytických metod a porovnat naměřené výsledky s údaji v dostupné literatuře.

Polyfenoly jsou v pivu zastoupeny v různých koncentracích. Vykazují antioxidační aktivitu, tzn. že zabraňují volným radikálům oxidovat jiné látky. Ve vysokých koncentracích však mohou způsobit zákal, který negativně působí na sensorickou kvalitu piva. Kromě výše zmíněných vlastností mají také vliv na aroma a chuť piva. Obsah a zastoupení polyfenolických látek v pivě závisí na tom, jaký druh chmele byl pro výrobu piva použit. Důležitou roli také hraje množství použitého chmele. V této práci bylo stanoveno celkem 12 polyfenolických látek – kyseliny gallová, skořicová, kávová, vanilinová, kumarová, ferulová, katechin, naringin, hesperidin, umbeliferon, rutin a kvercetin. Nejvyšší koncentrace v analyzovaných vzorcích piv byla naměřena u kyseliny gallové. V odborných člancích, zabývajících se stanovením polyfenolů v pivech, jsou koncentrace látek podobné hodnotám, které byly stanoveny v této práci. Jistá odlišnost je dána v důsledku analýz jiných piv a použitím jiných analytických metod.

Organické kyseliny jsou významné v oblasti acidity, neboť jejich tvorbou se snižuje hodnota pH mladiny i výsledného produktu. V pivě se objevují nejčastěji jako vedlejší produkty v průběhu fermentace mladiny důsledkem aktivity kvasinek. Na množství a složení organických kyselin má vliv i to, jaký kmen kvasinek se použije ke kvašení mladiny. Některé organické kyseliny ve vysokých koncentracích nepříznivě ovlivňují chuť piva. Analyzováno bylo celkem 6 organických kyselin, konkrétně kyselina citronová, jablečná, mléčná, jantarová, mravenčí a octová. Nejvyšší koncentrace v analyzovaných pivech byla naměřena u kyseliny citronové. Odborná literatura není příliš jednotná ve stanovování koncentrací organických látek v pivech. V porovnání s vědeckými články byl obsah kyselin v pivech několikanásobně vyšší. Může to být způsobeno výběrem vzorků k analýze a také jinými postupy a metodami stanovení.

Minerální látky se do piva dostávají především prostřednictvím surovin, které se používají v pivovarnictví, přičemž pravděpodobně největším nositelem minerálů je varní voda. Makroelementy, jako jsou vápník a hořčík, způsobují tvrdost vody a právě jejich množství ve varní vodě ovlivňuje i jejich zastoupení v pivě. Množství minerálních látek také ovlivňuje složení sladu a samotná technologie výroby. V analyzovaných vzorcích bylo stanoveno celkem 10 prvků, z toho pět je řazeno do kategorie makroelementů (Ca, K, Mg, Na, P) a pět do mikroelementů (Cu, Fe, Mn, Si, Zn). Koncentrace makroprvků klesala v pořadí  $K > P > Mg > Ca, Na$ . Z mikroprvků byl ve vzorcích piv nejvíce zastoupen křemík, ostatní prvky byly ve vzorcích obsaženy ve stopových koncentracích.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [2] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ a Tomáš LEJSEK. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [3] RYBÁČEK, Václav. *Chmelařství*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).
- [4] BRIGGS, D. E. *Brewing: science and practice*. Cambridge, England: Woodhead Pub. Ltd., 2004. ISBN 08-493-2547-1.
- [5] MEILGAARD, M. HOP ANALYSIS, COHUMULONE FACTOR AND THE BITTERNESS OF BEER: REVIEW AND CRITICAL EVALUATION. *Journal of the Institute of Brewing*. 1960, **66**(1), 35-50. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1960.tb01696.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1960.tb01696.x>
- [6] VERZELE, M. 100 YEARS OF HOP CHEMISTRY AND ITS RELEVANCE TO BREWING. *Journal of the Institute of Brewing*. 1986, **92**(1), 32-48. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04372.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04372.x>
- [7] REGAN, J. P. a J. A. ELVIDGE. CHEMISTRY OF HOP CONSTITUENTS. PART XXXIII REACTIONS OF  $\beta$ -ACIDS. *Journal of the Institute of Brewing*. 1969, **75**(1), 10-14. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1969.tb03175.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1969.tb03175.x>
- [8] PERPÈTE, Philippe, Laurent MÉLOTTE, Stéphane DUPIRE a Sonia COLLIN. Varietal Discrimination of Hop Pellets by Essential Oil Analysis I. Comparison of Fresh Samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1998, **56**(3), 104-108. DOI: 10.1094/ASBCJ-56-0104. ISSN 03610470. Dostupné také z: <http://www.asbnet.org/publications/journal/vol/abstracts/0921-05a.htm>
- [9] LERMUSIEAU, G., C. LIÉGEOIS a S. COLLIN. Reducing power of various hop varieties. *Cerevisia* [online]. 2001, **26**(1), 33-41 [cit. 2016-05-09]. ISSN 0770-1713. Dostupné z: [https://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Lermusieau\\_2001\\_Cerevisia\\_reducing\\_power\\_hop\\_varieties.pdf](https://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Lermusieau_2001_Cerevisia_reducing_power_hop_varieties.pdf)
- [10] VAN SUMERE, C.F., K. VANDE CASTEELE, W. HUTSEBAUT, E. EVERAERT, L. COOMAN a W. MEULEMANS. RP-HPLC analysis of flavonoids and the biochemical identification of hop cultivars. *EBC Monograph XIII, EBC Symposium on hops*, Freising-Weihenstephan, 1987, 146-175.
- [11] PAI, Tapasya V., Siddhi Y. SAWANT, Arindam A. GHATAK, Palak A. CHATURVEDI, Arpita M. GUPTA a Neetin S. DESAI. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, **52**(3), 1414-1423 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1007/s13197-013-1152-2. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1152-2>
- [12] Kol. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999, 348 s. ISBN 80-902-4329-0.

- [13] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Ostrava: P. Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902-1550-5.
- [14] ČERNOHORSKÝ, Tomáš a Pavel JANDERA. *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-719-4114-X.
- [15] SOMMER, Lumír. *Optická emisní spektrometrie v indukčně vázaném plazmatu a vysokoteplotních plamenech*. Praha: Academia, 1992, 151 s. Pokroky chemie. ISBN 80-200-0215-4.
- [16] MIERTUŠ, Stanislav. *Atómová a molekulová spektroskopie: Vysokoškolská učebnica pre chemickotechnologické fakulty vysokých škôl*. Bratislava: Alfa, 1992. Edícia chemickej literatúry. ISBN 80-050-0946-1.
- [17] HILL, Steve J. *Inductively coupled plasma spectrometry and its applications*. 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2007. Analytical chemistry series. ISBN 978-140-5135-948.
- [18] OTRUBA, Vítězslav (ed.). *6. kurz ICP spektrometrie: Brno 24.-26. května 2011*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011, 308 s. ISBN 978-80-903732-8-0.
- [19] MONTANARI, Luigi, Giuseppe PERRETTI, Fausta NATELLA, Alessia GUIDI a Paolo FANTOZZI. Organic and Phenolic Acids in Beer. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 1999, **32**(8), 535-539 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1006/fstl.1999.0593. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364389905935>
- [20] ERNY, Guillaume L., Joao E. A. RODRIGUES, Ana M. GIL, António S. BARROS a Valdemar I. ESTEVES. Analysis of Non-Aromatic Organic Acids in Beer by CE and Direct Detection Mode with Diode Array Detection. *Chromatographia* [online]. 2009, **70**(11-12), 1737-1742 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1365/s10337-009-1377-4. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-009-1377-4>
- [21] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Petr HULÍN, Marcel KARABÍN a Pavel DOSTÁLEK. Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech J. Food Sci.* [online]. 2007, **25**(4), 182-188 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00311.pdf>
- [22] ZHAO, Haifeng, Wenfen CHEN, Jian LU a Mouming ZHAO. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(3), 1150-1158 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.028. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460901022X>
- [23] PIAZZON, Alessandro, Monica FORTE a Mirella NARDINI. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(19), 10677-10683 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1021/jf101975q. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf101975q>
- [24] MAROVA, Ivana, Katerina PARILOVA, Zdenek FRIEDL, Stanislav OBRUCA a Katerina DURONOVA. Analysis of Phenolic Compounds in Lager Beers of Different Origin: A Contribution to Potential Determination of the Authenticity of Czech Beer. *Chromatographia* [online]. 2011, **73**(S1), 83-95 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1007/s10337-011-1916-7. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-011-1916-7>
- [25] ZHANG, Yanqing, Shiru JIA a Wujiu ZHANG. Predicting acetic acid content in the final beer using neural networks and support vector machine. *Journal of the Institute of Brewing* [online].

- 2012, **118**(4), 361-367 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1002/jib.50. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.50>
- [26] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [27] POHL, Pawel. Determination and fractionation of metals in beer: A review. *Food Additives* [online]. 2008, **25**(6), 693-703 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1080/02652030701772323. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030701772323>
- [28] NASCENTES, Clésia C., Marcos Y. KAMOGAWA, Kelly G. FERNANDES, Marco A.Z. ARRUDA, Ana Rita A. NOGUEIRA a Joaquim A. NÓBREGA. Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* [online]. 2005, **60**, 749-753 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/j.sab.2005.02.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854705000297>
- [29] CEJNAR, Rudolf a Pavel DOSTÁLEK. Křemík a pivo. *Chemické listy* [online]. 2013, **107**, 110-113 [cit. 2016-05-17]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_02\\_110-113.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_110-113.pdf)
- [30] CEJNAR, Rudolf, Oto MESTEK a Pavel DOSTÁLEK. Determination of Silicon in Czech Beer and its Balance During the Brewing Process. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2013, **31**(2), 166-171 [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/89885.pdf>
- [31] ASFAW, Alemayehu a Grethe WIBETOE. Simultaneous determination of hydride (Se) and non-hydride-forming (Ca, Mg, K, P, S and Zn) elements in various beverages (beer, coffee, and milk), with minimum sample preparation, by ICP–AES and use of a dual-mode sample-introduction system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2005, **382**(1), 173-179 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1007/s00216-005-3188-2. ISSN 1618-2650. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-005-3188-2>
- [32] ALCÁZAR, A. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content. *Talanta* [online]. 2002, **57**(1), 45-52 [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1016/S0039-9140(01)00670-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914001006701>

## SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Obecná struktura hlavních flavonoidních látek. ....</i>	13
<i>Obrázek 2: Diagram fází spodního hlavního kvašení [2]. ....</i>	21
<i>Obrázek 3: Diagram průběhu svrchního kvašení [2]. ....</i>	21
<i>Obrázek 4: Přehled druhů piv [2]. ....</i>	22
<i>Obrázek 5: Chromatogramy naspikovaných polyfenolických látek při 280, 290 a 350 nm. ....</i>	36
<i>Obrázek 6: Chromatogramy polyfenolických látek ve vzorku piva při 280, 290 a 350 nm. ....</i>	37
<i>Obrázek 7: Chromatogram organických kyselin ve standardu. ....</i>	41
<i>Obrázek 8: Chromatogram organických kyselin ve vzorku piva. ....</i>	41

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP – adenosintrifosfát

acetyl-CoA – acetylkoenzym A

CCD – nábojově vázaný obvod

DMS – dimethylsulfid

DMSO - dimethylsulfoxid

ELSD – evaporativní detektor

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IC – iontová chromatografie

ICP – indukčně vázaný plazmový výboj

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou

IPA – India Pale Ale

LC – kapalinová chromatografie

NADH - nikotinamidadenindinukleotid

OES – optická emisní spektrometrie

PC – papírová chromatografie

THF – tetrahydrofuran

TLC – tenkovrstvá chromatografie

UV – ultrafialové záření