



# 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

## ANALÝZA VÝČEPNÍHO PIVA POMOCÍ HPLC-ELSD A IC

DRAFT BEER ANALYSIS BY HPLC-ELSD AND IC

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petra Vanduchová

### 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:	<b>FCH-BAK1041/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Petra Vanduchová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	<b>doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název bakalářské práce:

Analýza výčepního piva pomocí HPLC-ELSD a IC

### 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) 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.

-----  
Petra Vanduchová  
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**

V této bakalářské práci je diskutován proces výroby piva a jeho složení. Experimentální část se zabývá analýzou polyfenolických sloučenin a sacharidy metodou HPLC, analýzou organických kyselin metodou IC a elementární analýzou metodou ICP-OES. Analýzou HPLC bylo stanoveno jedenáct polyfenolických látek. Nejvíce zastoupenou sloučeninou byla kyselina gallová a nejméně zastoupenou sloučeninou byl kvercetin. Metodou HPLC byly analyzovány sacharidy glukosa, fruktosa a sacharosa. Největší zastoupení měla glukosa. Elementární analýzou bylo analyzováno deset prvků. Nejméně zastoupeným byl zinek a nejvíce zastoupenými byly fosfor a draslík.

## **ABSTRACT**

In this bachelor thesis is discussed the brewing process and composition of the beer. The experimental part deals with analysis of polyphenolic compounds and carbohydrates by HPLC, analysis of organic acids by the IC and the ICP-OES method was used for analysis of elements. The HPLC method was used to determine eleven polyphenols. Gallic acid was the most represented compound of polyphenols and quercetin was the least represented compound. Glucose, fructose and sucrose were analysed by HPLC and the most represented compound of carbohydrates was glucose. The ICP-OES method was used to determine ten elements. Zinc was the least represented element in the analysis and phosphorus and potassium were the most represented in the analysis.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Pivo, HPLC, ICP-OES, IC, polyfenoly, organické kyseliny

## **KEY WORDS**

Beer, HPLC, ICP-OES, polyphenolic compounds, organic acids

VANDUCHOVÁ, P. *Analýza výčepního piva pomocí HPLC-ELSD a IC*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 60 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**

Tímto bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné vedení práce a diskuze o řešené problematice, dále panu Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. a paní Ing. Zuzaně Jurečkové za cenné rady a připomínky k prováděným experimentům. Závěrem chci poděkovat všem mým kolegům za jejich podporu a nápady při tvorbě závěrečné práce.



## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
2.1 Historie piva .....	9
2.2 Rozdělení piva.....	10
2.3 Suroviny pro výrobu piva.....	10
2.3.1 Voda .....	10
2.3.2 Chmel .....	11
2.3.3 Pivovarské kvasinky.....	11
2.3.4 Slad.....	12
2.3.4.1 Máčení ječmene.....	12
2.3.4.2 Klíčení ječmene.....	12
2.3.4.3 Hvozdění (sušení) ječmene .....	13
2.3.4.4 Odkličování sladu.....	13
2.4 Výroba piva .....	13
2.4.1 Příprava mladiny .....	13
2.4.1.1 Šrotování .....	13
2.4.1.2 Vystírání .....	13
2.4.1.3 Rmutování .....	13
2.4.1.4 Scezování sladiny a vyslazování mláta .....	14
2.4.1.5 Sladové mláto .....	14
2.4.1.6 Chmelovar .....	14
2.4.2 Hlavní kvašení .....	15
2.4.3 Dokvašování .....	16
2.4.4 Filtrace.....	16
2.4.5 Pasterace.....	16
2.4.5.1 Tunelová pasterace .....	17
2.4.5.2 Průtoková pasterace .....	17
2.5 Proces stárnutí piva .....	17
2.5.1 Reakční mechanismus stárnutí piva .....	18
2.5.1.1 Radikálové reakce – reakční formy kyslíku a dusíku.....	18
2.5.1.2 Maillardova reakce .....	19
2.5.1.3 Oxidace nenasycených mastných kyselin .....	19
2.5.1.4 Oxidace vyšších alkoholů.....	20
2.6 České pivo .....	20
2.6.1 Kritéria pro CHZO „České pivo“ .....	21
2.7 Pivo a zdraví.....	21
2.8 Látky v pivu .....	22

2.8.1	Polyfenoly .....	22
2.8.1.1	Fenolické kyseliny.....	22
2.8.1.2	Flavonoidy.....	23
2.8.2	Polyfenoly sladu .....	24
2.8.3	Polyfenoly chmele.....	25
2.8.4	Organické kyseliny.....	25
2.8.5	Sacharidy .....	25
2.9	Metody pro analýzu piva.....	26
2.9.1	HPLC.....	26
2.9.1.1	Volba chromatografického systému.....	26
2.9.1.2	Instrumentace v HPLC .....	27
2.9.1.3	Čerpadla .....	27
2.9.1.4	Vysokotlaké dávkovací ventily .....	28
2.9.1.5	Chromatografické kolony.....	28
2.9.1.6	Detektory .....	28
2.9.1.7	Vyhodnocení analýzy .....	29
2.9.2	Iontová chromatografie .....	30
2.9.3	ICP-OES.....	30
2.9.3.1	Vznik plazmatu .....	30
2.9.3.2	Experimentální uspořádání.....	31
2.9.3.3	Optická emisní spektrometrie.....	33
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
3.1	Laboratorní vybavení a přístroje .....	34
3.2	Použité chemikálie .....	37
3.3	Použitý materiál.....	39
3.4	Příprava roztoků .....	40
3.4.1	Příprava kalibračních roztoků .....	40
3.4.1.1	Kalibrační roztoky pro polyfenolické látky .....	40
3.4.1.2	Kalibrační roztoky pro prvkovou analýzu.....	42
3.4.1.3	Kalibrační roztoky pro organické kyseliny .....	42
3.4.1.4	Kalibrační roztoky pro stanovení sacharidů.....	42
3.5	Analýza vzorků piv .....	42
3.5.1	Stanovení polyfenolických látek .....	42
3.5.2	Stanovení sacharidů.....	43
3.5.3	Stanovení prvkové analýzy .....	43
3.5.4	Stanovení organických kyselin.....	43
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
4.1	Analýza polyfenolických sloučenin .....	44
4.2	Analýza sacharidů v pivech.....	47

4.3 Elementární analýza piva .....	49
4.4 Analýza organických kyselin .....	51
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>55</b>
<b>6. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>56</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>60</b>

# 1. ÚVOD

Pivo je v dnešní době jedním z nejrozšířenějších alkoholických nápojů po celém světě. Svou oblíbenost si získalo především svou jedinečnou chutí, složením a kvalitou. Základními surovinami pro výrobu piva je ječmen, ze kterého se vyrábí slad, chmel, voda a pivovarské kvasinky. Slad se vyrábí z ječmene jarního nebo setého. Většina pivovarů používá pro výrobu piva chmel pěstovaný v České republice. Nejznámější chmelařskou oblastí je Žatecká, kde se pěstuje Žatecký poloraný červeňák, který se nejvíce používá pro výrobu piva.

V první části práce je popsána výroba piva, která je možná několika způsoby. Tím nejznámějším způsobem výroby jsou piva plzeňského typu, která se vyrábí ve třech krocích. Sladování ječmene, příprava mladiny a její kvašení. Dále pak následují další kroky jako je filtrace, pasterace a stáčení. Mladina se připravuje dekokčním třířmutovým postupem. K hlavnímu kvašení se používají kmeny spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae subsp. uvarum*. Pro co nejlepší kvalitu piva probíhá hlavní kvašení a dokvašování každé zvlášť v cylindrokónických tancích. V průběhu fermentace se v pivu tvoří organické kyseliny jako např. kyselina jablečná, mléčná, citronová a octová. Tyto organické kyseliny jsou přírodními konzervanty a pro pivo jsou důležité z hlediska udržení trvanlivosti a jakosti piva.

Další část práce je věnována popisu látek obsažených v pivu. Pivo obsahuje mnoho důležitých minerálů a stopových prvků, jako jsou hořčík, draslík a vápník. Zdrojem těchto prvků není jen chmel a slad, ale také voda, která se pro výrobu piva používá. V pivu jsou obsaženy také vitaminy a to především vitaminy skupiny B.

Pivo je rovněž bohaté na flavonoidy a polyfenolové látky. Mezi tyto skupiny látek se řadí rutin, kvercetin, nebo kyselina kumarová. Převážná většina těchto látek se do piva dostává ze sladu a chmele. Rozšrotováním sladu a povařením sladiny s chmelem se do piva se tyto látky vylouhují. Chmel obsahuje kromě polyfenolů i hořké kyseliny a chmelové silice, které se rovněž vylouhují během vaření a dodávají tak pivu jeho hořkou chuť. Flavonoidy jsou přírodními antioxidanty, které vychytávají volné radikály v těle člověka a tím napomáhají k snížení rizik různých onemocnění.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Historie piva

Za kolébku piva se považuje oblast Mezzopotámie, kde již kolem 3000-2800 př. n. l. Asyřané a Babyloňané pěstovali obilí. K tehdejší výrobě piva a kvašených nápojů se využíval rozlámaný chléb, který se zalil vodou a nechal zkvasit. Pivo a chléb tvořily základ stravy i ve starobylém Egyptě. V období XIX. a XX. dynastie bylo pivo nejrozšířenějším nápojem mezi všemi obyvateli Egypta. Také Indiáni ze Severní a Jižní Ameriky vyráběli pivo. To však bylo z kukuřice a třtinového cukru.

První zpráva o výrobě piva na našem území pochází z roku 993. Uvádí se, že pivo vyráběli benediktíni v Břevnovském klášteře. První historicky dochovaný doklad o výrobě piva je listina krále Vratislava II. První popis celkového postupu výroby piva pochází z roku 1585 od Tadeáše Hájka z Hájku, jež byl osobním lékařem císaře Rudolfa II. Původně náležela výroba piva ženám, dokud se však nestal chmel a slad cenným zbožím a obchodníci s ním začali široce obchodovat. Téměř až do 18. století převažovala výroba svrchně kvašených piv z pšeničného sladu. Teprve po roce 1750 se začal používat slad ječný.

Nejstarším pivovarem založeným roku 1341 byl pivovar v Domažlicích, který provozoval svou činnost až do roku 1996. Na počátku 19. století bylo v Čechách 1087 pivovarů. Počátkem 20. století jich mnoho ubylo a zůstalo jich pouze 804, zato ale měly větší výstav.

Historickým mezníkem bylo pro rozvoj pivovarství u nás i ve světě založení Měšťanského pivovaru v Plzni roku 1842, kde začali vyrábět spodně kvašená piva.

Od druhé poloviny 19. století se na rozvoji průmyslové výroby významně podílel vývoj domácího strojírenství, které se zaměřovalo na sladařská a pivovarská zařízení.

Během první světové války byl zastaven provoz několika sladoven a došlo k obrovskému úbytku surovin. Během války bylo zavřeno kolem 122 pivovarů. Po první světové válce byl provoz sladoven obnoven a docházelo k postupnému obnovování pivovarů a k jejich modernizaci.

Za druhé světové války ztratily Čechy zabráním Sudet 121 pivovarů a více než polovinu rozlohy chmelnic. Projevoval se také nedostatek energie pro výrobu piva. Piva se vyráběla pouze pomocí náhražek a nedosahovala potřebných kvalit. Obsah alkoholu v pivu byl tehdy pouze okolo 2%. I přes všechny komplikace se díky pivovarům Prazdroj a Budvar podařilo udržet dobré jméno českého pivovarství, jelikož se tyto pivovary značně zaměřovaly na export piva o vyrovnané kvalitě.

Po druhé světové válce se sladovny začaly opět modernizovat, aby mohly produkovat slad dle požadovaných kritérií nejen pro výrobu tuzemských piv, ale také pro export. Po válce výroba piva stagnovala a navyšování výroby začalo až po roce 1950. Výroba piva však pokračovala pouze v pivovarech, které nebyly během druhé světové války zavřeny. Také docházelo ke znárodnění mnoha podniků pivovarů a sladoven. Teprve až od roku 1989 začala postupná privatizace sladoven a pivovarů a vznikaly také nové rodinné a restaurační pivovary.

Další etapou nové modernizace pivovarů bylo období v letech 1990-1995, kdy se začaly k výrobě používat cylindrokónické tanky a tím došlo ke zlepšení procesu výroby a zlepšení kvality piva [1].

## 2.2 Rozdělení piva

Pivo se dělí do různých skupin podle jednotlivých kritérií. Může se dělit podle obsahu alkoholu, barvy, extraktu původní mladiny a podle způsobu kvašení. Podle kvašení se piva dělí na svrchně a spodně kvašená piva. Piva podle barvy jsou světlá, polotmavá anebo tmavá. Barva závisí na druhu použitého sladu. Další rozdělení typů piv uvádí tabulka 1 a tabulka 2 [2] [3].

*Tabulka 1: Dělení piv dle koncentrace mladiny [2]*

Druh piva	Extrakt původní mladiny
Stolní pivo	Do 6% hm.
Výčepní pivo	7-10% hm.
Ležák	11-12% hm.
Pivo speciální	13% hm. ≤ více
Porter	18% hm. ≤ více

*Tabulka 2: Dělení piv podle obsahu alkoholu [2]*

Druh piva	Obsah alkoholu
Nealkoholické	max 0,5%
Výčepní 10°	4%
Ležáky	4,8-5%
Speciály 13°	5,6-6%

## 2.3 Suroviny pro výrobu piva

### 2.3.1 Voda

Voda je nedílnou součástí při výrobě piva. Jelikož je spotřeba vody pro výrobu obrovská, stavěly se pivovary vždy v blízkosti dobrého zdroje vody především u rybníků, potoků, břehů řek nebo dobré studny. Spotřeba vody na výrobu jednoho litru piva se pohybuje v rozmezí od 7 do 12 litrů. Při výrobě piva se používají dva druhy vod, varní voda a užitková.

Varní voda se používá přímo pro výrobu piva a užitková pro mytí a čištění provozu v pivovarech. Varní voda musí zcela splňovat požadavky pitné vody. Nejdůležitějším kritériem je tvrdost vody. Ta se dělí na stálou, která obsahuje hořečnaté a vápenaté soli a přechodnou, která je tvořena hydrogenuhličitanem, jež se varem rozkládají. Pro výrobu světlých piv se používá měkká voda s přechodnou tvrdostí [4].

### 2.3.2 Chmel

Chmel je planě rostoucí rostlina rostoucí ve vlhkých křovinách a pro jeho růst mu vyhovují vlhké a mírně kyselé půdy. Chmel je dvoudomá rostlina a k vaření piva se pěstují pouze vyšlechtěné odrůdy samičích rostlin, ze kterých se sklízí chmelové šišťice. Sklizený chmel obsahuje 72-82% vody a suší se při teplotě nejvýše 50 °C. Konečná vlhkost by neměla přesáhnout 8%. Přijetím vzdušné vlhkosti při skladování se navýší obsah vody asi na 11%. Poté se chmel třídí a lisuje.

Nejznámějšími chmelařskými oblastmi jsou Žatecká, Úštěcká a Tršická. Roku 2007 získal žatecký chmel chráněné zeměpisné označení. Žatecký chmel má několik odrůd. Mezi nejznámější patří Žatecký poloraný červeňák, který je na obrázku 1, Sládek, Kazbek, Bor, Bohemie, Premiant a Rubín. Léčivé účinky chmelu jsou známy již odedávna. Chmel působí pozitivně při ledvinových a jaterních onemocněních.

Pro výrobu piva je chmel důležitý zejména díky jeho složení. V chmelu se nachází značné množství polyfenolů, silic a pryskyřic. Pryskyřice obsahují humulony neboli  $\alpha$ -hořké kyseliny a lupulony, beta-hořké kyseliny. Právě chmelové pryskyřice jsou zdrojem hořkých látek v pivu, které mu dodávají typickou hořkou chuť [5, 6].



Obrázek 1: Žatecký poloraný červeňák [5]

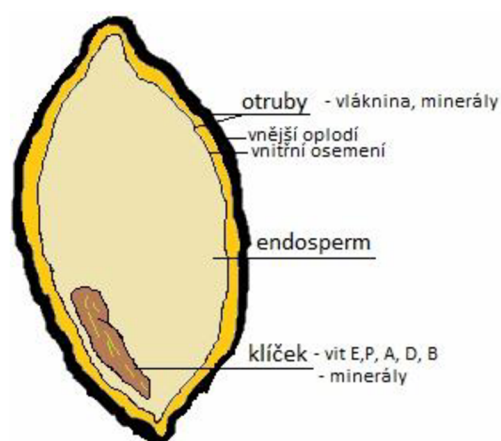
### 2.3.3 Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky patří do rodu *Saccharomyces*. Tento rod se využívá hojně ve vinařství, pekařství a pivovarnictví, neboť má schopnost zkvasit sacharidy. Kvasinky mají kulovitý, elipsoidní nebo cylindrický tvar. Rozmnožují se pučením a tvoří pseudomycelium. Rod *Saccharomyces* objevil roku 1838 Meyen a detailněji je popsal Rees v roce 1870.

Pro pivovarnictví se používají dva druhy *S. cerevisiae* subsp. *cerevisiae* a *S. cerevisiae* subsp. *uvarum*. Druh *Saccharomyces cerevisiae* tvoří elipsoidní a kulovité buňky o délce 3,7 až 9,7  $\mu\text{m}$  a šířce 2,6 až 6,4  $\mu\text{m}$ . Vytváří bohatě větvené pseudomycelium. *Saccharomyces uvarum* tvoří elipsoidní, kulovité a někdy i protáhlé buňky. Kmeny buněk vytváří stromečkovité pseudomycelium. Jejich rozměry jsou téměř shodné jako u druhu *S. cerevisiae* [7].

### 2.3.4 Slad

K výrobě sladu se používá ječmen. Ječmen patří mezi naše nejstarší pěstované plodiny a své využití si získal především díky velkému obsahu vitamínů a minerálních látek jako jsou např. draslík, vápník a fosfor. K výrobě piva se používají především odrůdy ječmene jarního a ječmene setého. Z ječmene se využívá při výrobě sladu obilka. Ta se skládá z obalové části, zárodku nebo též klíčku či embrya a endospermu, který představuje největší část obilky, viz obrázek 2. Proces výroby sladu začíná čištěním a tříděním ječmene. Ječmen se nejprve zbaví prachu a ostatních nečistot a poté se třídí podle jakostních znaků jako je velikost, klíčivost a obsah vody. Pokud nejde ječmen ihned k dalšímu zpracování, uskladní se v silech při 20 °C s 15% vzdušnou vlhkostí. Po roztřizení následuje máčení a klíčení ječmene [8].



Obrázek 2: Řez obilkou [42]

#### 2.3.4.1 Máčení ječmene

Máčení ječmene je nezbytný krok pro enzymové pochody zajišťující klíčení. Cílem je zvýšení obsahu vody v zrna z 12 až 15% na 42 až 48%. Při máčení je důležitá přítomnost kyslíku pro aerobní dýchání zrna. Máčení probíhá v náduvnících s provzdušňováním a odsáváním CO<sub>2</sub>. A trvá přibližně dva dny.

#### 2.3.4.2 Klíčení ječmene

Klíčení ječmene probíhá na tzv. humnech. Jedná se o prostorné místnosti s hladkou podlahou a dobře zajištěným systémem větrání. Ječmen klíčí na hromadách asi v 15 cm vrstvě při teplotě 14 °C po dobu pěti až sedmi dní. Hromada vykazuje během klíčení jednotlivá stadia nazývaná mokrá hromada, suchá hromada, pukavka, mladík a vyrovnaná hromada. Během klíčení se ječmen převrací, aby došlo k jeho vydýchání. Účelem klíčení je tvorba enzymů a dosažení požadovaného stupně naklíčení, neboli rozluštění zrna. Dochází k porušení buněčné stěny, odbourání škrobu a bílkoviny se štěpí na jednodušší látky. V zárodečné části zrna se přitom vyvíjejí zárodky kořínků a listů. Při klíčení využívá zrno zejména zásobních látek z endospermu [8].



### **2.3.4.3 Hvozďení (sušení) ječmene**

Cílem hvozďení je snížení obsahu vody v ječmeni pod 14%. Během tohoto procesu dochází k zastavení vegetačních pochodů a zachování požadované enzymové aktivity. Zároveň se také vytváří nové chuťové, barevné a oxidačně redukční látky. Hvozďení má 2 fáze. Nejprve dochází k šetrnému sušení v nadbytku vzduchu při teplotách 20-60 °C. V další fázi nastává dosušení slabým proudem vzduchu u světlého sladu při teplotách 60 – 80 °C a u tmavého sladu 60 – 105 °C. Celý proces trvá dva dny.

### **2.3.4.4 Odkličování sladu**

Pomocí ventilátoru se od sladového zrna oddělí sladový květ, který obsahuje kořínky a klíčky. Sladový květ se dále používá jako krmivo v zemědělství, protože je velmi bohatý na proteiny. Hotový slad se nechává ještě 6 týdnů odležet v chlazených silech a poté je expedován [8].

## **2.4 Výroba piva**

### **2.4.1 Příprava mladiny**

#### **2.4.1.1 Šrotování**

Základem výroby piva je rozemletí sladu. Tento krok je důležitý z hlediska vymletí endospermu sladového zrna na jemné částice. Při šrotování nesmí dojít k porušení obalových pluch. Zachování celistvosti pluchu je důležité pro vytvoření filtrační přepážky při scezování a vyslazování mláta. Rozemleté pluchy zhoršují barvu sladiny, senzoričnou stabilitu piva i celkový chuťový profil.

Části sladového zrna nejsou zcela stejnosměrně rozluštěné. Při šrotování se nejvíce luští endosperm a nejméně pak špičky zrn. Z jemnějších částí zrna se pak působením sladových enzymů uvolňuje hlavní podíl extraktu sladiny. Špatné rozluštění sladu může mít za následek nejen nižší výtěžek extraktu ale také problémy při scezování sladiny [9].

#### **2.4.1.2 Vystírání**

Základním principem vystírání je dobré smíchání sladového šrotu s nálevem varní vody. V tomto procesu jde o postupné smíchání rozemletého sladu a nálevem vody. Tento proces je rozdělen do několika kroků. Nejprve se smíchá šrot s vodou o teplotě pod 20 °C, poté se přidává druhý podíl nálevu tentokrát již s horkou vodou a provede se tzv. zapárka. V následném nálevu se přidává voda potřebná pro scezování mláta a pro naředění na požadovanou koncentraci mladiny. Doba vystírání se pohybuje včetně šrotování přibližně 60 minut [9].

#### **2.4.1.3 Rmutování**

Principem rmutování je převedení optimálního podílu extraktu surovin do roztoku. V této fázi hrají významnou roli enzymy. Těmi nejdůležitějšími jsou oxidačně-redukční, kyselinotvorné, amylolytické a proteolytické enzymy. Jedním z důležitých enzymatických dějů je převedení nezkvasitelných cukrů na zkvasitelné. Dochází tak k rozštěpení škrobu až na maltosu a glukosu. Působením proteolytických enzymů dochází ke štěpení dusíkatých látek [9].

Postup rmutování se dělí na dva kroky. Dekokčním postupem dochází k postupnému vyhřívání jednotlivých podílů rmutu (jedno až třířmutové postupy) na dané teploty a povaření těchto podílů. V infuzním postupu se dlouhodobým působením sladových enzymů rozpouští a štěpí extrakt sladu. Postupně dochází k zahřívání na určité teploty, které se mohou mírně lišit v závislosti na druhu vařeného piva. Celková doba třířmutového postupu se pohybuje v rozmezí 3,5-5,5 hodiny v závislosti na typu piva (světlé, tmavé).

Třířmutový způsob se skládá ze tří kroků. Prvním krokem je zahřátí na teplotu 52 °C, při které dochází ke štěpení bílkovin. Ve druhém kroku se rmut zahřeje na 63 °C a při této teplotě dochází ke ztekucování škrobu působením  $\beta$ -amylasy. V posledním kroku se rmut zahřeje na 72 °C a dojde k rozštěpení škrobu  $\alpha$ -amylasou [9].

#### **2.4.1.4 Scezování sladiny a vyslazování mláta**

Scezování je fyzikálně-chemický proces filtrace, kdy se v co nejkratší době oddělí sladina od mláta. Tento proces probíhá ve dvou krocích. Nejprve se oddělí tzv. předek, který obsahuje extraktivní látky sladu. Poté následuje vyslazování. Vyslazování spočívá ve vylouhování extraktů z mláta horkou vodou. Scezování ovlivňuje složení a kvalita sladového šrotu. Scezovací nádoby, ve kterých scezování probíhá, jsou vyrobeny z korozivzdorné oceli, mědi, nebo z ocelového plechu. Celková doba scezování a vyslazování trvá 3-3,5 hodiny.

#### **2.4.1.5 Sladové mláto**

Mláto oddělené od sladiny se hojně využívá v zemědělství jako přídavek do krmných směsí pro dobytek, nebo se mláto vysuší a použije se do speciálních pekařských výrobků [9].

#### **2.4.1.6 Chmelovar**

Povařením sladiny s konkrétním druhem chmele vzniká mladina tzv. mladé pivo. Chmelovar probíhá v tradičních varnách a teplota se udržuje na 100 °C. Při chmelovaru dochází k několika fyzikálním, chemickým a biochemickým reakcím. Dochází ke změně acidity, tvoří se produkty Maillardových reakcí melanoidiny, mění se barva mladiny a dochází k rozpuštění a izomeraci hořkých látek.

Dávka přidávaného chmele se stanovuje podle obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin jednotlivých produktů. Pro výrobu piva se používají různé druhy chmele. Může se použít jak lisovaný tak granulovaný chmel. Chmelení probíhá v jedné až třech dávkách v závislosti na typu piva více v tabulce 3. Pro méně hořké piva se užívá jedno dávkování a pro piva s vyšší hořkostí se běžně užívá dávkování ve dvou až třech krocích.

Po skončení varu dochází k ochlazení mladiny, při kterém se vylučují hrubé a jemné kaly, které se následně oddělí. Zároveň také dochází k odparu a tím ke zvýšení extraktu mladiny. Ochlazení se provádí až na zákvasnou teplotu 10-15 °C [9].

**Tabulka 3: Dávkování chmele [9]**

Dávkování	1. dávka	2. dávka	3. dávka
<b>1. krok</b>	10-15 min po zavaření	-	-
<b>2. krok</b>	70-80% chmele 10 min po zavaření	20-30% chmele 30 min před koncem varu	-
<b>3. krok</b>	50% chmele na začátku	35% chmele hodinu před koncem varu	15% chmele 10-15 minut před koncem varu

### 2.4.2 Hlavní kvašení

Cílem hlavního kvašení je tvorba etanolu, oxidu uhličitého a dalších látek, které vznikají částečným zkvašením cukernatých složek mladiny pomocí pivovarských kvasinek. Při hlavním kvašení dochází také k vývinu tepla, které produkují kvasničné buňky tvorbou buněčných struktur. Kvasničné buňky získávají energii pro tento proces z organických živin.

Průběh hlavního kvašení ovlivňuje několik faktorů. Jedním z nich je složení mladiny. Mladina musí obsahovat dostatek cukrů (asi 90%), dusíkaté látky, které jsou absorbovatelné kvasinkami, minerální látky a vitaminy. Dalším faktorem je obsah kyslíku, který se do piva dostává provzdušněním ochlazené mladiny během zakvašování. Obsah kyslíku v mladině se pohybuje v rozmezí 5 až 7 mg l<sup>-1</sup>. Tento správný obsah je důležitý vzhledem k organoleptickým vlastnostem piva. Zvýšený obsah kyslíku potlačuje tvorbu esterů a napomáhá k tvorbě vyšších alkoholů.

Pro zakvašování se používají kvasné kádě zvané spilky. Ty se dříve vyráběly z dubového dřeva, ale dnes se používají materiály jako beton a korozivzdorná ocel. Zakvašování se v dnešní době provádí automatickým zařízením pro provzdušňování a zakvašování mladiny. V minulosti se používal způsob přeléváním kvasnic s mladinou ze džberu do džberu a poté přes husté síto do kvasné kádě. Zakvašování probíhá při teplotě 4,5 - 6 °C.

Existují dva typy kvašení spodní a svrchní. Rozdíly mezi nimi jsou dány použitím kvasinek a teplotou kvašení. U spodního kvašení se používá teplota 9 - 12 °C a trvá 7 až 12 dní. V tomto způsobu kvašení se užívají pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, které sedají ke dnu. Svrchní kvašení trvá 2 - 8 dní při teplotě od 15 do 22 °C. Při svrchním kvašení se používají kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, které se vyplavují do deky.

Kvašení má tři stádia. Prvním je zaprašování, při kterém vzniká oxid uhličitý, díky kterému vzniká během 12 až 24 hodin pěna na hladině kvasné kádě.

Druhým stádiem je tvorba nízkých až vysokých bílých kroužků. Tato fáze probíhá v 24. až 40. hodině hlavního kvašení. Na povrchu mladiny se tvoří bílé růžice pěny a pH piva klesá na 4,7 - 4,9.

V období třetího až pátého dne kvašení nastává třetí fáze, kdy se tvoří vysoké hnědé kroužky. V mladině se tvoří kaly, které jsou vynášeny z kvasícího média a způsobují hnědé zbarvení pěny.

V poslední fázi nastává propadání deky. Deky je asi 3 centimetrová vrstva hnědé pěny, která zůstává na hladině po propadnutí kroužků na dno. Tato deka se musí včas sbírat děrovanou lžicí, protože obsahuje mrtvé kvasinkové buňky, polyfenoly a vyšemolekulární dusíkaté látky. Po sběru je deka přidávána do odpadního mláta [9].

### **2.4.3 Dokvašování**

Dokvašování probíhá v cylindrokónických tancích u běžných výčepních piv, nebo pak v ležáckých tancích u piva ležáckého typu. Ležácké tanky jsou z oceli a uvnitř jsou smaltované nebo potažené jiným ochranným nátěrem. Plnění tanků se provádí nejčastěji nadvakrát, neboť se tím dosáhne rovnoměrnějšího dokvašování a vyrovnání jakosti. Cílem dokvašování je pomalé zkvašení sacharidů při nízkých teplotách. Při tomto procesu se pivo vyčeří, dosáhne organoleptické zralosti a nasytí se přirozeně vzniklým oxidem uhličitým. Během procesu se dotváří jednotlivé vlastnosti piva jako je chuť, vůně, pitelnost, říz a pěnivost. Zrání piva trvá tři týdny až tři měsíce podle typu piva.

Někteří výrobci piva podporují tzv. jednofázový systém kvašení, ve kterém dochází k hlavnímu kvašení i dokvašování piva v jedné nádobě. Pro tyto účely se používají výhradně cylindrokónické tanky [10].

### **2.4.4 Filtrace**

Cílem filtrace dokvašeného piva je odstranění kalických látek a zvýšení koloidní trvanlivosti piva. Při filtraci nesmí dojít ke zvýšení hladiny kyslíku a musí se zabránit snížení pěnivosti piva. Principem filtrace je protékání kapaliny porézní přepážkou, na níž se tvoří filtrační koláč a zachycují se tuhé částice. V minulosti se jako filtrační materiál často používala pivovarská hmota, což je vláknitý materiál připravený z vyčištěných bavlněných odpadů. Dnes se nejvíce používá křemelina a membránová filtrace. Křemelina je práškový filtrační materiál, který pochází ze schránek mořských a sladkovodních rozsivek. Křemelina obsahuje různé nečistoty, a proto se čistí kalcinací za vysokých teplot, nebo extrakcí minerálními kyselinami. V dnešní době se však objevují názory a studie o negativním vlivu použití křemeliny na senzoryckou stabilitu piva.

Pro sterilační filtrace se dnes hojně využívá membránová filtrace. Membrány jsou malé tloušťky a mají vysokou pórovitost pro snadné odseparování fází. V tomto procesu se uplatňuje mimo fyzikálně-chemické interakce také difuze, adsorpce a iontové rovnováhy. Membrány jsou vyráběny v různých tvarech, jako jsou vinuté nebo rovné trubičky, tenká vlákna a ploché desky. Od křemelinové filtrace se membránová liší také ve způsobu odstranění usazeného materiálu. Při membránové filtraci se zachycený materiál odstraňuje mechanickým stíráním, podélným proudem kapaliny, nebo zpětným proplachováním, kdežto u křemelinové filtrace se vymění dávkování filtračního materiálu [9].

### **2.4.5 Pasterace**

Principem pasterace je zajištění vysoké stability piva. Při pasteraci dochází k tepelné inaktivaci mikroorganismů, které mohou narušovat kvalitu piva. Pasterace se provádí dvěma různými způsoby.

### **2.4.5.1 Tunelová pasterace**

Láhve s pivem vstupují do tunelového pasteru a tam se ohřívá obal a od něj i pivo. Teplota v pivu však není rovnoměrná. Láhve prochází během procesu sprchovými zónami o různé teplotě vody a lahve se pohybují na posuvných roštích, nebo nekončících pásech. Při pasteraci je nutný pozvolný ohřev lahví, protože se musí brát ohled na odolnost skla vůči změnám teploty. Teplota v pasteru vzrůstá asi  $3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Pasterační teplota se pohybuje okolo  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  a při této teplotě setrvá láhev s pivem asi 20 minut. Celková doba pasterace je 0,8 až 1 hodinu [9].

### **2.4.5.2 Průtoková pasterace**

Průtoková pasterace probíhá v deskovém výměníku a sestává ze tří kroků. V prvním kroku vstoupí pivo do tzv. regenerační sekce, kde se předeřeje horkým pivem. V ohřívací sekci se pak na dobu 30 až 40 sekund zahřívá při teplotě  $68 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posledním krokem nastává ochlazení piva.

Průtoková pasterace má na rozdíl od tunelové několik výhod jako např. nižší nároky na prostor a spotřebu energie a nedochází k narušení organoleptických vlastností piva. Aby byla průtoková pasterace opravdu účinná, musí se dodržovat dokonalá sterilita potrubí, transportní nádoby a stáčecího aparátu [9].

## **2.5 Proces stárnutí piva**

Dosáhnutí vysoké trvanlivosti piva je v dnešní době značným problémem pivovarnictví. Vysokou trvanlivostí se zamýšlí zachování čirosti ale také zachování dalších senzoričkových vlastností jako je vůně, chuť a pěnivost piva. Vlivem stárnutí pivo tyto senzoričkové vlastnosti ztrácí a nabývá tzv. staré chuti. Tyto změny se mohou projevit ve velmi krátkém čase, nebo až za několik měsíců.

V současnosti se na určení změn v pivu během stárnutí využívají jednak chromatografické metody, headspace analýza s tzv. elektronickým nosem. Někteří výrobci piva však dávají přednost školeným degustátorům, kteří jsou schopni posoudit senzoričkové vlastnosti piva. Faktory změn, ke kterým dochází během stárnutí piva, závisí především na typu piva, koncentraci kyslíku a teploty skladování. Faktory stárnutí se dělí na vnitřní faktory jako je složení piva a vnější faktory, čímž jsou podmínky skladování a transportu [11].

### 2.5.1 Reakční mechanismus stárnutí piva

Velký vliv na senzorycké vlastnosti mají karbonylové sloučeniny a jejich prekurzory. Je to složitý komplexní proces zahrnující několik různých mechanismů. Reakce vedoucí k látkám, které narušují stabilitu piva, se mohou dělit do následujících skupin:

- Radikálové reakce – reakční formy kyslíku a dusíku
- Maillardova reakce
- Oxidace nenasycených mastných kyselin
- Oxidace vyšších alkoholů
- Streckerova degradace aminokyselin
- Aldolová kondenzace

#### 2.5.1.1 Radikálové reakce – reakční formy kyslíku a dusíku

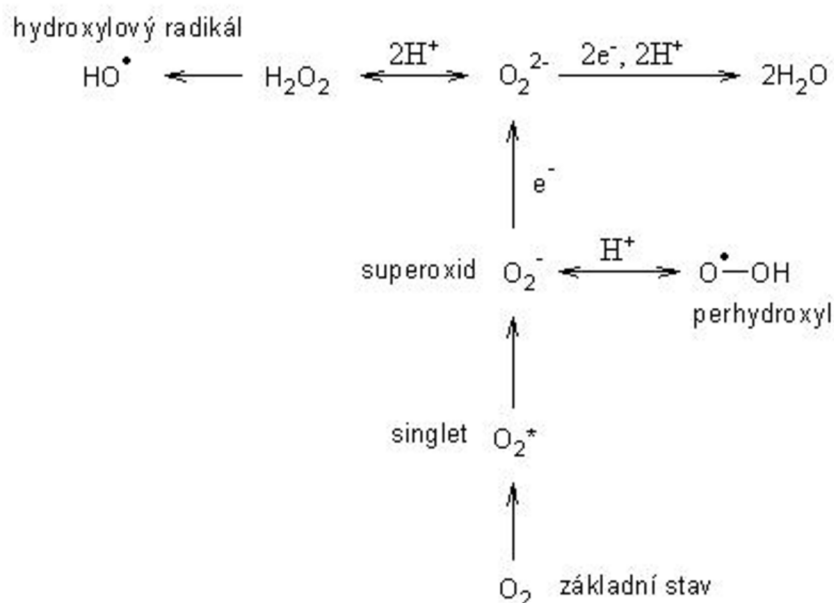
Přesto, že je dnešní výroba piva navržena a uzpůsobena tak, aby bylo zabráněno kontaktu surovin i hotového piva s kyslíkem, může i z nepatrného množství kyslíku vzniknout velké množství reakčních forem, jak je vidět na obrázku 3, které se označují zkratkou ROS (Reactive Oxygen Species).

Superoxidový aniont může přijímat proton za vzniku perhydroxylového radikálu ( $\text{OOH}\cdot$ ), který je mnohem reaktivnější.

Jedny z nejreaktivnějších jsou však radikály hydroxylové, které také často neselektivně reagují s etanolem. Etanol je výborným lapačem volných radikálů. 1-hydroxyetylový radikál je jedním z nejčastějších radikálů v pivě a konečným produktem této radikálové reakce je acetaldehyd.

Reaktivita jednotlivých forem kyslíku vzrůstá ve směru superoxidový aniont < perhydroxylový radikál < hydroxylový radikál.

Významný je dusnatý radikál, který reaguje např. s ionty železa, molekulárním kyslíkem nebo superoxidovým aniontem. Při reakci s tímto aniontem vzniká peroxonitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), který je velmi silným oxidačním činidlem [11].



**Obrázek 3:** Reakční formy kyslíku [11]

### 2.5.1.2 Maillardova reakce

Neenzymatické reakce hnědnutí probíhají v mnoha zpracovávaných potravinářských produktech. V procesu vaření piva probíhají Maillardovy reakce především během přípravy mladiny a to díky zvýšené teplotě. Některé druhy těchto reakcí však mohou probíhat také za nízkých teplot zejména během skladování. Po skončení rmutování obsahuje mladina velké množství sacharidů a to zejména 60-70% maltozy, 10% glukózy a 20-30% maltotriozy. Díky vysokým koncentracím těchto sacharidů může za přítomnosti různých aminosloučenin docházet velmi rychle k Maillardovým reakcím během chmelovaru. Jedny ze vzniklých Maillardových monomerů jsou 5-hydroxymetylfurfural, který vzniká z hexózy a furfural, který vzniká z pentózy. Dalšími reakcemi monomerů jako jsou izomerie, dehydratace a kondenzace vznikají melanoidiny [11].

### 2.5.1.3 Oxidace nenasycených mastných kyselin

Neenzymatickou oxidací vznikají podobné hydroperoxydy lépe řečeno peroxyradikály jako v případě enzymatické oxidace. Reakce je autokatalytická, protože oxidační produkty samy katalyzují a urychlují reakce. V reakci volný radikál kyslíku přijímá elektrony a nakonec vzniká hydroxylový radikál, který spouští nebezpečnou řetězovou reakci volných radikálů vedoucí k úplné destrukci mastných kyselin [11].

### 2.5.1.4 Oxidace vyšších alkoholů

Vyšší alkoholy vznikají během kvašení piva, především přeměnou aminokyselin za vzniku aldehydů. Tyto aldehydy se dále redukují na alkoholy, které se však během stárnutí piva mohou oxidovat na aldehydy, které jsou indikátory stárnutí. Prchavé aldehydy vznikají také během skladování piva [11].

## 2.6 České pivo

České pivo si už v době válek díky své kvalitě udrželo dobré jméno. Pro další udržení dobrého jména vznikla ochranná nařízení. Chráněné zeměpisné označení (CHZO) „České pivo“ bylo zapsáno Nařízením Rady (ES) pod číslem 1014/2008 dne 16. 10. 2008 v Rejstříku chráněných označení původu a chráněných zeměpisných označení. Všechna piva, která nesou CHZO České pivo, musí mít na své etiketě uvedenou ochrannou známku, viz obrázek 4.

Piva, která spadají pod toto ochranné označení, musí splňovat nařízená kritéria týkající se použitých surovin a způsobu výroby, aby dosahovala stanovené kvality, viz tabulka 4 [12].



Obrázek 4: Ochranné známky [13]

Tabulka 4: Kvalitativní ukazatele „Českého piva“ [12]

Ukazatel	Světlý ležák	Tmavý ležák	Světlé výčepní	Tmavé výčepní
Extrakt pův. mladiny [% hm.]	11,0-12,9	11,0-12,9	8,0-10,9	8,0-10,9
Alkohol [% obj.]	3,8-6,0	3,6-5,7	2,8-5,0	2,6-4,8
Barva j. EBC	8-16	50-120	7-16	50-120
Hořkost j. EBC	20-45	20-45	16-28	16-28
Kyselost [pH]	4,1-4,8	4,1-4,8	4,1-4,8	4,1-4,8



### 2.6.1 Kritéria pro CHZO „České pivo“

- 50% použitého sladu musí pocházet z ječmene jarního dvouřadého schváleného SZPI (Státní zemědělská a potravinářská inspekce) v Brně a s doporučením VÚPS (Výzkumný ústav pivovarský a sladařský)
- Pro výrobu se používá zejména slad světlý Plzeňský
- Extrakt v sušině sladu musí být minimálně 80% hmotnosti
- Český hlávkový chmel pěstovaný v oblastech Žatecka, Ústěcka a Tršicka a to zejména odrůdy Žatecký poloraný červěňák, Sládek a Premiant.
- Podíl chmele: ležáky min 30%, ostatní piva min 15%
- Pivovarské kvasinky – kmeny spodního kvašení
- Měkká až středně tvrdá varní voda
- Dekokční jedno- až třímutterový způsob rmutování
- Dvoufázové kvašení – hlavní kvašení a dokvašování probíhají odděleně [12, 14]

### 2.7 Pivo a zdraví

Rozumná konzumace piva přináší mnoho blahodárných účinků pro lidský organismus. Napomáhá snižování hladiny LDL cholesterolu, působí preventivně proti rozvoji aterosklerózy a kardiovaskulárním chorobám. Pití piva také omezuje shlukování krevních destiček.

Pivo obsahuje velkou řadu významných nutričních látek, jako jsou bílkoviny a sacharidy, které představují hlavní zdroj energie piva. Dále také obsahuje spoustu minerálů a stopových prvků, rozpustnou vlákninu, vitaminy a řadu polyfenolických sloučenin, které mají příznivé antioxidační účinky.

Významnou skupinou jsou vitaminy skupiny B uvedené v tabulce 5. Tyto vitaminy jsou rozpustné ve vodě a v pivu jsou obsaženy ve značné koncentraci. Během skladování piva nepodléhají žádným významným degradacím a mimo to jsou důležité pro tvorbu červených krvinek a správnou činnost nervového systému. Většina obsahu vitaminů B se do piva dostane prostřednictvím sladu a částečně z kvasinek během fermentace.

Ze sladu se do piva dostává také mnoho minerálů a stopových prvků. Velký význam v pivu má křemík, neboť ten působí proti ateroskleróze a má vliv na zdravé kosti. V pivu se nachází ve formě kyseliny křemičité. Oproti obsahu křemíku v pitné vodě je v pivu křemíku až pětkrát více. Dalšími významnými prvky v pivu jsou draslík, hořčík a vápník. Zdrojem minerálů a stopových prvků v pivu je také voda, používaná při výrobě piva [15].

**Tabulka 5: Průměrný obsah vitamínu B v 0,5 l českého ležáku [15]**

Vitamin	µg/0,5 l	% DDD <sup>1)</sup>
Thiamin (B1)	35 <sup>2)</sup>	2,4
Riboflavin (B2)	125 <sup>2)</sup>	7,4
Niacin (B3)	2500	12,5
Kys. panthotenová (B5)	600	6
Pyridoxin (B6)	250 <sup>2)</sup>	12,5
Kyselina folová (B9)	100	25
Kobalamin (B12)	1	16

<sup>1)</sup> Procento obsahu doporučené denní dávky

<sup>2)</sup> Výsledky z VÚPS, a.s.

## 2.8 Látky v pivu

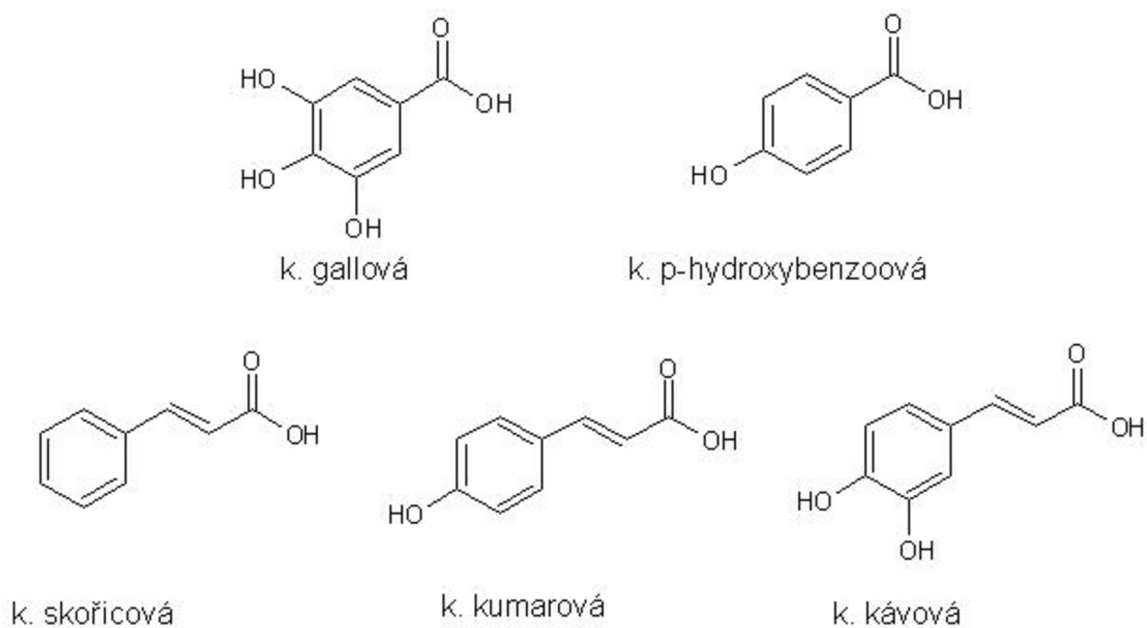
### 2.8.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou látky obsahující minimálně jedno aromatické jádro a jednu až několik hydroxylových skupin. Nachází se v rostlinné stravě zejména v ovoci, čaji, víně a kakau. Polyfenoly se dělí do dvou hlavních skupin na flavonoidy a fenolické kyseliny. Mnohé z nich mají antioxidační účinky. Antioxidační účinky flavonoidů závisí na polohách vazeb aromatického jádra a poloze hydroxylových skupin.

Tyto sloučeniny se dostávají do piva převážně ze sladu a chmele. Fenolové sloučeniny se podílejí na chemické stabilitě a trvanlivosti piva. Jsou účinné zejména proti oxidaci nenasycených mastných kyselin [16, 17].

#### 2.8.1.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou odvozeny od derivátů kyseliny skořicové a benzoové. Mezi deriváty kyseliny benzoové náleží kyseliny salicylová, gallová a *p*-hydroxybenzoová, které jsou zobrazeny na obrázku 5. Kyselina benzoová je nejjednodušší aromatickou kyselinou a v ovoci se vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích. Kyselina skořicová je nenasycená aromatická kyselina a vyskytuje se nejen ve skořici, ale i v dalším koření. Deriváty kyseliny skořicové jsou zejména kyselina *p*-kumarová, kávová a kyselina ferulová.



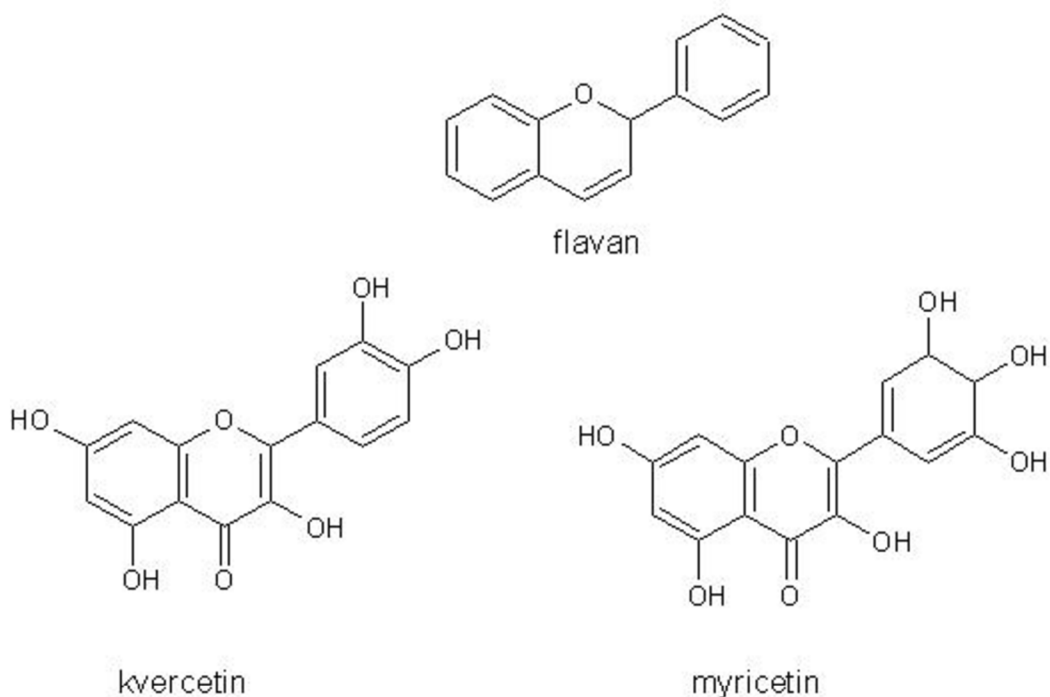
**Obrázek 5:** Organické kyseliny

### 2.8.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy se dělí hlavně na anthokyany, flavany a flavonoly. Jsou rozsáhlou skupinou rostlinných barviv, které jsou odvozeny od flavanu. Některé flavonoidy jsou důležité jako barviva, u jiných se klade význam především na fyziologické účinky, nebo chuť.

Anthokyany jsou nejrozšířenější rostlinná barviva a odvozují se od anthokyanidinů a jsou lokalizovány ve vakuolách buněk. Tyto barviva jsou součástí různých druhů ovoce (třešně, jahody, ostružiny, švestky), zeleniny (lilek, červené zelí, ředkvičky) a vinné révy. Tyto barviva jsou stabilizována pomocí organických kyselin jako např. jablečná nebo citronová.

Mezi zástupce flavonolů patří např. kvercetin a myricetin. Vzorce jsou na obrázku 6, které doprovází anthokyany jako kopigmenty [18, 19].



**Obrázek 6:** Flavonoidy

### 2.8.2 Polyfenoly sladu

Polyfenoly sladu mohou mít na pivo pozitivní i negativní dopad. Příznivý vliv mají neoxidované polyfenoly, které svými antioxidačními vlastnostmi oddalují tvorbu nebiologických zákalů. K jejich dalším schopnostem patří asociace s polypeptidy a vylučovat kaly během chlazení mladiny. Negativní vlastnosti vykazují kondenzované a oxidované formy polyfenolů. Tyto látky zhoršují chuťové vlastnosti piva, zvyšují barvu sladiny, mladiny a vytváří nebiologický zákal ve stočeném pivu. Obsah polyfenolů se v jednotlivých částech zrna sladu liší. Viz tabulka 6 [9].

**Tabulka 6:** Obsah polyfenolů ve frakcích sladového zrna [9]

Vlastnost	Endosperm, mouka	Aleuron, mouka	Pluchy	Slad
Podíl frakce [%]	75,6	15,8	8,6	100,0
Obsah polyfenolů [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	46,0	58,0	30,4	76,2
Obsah flavonoidů [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	14,8	11,8	8,6	23,6
Index polymerace*	3,11	4,92	11,96	3,23

\* Index polymerace je poměr obsahu celkových polyfenolů k obsahu flavonoidů.

### 2.8.3 Polyfenoly chmele

Stejně jako sladové polyfenoly mají tyto látky v pivu své pozitivní i negativní účinky. Polyfenoly chmele mají vysoké redukční účinky a tím chrání chmelové pryskyřice před oxidací. Jsou přirozenými antioxidanty, oddalují stárnutí chuti piva a tvorbu nebiologických zákalů. Během chlazení mladiny a kvašení reagují s dusíkatými látkami. Tím vylučují kaly a napomáhají čiření piva mnohem více než sladové polyfenoly. Mezi zástupce polyfenolů chmele patří kvercetin a myricetin [9].

### 2.8.4 Organické kyseliny

Karboxylové kyseliny se v potravinách vyskytují jako alifatické, aromatické, nebo heterocyklické. Mohou se dělit na nasycené a nenasycené, nebo podle počtu karboxylových skupin na mono, dikarboxylové a trikarboxylové kyseliny. Základním členem je kyselina mravenčí HCOOH. Karboxylové kyseliny vznikají zejména fermentačními pochody, nebo jako meziprodukty citrátového cyklu a biosyntézy mastných kyselin. Mnoho z nich má konzervační účinky a ovlivňují stabilitu a senzorycké vlastnosti potravin. Vyskytují se v různých druzích ovoce a zeleniny. V pivu vznikají fermentačními procesy zejména kyselina octová, malonová, jantarová, šťavelová, glutarová a také adipová [19].

### 2.8.5 Sacharidy

Sacharidy jsou organické látky, které se označují jako polyhydroxyketony a polyhydroxyaldehydy. V molekule obsahují nejméně tři alifaticky vázané uhlíky a ketonovou nebo aldehydovou skupinu [19, 20].

Sacharidy lze rozdělit podle počtu atomů uhlíků v molekule na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy, atd. Sloučeniny, které obsahují ketonovou skupinu, se označují jako ketosy a ty, které obsahují aldehydovou skupinu, se nazývají aldosity [19, 20]. Další dělení vychází z počtu cukerných jednotek a sacharidy se dělí na monosacharidy, které obsahují jen jednu cukernou jednotku a není možné je hydrolyticky štěpit na menší cukry. Spojením monosacharidů acetalovou vazbou vznikají oligosacharidy ( $\leq 10$  jednotek) a polysacharidy [19, 21].

Sacharidy v přírodě vznikají procesem zvaným fotosyntéza. Sluneční světlo poskytuje energii na přeměnu oxidu uhličitého a vody na glukosu a kyslík. V rostlinných pletivech tvoří sacharidy 85-90 % sušiny. V živočišných tkáních bývá obsah sacharidů jen několik procent. V buňkách slouží především jako zdroj energie a řadí se mezi hlavní živiny. Jsou základními stavebními jednotkami buněk a také chrání buňky před působením vnějších vlivů. Další význam mají jako biologicky aktivní látky. Jsou součástí některých koenzymů, hormonů nebo vitamínů [19]. Pro člověka jsou sacharidy důležitým zdrojem energie, avšak ve větších dávkách mohou být příčinou některých zdravotních problémů, mezi které se řadí cukrovka (diabetes), obezita, srdeční choroby (ateroskleróza) nebo onemocnění zubů [22].

Pivo je velmi bohaté na sacharidy a to zejména díky sladovnickému ječmenu, jehož zrno je tvořeno sacharidy asi z 80 %. Buněčná stěna je reprezentována více než 10 % hmotnosti zrna a obsahuje sacharidy jako je celulóza, beta-glukany nebo lignin.

Nejvíce zastoupen je polysacharid škrob. Škrob je hlavní zásobní polysacharid pro klíček zrna v době jeho klíčení. V cytoplasmě rostlinných buněk je uložen v nerozpustných granulích,

jejichž tvar a velikost závisí na rostlinném původu. Ječmenné škroby obsahují dvě základní složky, amylosu a amylopektin.

Amylosa je složkou méně zastoupenou a skládá se z relativně dlouhých řetězců D-glukosových zbytků. V omezené míře dochází k větvení asi na deseti místech molekuly, proto se často tato složka označuje za lineární. Amylopektin je základní složkou většiny škrobů a skládá se z řetězců D-glukosových jednotek vázaných  $\alpha$ -(1-4) vazbami, z nichž se po 10-100 jednotkách odvětvují vazbou  $\alpha$ -(1-6) postranní řetězce.

Nízkomolekulární sacharidy jsou v zrně obsaženy v podstatně menším množství, než je zastoupení škrobu. Zastoupeny jsou především sacharóza a rafinosa a to hlavně v klíčcích. V endospermu mohou být obsaženy maltosa, glukosa a fruktosa [8].

**Tabulka 7:** Obsah sacharidů v obilce ječmene [8]

Sacharid	Obsah [%]
škrob	60 - 65
sacharosa	1 - 2
rafinosa	0,3 – 0,5
maltosa, glukosa, fruktosa	0,1
Beta-glukany	3,3 – 4,9
pentosany	9
celulosa	4 - 7

## 2.9 Metody pro analýzu piva

### 2.9.1 HPLC

HPLC neboli High performance liquid chromatography dále jen HPLC patří mezi separační metody, ve kterých je vzorek vnášen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. V HPLC se používá nepohyblivá stacionární fáze a mobilní fáze, která je pohyblivá. Při separaci vzorku se využívá různé afinity vzorku k jednotlivým fázím a tím dochází k separaci analytu. Pomocí HPLC lze stanovit téměř všechny organické látky [23].

#### 2.9.1.1 Volba chromatografického systému

V HPLC se využívají zejména dva chromatografické systémy. NP-HPLC – systém normálních fází a RP-HPLC – systém reverzních fází. Výběr systému je závislý na polaritě stanovovaného analytu. Je-li logaritmus polarity větší než 1, musí se použít systém RP-HPLC.

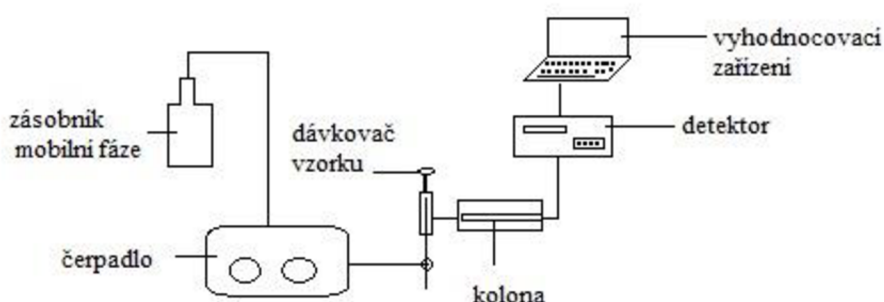
V systému NP-HPLC se využívá polární stacionární fáze. Jedná se o silikagel, na kterém jsou navázané polární funkční skupiny. Mobilní fáze může být též polární, ale musí mít menší polaritu než fáze stacionární. Systém NP-HPLC se využívá zejména pro stanovení látek, které

se snadno hydrolyzují, nebo se v přítomnosti vody rozkládají. V systému RP-HPLC se jako stacionární fáze používají fáze mající navázané dlouhé alkylové řetězce ( $C_{18}$  –  $C_{30}$ )  $C_{18}$  oktacydylsilikagel – ODS se používá nejčastěji. Jako mobilní fáze je možné využít polární rozpouštědla o různých koncentracích, nejčastěji však methanol, acetonitril a tetrahydrofuran [23] [24].

### 2.9.1.2 Instrumentace v HPLC

V HPLC systému je vzorek nastříknut do dávkovacího kohoutu, ze kterého je pak mobilní fází unášen kolonou. Mobilní fáze s analytem je poháněna pomocí vysokotlakého čerpadla. V koloně se nachází stacionární fáze a právě v závislosti na délce kolony a afinitě analytu k jednotlivým fázím dochází k separaci. Analyt je poté zpracován příslušným detektorem, který vyhodnotí daný analyt a převede jej na elektrický signál [25].

Schéma instrumentace je znázorněno na obrázku 7. Separace látek je prováděna pomocí gradientové nebo izokratické eluce. Rozdíl mezi gradientovou a izokratickou elucí spočívá ve složení mobilní fáze. Při izokratické eluci se složení mobilní fáze nemění. Při využití gradientové eluce dochází k postupnému zvyšování koncentrace mobilní fáze během analýzy. Izokratická eluce se uplatňuje zejména při stanovení látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [23].



Obrázek 7: Instrumentace v HPLC [23]

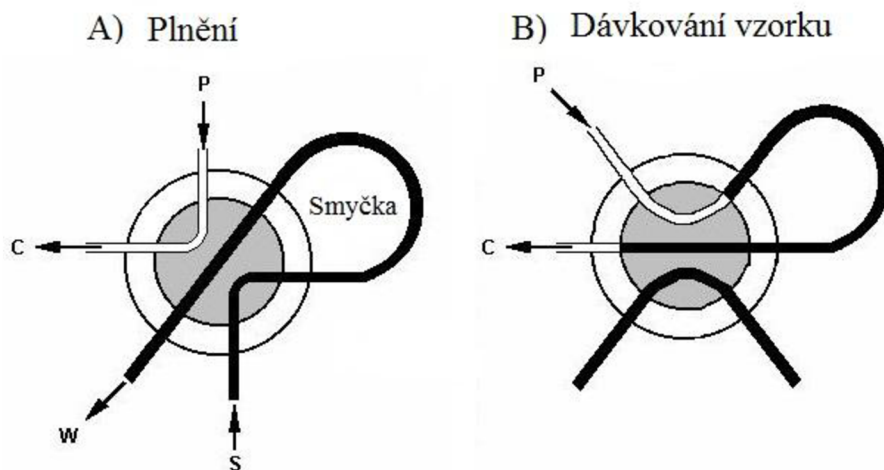
### 2.9.1.3 Čerpadla

Vysokotlaká čerpadla musí být sestavena ze speciálních materiálů, které odolají korozi a dalším vlivům, které způsobuje mobilní fáze. Nejčastěji bývají zhotoveny z nerezové oceli a titanu. Vysokotlaká čerpadla pracují dvojím způsobem. Při konstantním tlaku, nebo za konstantního objemového průtoku.

Na čerpadla jsou kladeny vysoké požadavky a to zejména široké rozmezí výstupních tlaků (1-100 MPa), změny průtoku mobilní fáze (0,1-10 ml/min) a co nejmenší vnitřní objem čerpadel [23].

### 2.9.1.4 Vysokotlaké dávkovací ventily

Používají se vícecestné ventily se smyčkou, která se plní přes septum stříkačkou. Existují dva typy dávkovacího zařízení: manuální smyčkové dávkovače nebo automatické dávkovače tzv. autosamplery. Dávkovací ventily mají různé objemy dávkovacích smyček od 0,2  $\mu\text{l}$  do 2000  $\mu\text{l}$ . Na dávkování je do určité míry závislá i účinnost chromatografického procesu. Nedokonalým dávkováním může docházet k rozmývání píků [26]. Na obrázku 8 je vidět schéma dávkovacího ventilu. Situace A) zobrazuje nástřik vzorku do smyčky při zavřeném ventilu. Situace B) ukazuje otevřený ventil a vzorek proudící do kolony za pomoci čerpadla.



Obrázek 8: Dávkovací ventil, P – čerpadlo, C – kolona, W – odpad, S – vzorek [23]

### 2.9.1.5 Chromatografické kolony

Chromatografické kolony jsou vyrobeny z nerezové oceli o různých délkách. Jejich délka se pohybuje od 10–300 mm a vnitřní průměr kolony je 2,5–5 mm. V koloně je upevněna stacionární fáze, na které se vlivem afinity zachytává daný analyt. Kolony se musí, vzhledem k jejich malým průměrům pravidelně udržovat a řádně čistit po každé analýze, jinak by docházelo ke znehodnocení výsledků analýzy. Po analýze se nechává kolona promývat silným rozpouštědlem. Při systému RP-HPLC se nejčastěji využívá polárního rozpouštědla methanolu [27].

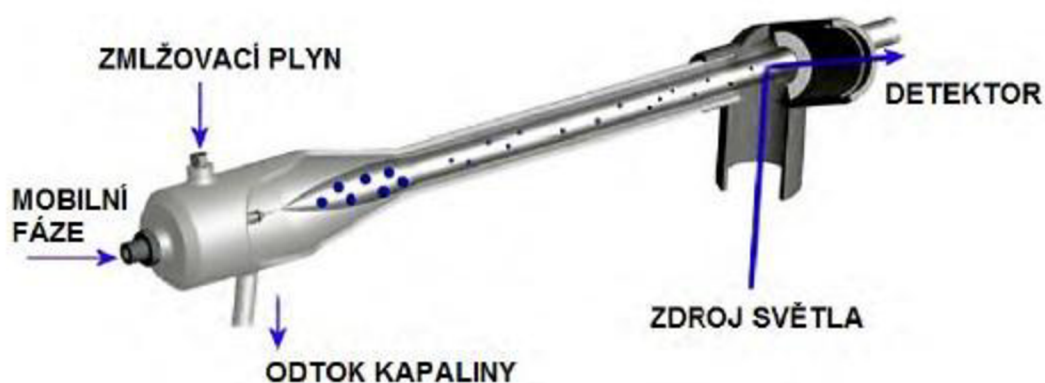
### 2.9.1.6 Detektory

Detektory převádí analyt na elektrický signál, který je vyhodnocen v příslušném počítačovém programu. Detektory by měly splňovat několik podstatných vlastností jako vysokou citlivost, specifitu a linearitu. Nedestruktivnost a signál musí být nezávislý na změně průtoku, nebo změně složení mobilní fáze. V systému RP-HPLC se dnes využívá velké množství detektorů. Do roku 2000 se k detekci využíval zejména UV-VIS detektor. Dnes se však dle podmínek analýzy volí i jiné detekční systémy. Mezi další známé detektory patří refraktometrický detektor (RI), fluorimetrický, vodivostní, ELSD detektor (Evaporative Light Scattering Detector) a v neposlední řadě hmotnostní spektrometr. UV-VIS detektor funguje na principu detekce rozdílu absorbovaného světla analytem přicházejícím do detektoru a množství



absorbovaného světla příslušným rozpouštědlem. Četnost využití detekčních systému v HPLC je uvedena v tabulce 8 [28].

ELSD detektor, který je na obrázku 9 je odpařovací detektor rozptylu světla, umožňuje použití gradientové eluce a má vysokou citlivost. Tento detektor pracuje na bázi měření rozptylu světla. Jeho další schopností je detekce látek neobsahující chromofor ani fluorofor. Analyt je unášen do nebulizéru, kde je zmlžen pomocí inertního plynu. Poté pokračuje do evaporační komůrky, kde se odpaří mobilní fáze a pokračuje do odpadu. Kapičky solutu vstupují do optické komůrky, následně jsou vystaveny proudu světla a dojde k rozptylu. Fotodetektor poté zaznamená odezvu, která je přímo úměrná hmotě solutu [29].



Obrázek 9: Schéma ELSD detektoru [30]

Tabulka 8: Četnost využití (%) detekčních technik v letech 1971-2010 [23]

Detekční technika	1971 - 1980	1981 - 1990	1991 - 2000	2001 – 2010
UV/PDA	41,0	33,5	26,5	22,9
Fluorescenční	16,7	16,4	12,2	6,9
Elektrochemický	7,7	10,3	5,5	2,0
Vodivostní	0,2	0,1	0,1	0,1
Refraktometrický	3,5	1,9	1,0	0,6
MS	10,5	13,5	22,8	30,7

### 2.9.1.7 Vyhodnocení analýzy

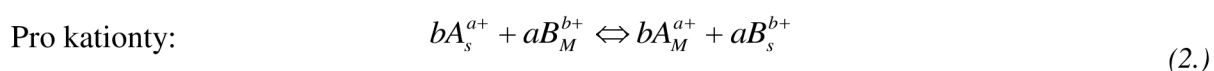
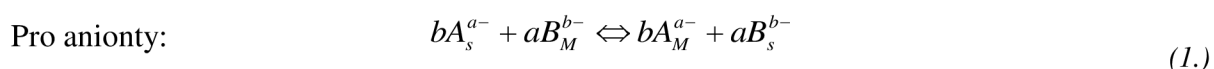
K vyhodnocení analýzy je třeba znát několik retenčních charakteristik (retenční čas, rozlišení, počet teoretických pater kolony a šířku piku). Retenční čas  $t_R$  je doba od nástřiku vzorku do dávkovače až po dosažení maxima eluční křivky a rozlišení  $R$  určuje účinnost separace dvou složek. Tyto veličiny nám umožní posoudit, zda jsou jednotlivé látky od sebe dobře

separovány a analýza netrvá déle, než by bylo nutné. Všechny tyto charakteristiky jsou ovlivněny výběrem podmínek k analýze (kolona, rozpouštědlo, rychlost průtoku, atd.).

Kvantitativní analýzu můžeme stanovit dvěma metodami: metodou vnějšího standardu – neboli metodou kalibrační křivky, nebo metodou přídavku standardu. [23, 31].

## 2.9.2 Iontová chromatografie

Princip iontové výměnné chromatografie (IEC) spočívá v elektrostatických interakcích mezi stacionární fází, která nese iontové funkční skupiny, oproti analytu nesoucí opačný náboj. Síla interakce je dána velikostí funkční skupiny a náboje analytu. V iontové chromatografii dochází k vzájemné výměně iontů poutaných funkčními skupinami stacionární fáze s ionty v roztoku mobilní fáze. Tyto interakce se dají popsat rovnicemi (1.) a (2.)



Symboly „s“ a „M“ označují stacionární a mobilní fázi.

Existují tři typy iontoměníčů

- Povrchově porézní – vrstva měniče je na pórovitém nosiči
- Mikropartikulární – ionexové pryskyřice (ionexy styrenového typu)
- Chemicky vázané – maticí je silikagel

Ionexy se dělí na katexy a anexy. Katexy uvolňují a vyměňují kationty, zatímco anexy mění anionty. Příkladem anexu je např. benzensulfonová kyselina a jako anexy se využívají zejména aminy. Mobilní fází v iontové chromatografii bývá směs organických nebo anorganických kyselin s vodou. K detekci analytů se využívá zejména vodivostního detektoru nebo hmotnostního spektrometru [23] [32].

## 2.9.3 ICP-OES

ICP-OES neboli Inductively Coupled plasma Optical Emission Spectrometry je spektrometrická metoda založena na měření emise excitovaných atomů a iontů. Využívá se zejména ke stanovení minoritních a stopových prvků v různých typech vzorků. ICP-OES disponuje vysokou přesností a správností měření, možnost zavádění pevných, kapalných i plyných vzorků a nízkou mezí detekce [34].

### 2.9.3.1 Vznik plazmatu

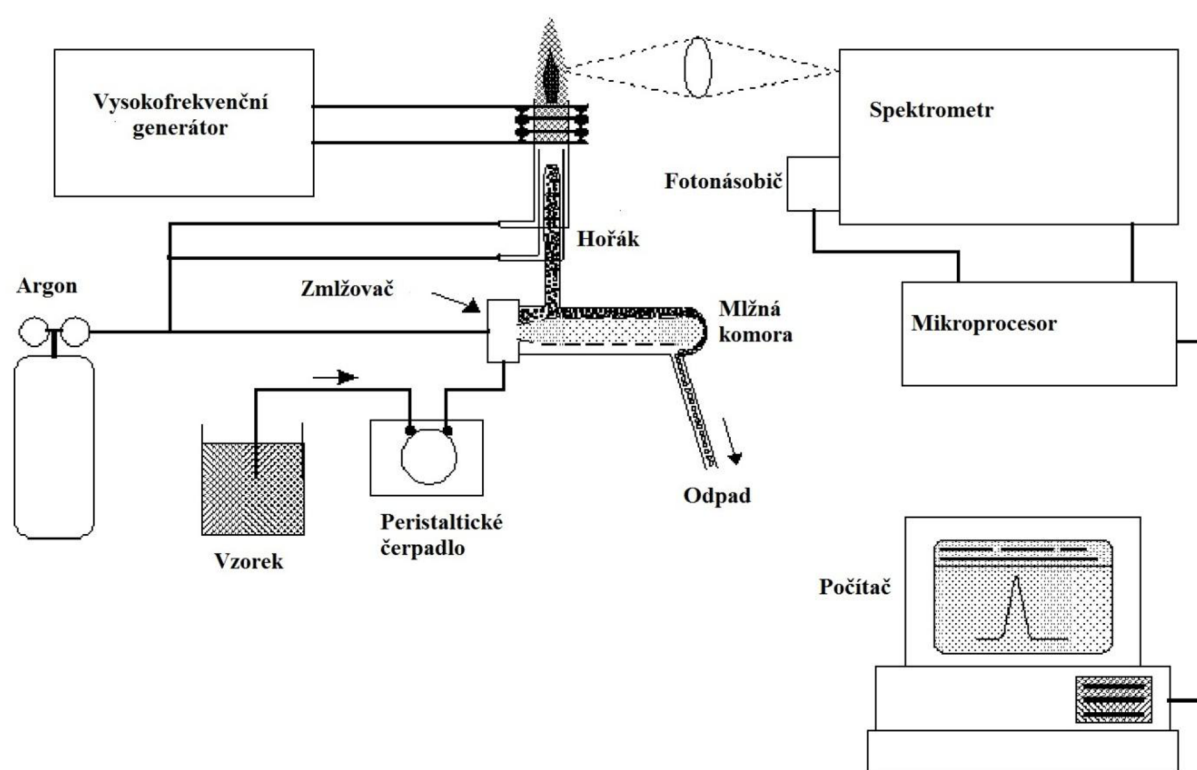
Pro vznik plazmového výboje se používají zejména vzácné plyny, jelikož tvoří stabilní sloučeniny a mají jednoduchá spektra. Vzácné plyny mají také vysokou ionizační energii a z tohoto důvodu umožňují ionizaci většiny prvků. Ze vzácných plynů se nejčastěji používá argon [33].

Výboj ICP je iniciován výbojem z Teslova transformátoru a volné elektrony získávají energii z elektromagnetického pole cívky. Do cívky je dodávána energie

z vysokofrekvenčního generátoru. Ionizovaný plyn prostupuje plazmovou hlavici a v prostoru indukční cívky se zahřeje na teplotu okolo 8000 K, při níž přejde na dobře vodivé plazma [34].

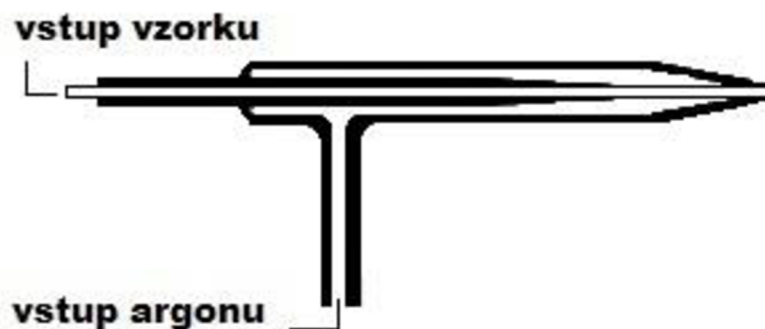
### 2.9.3.2 Experimentální uspořádání

Experimentální uspořádání ICP je složeno ze zmlžovače, plazmové hlavice, optického systému (OES) a detektoru. Schéma je uvedeno na obrázku 10. Do ICP výboje v proudícím argonu je dalším proudem argonu vnášen aerosol, generovaný zmlžovačem. V kanálu výboje se aerosol vysuší a odpaří, páry se atomizují a volné atomy jsou excitovány a ionizovány. Záření je tvořeno čarovou emisí excitovaných atomů a iontů a pásovou emisí dalších částic. Záření z viditelné a ultrafialové oblasti spektra je po disperzi v mřížkovém spektrálním přístroji detekováno v různých typech detektorů.



**Obrázek 10:** Schéma ICP-OES [35]

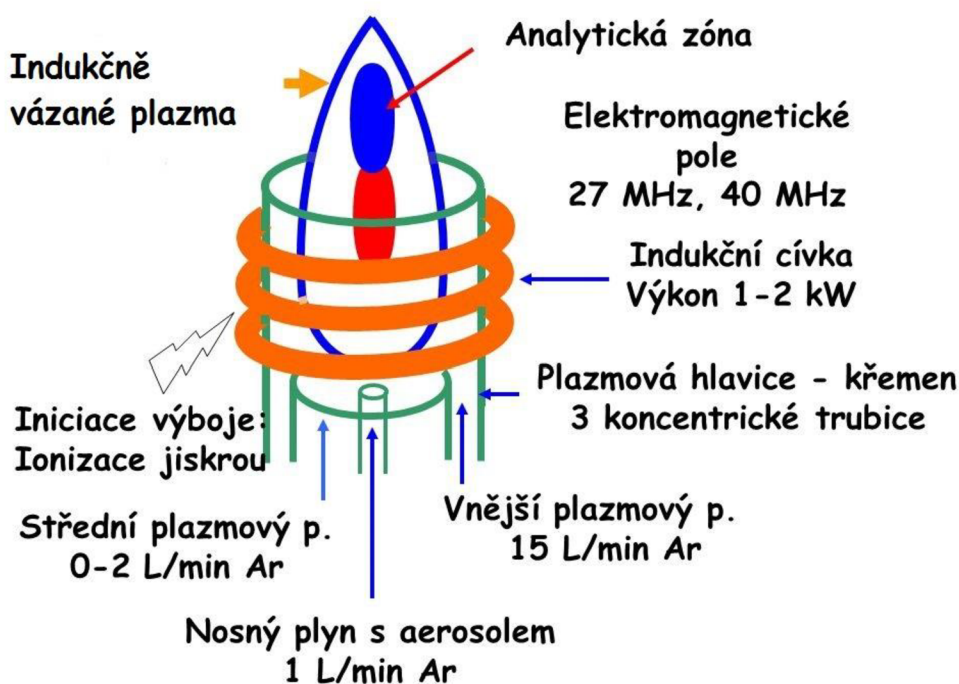
Zmlžovače slouží ke generování aerosolu z kapalného vzorku. Aerosol vzniká působením argonu na proudící kapalinu. Nejčastějším typem je koncentrický zmlžovač typu Meinhard, zobrazený na obrázku 11. Dalšími typy zmlžovačů jsou pravoúhlý, ultrazvukový a tepelný [34].



Obrázek 11: Zmlžovač typu Meinhard [36]

Aerosol je nastříkovan na stěnu mlžné komory. Nejčastěji se využívají cyklonová, Scottova a kónická. Cyklonová mlžná komora se vyznačuje tangenciálním vstupem nosného plynu s aerosolem a má vyšší účinnost přenosu vzorku než Scottova. V cyklonové komoře aerosol proudí ve vířivém pohybu a dochází k oddělení malých částic, které dále pokračují do plazmatu a velké částice odchází do odpadu.

Plazmová hlavice, zobrazená na obrázku obrázku 12, se skládá ze tří křemenných trubic a v každé z nich proudí tři druhy plazmového plynu. Nosný plyn transportuje aerosol, vnější plazmový plyn je nositelem výboje a střední plazmový plyn izoluje plazma od prostřední trubice [34].



Obrázek 12: Indukčně vázané plazma [37]

### 2.9.3.3 Optická emisní spektrometrie

Optický systém je založen na měření záření, které vzniká přechodem valenčních elektronů z vyšších energetických stavů na nižší. Záření vysílané excitovanými atomy je polychromatické a nespojité. Emisní spektrum má čárový charakter. Poloha čáry ( $\lambda$ ) charakterizuje kvalitativní složení analytu a intenzita čáry udává kvantitativní složení. Pro vyhodnocení signálu emitovaného v ICP, je třeba spektrálního přístroje s vysokou rozlišovací schopností. Optický emisní spektrometr se skládá z budicího zdroje a jiskřiště, optického systému, příslušného detektoru a vyhodnocovací jednotky.

Budícím zdrojem může být plamen, ten je využíván zejména v plamenové fotometrii a plazmový výboj. Další budící zdroje jsou elektrické, mezi něž patří elektrický oblouk a jiskra. Stejnoseměrný oblouk může být buď stejnosměrný, při kterém probíhá jeden výboj o napětí 50-100 V, nebo střídavý oblouk, který je přerušován asi stokrát za sekundu při napětí 220-1000 V.

Spektrometry se dělí na simultánní a sekvenční. Sekvenční přístroje jsou monochromátory umožňující postupné nastavení zvolených vlnových délek spektrálních čar a vlnových délek pro měření a korekci pozadí. Simultánní spektrometry umožňují měření více spektrálních čar současně. Na rozdíl od sekvenčního spektrometru je v tomto optickém přístroji mřížka nepohyblivá. Sekvenční spektrometr umožňuje záznam spektra v širokém rozsahu vlnových délek a mají vysokou rozlišovací schopnost a menší pořizovací náklady než simultánní spektrometr. Jeho nevýhodou je však delší doba analýzy a vyšší spotřeba argonu [33, 34].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Laboratorní vybavení a přístroje

- Kádinky
- Pipety, mikropipety
- Zkumavky
- Ultrazvuk: Ultrasonic Compact cleaner PS03000A, objem 2,5 l
- Kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 (Agilent technologies, USA)
- ELDS detektor Agilent Technologies 1260 Infinity
- Kapalinový chromatograf Methrom
- Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Ultima 2, HORIBA Scientific (Francie)

*Tabulka 9: Parametry pro stanovení polyfenolických látek metodou HPLC-UV*

<b>Přístroj</b>	HPLC Agilent Infinity 1260
<b>Kolona</b>	Poroshell 120, RP, C18 (4,6x150 mm; 2,7 nm)
<b>Mobilní fáze</b>	Gradient 5%-30% acetonitril:kyselina mravenčí
<b>Objem nástřiku</b>	5 µl
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,75 ml/min
<b>Teplota</b>	40 °C
<b>UV detekce</b>	280; 290; 350; 360 nm

*Tabulka 10: limity detekce a kvantifikace pro polyfenolické sloučeniny v mg·l<sup>-1</sup>*

<b>Sloučenina</b>	<b>LOQ</b>	<b>LOD</b>
<b>Kyselina galová</b>	0,0062	0,0019
<b>Kyselina kávová</b>	0,0309	0,0093
<b>Kyselina kumarová</b>	0,0163	0,0049
<b>Kyselina skořicová</b>	0,0249	0,0075
<b>Kyselina vanilinová</b>	0,0027	0,00081
<b>Kyselina ferrulová</b>	0,0076	0,0023
<b>Umbeliferon</b>	0,0075	0,0022

*Tabulka 10: Pokračování*

<b>Rutin</b>	0,0071	0,0021
<b>Kvercetin</b>	0,0009	0,0003
<b>Naringin</b>	0,0039	0,0012
<b>Hesperidin</b>	0,0140	0,0042
<b>Katechin</b>	0,0054	0,0016

*Tabulka 11: Parametry pro stanovení sacharidů metodou HPLC-ELSD*

<b>Přístroj</b>	HPLC Agilent Infinity 1260
<b>Kolona</b>	Prevail Carbohydrates ES RP-C18; (250 x 4,6 mm; 5mm)
<b>Mobilní fáze</b>	Acetonitril:voda (75:25)
<b>Objem nástriku</b>	10 µl
<b>Průtok mobilní fáze</b>	1,25 ml/min
<b>Teplota</b>	30 °C
<b>Detekce</b>	ELSD

*Tabulka 12: Parametry pro stanovení organických kyselin metodou IC*

<b>Kolona</b>	Metrosep Organic Acids – 250/7.8
<b>Mobilní fáze</b>	100 mmol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Průtok</b>	0,6 ml/min
<b>Tlak</b>	5,16 MPa
<b>Teplota</b>	30 °C
<b>Detektor</b>	Vodivostní (850 Professional IC 1)

*Tabulka 13: Meze detekce organických kyselin v mg·l<sup>-1</sup>*

<b>Kyseina</b>	<b>LOD</b>
<b>Acetát</b>	0,08
<b>Citrát</b>	0,12
<b>Formiát</b>	0,04
<b>Laktát + Sukcinát</b>	0,11
<b>Malát</b>	0,05

*Tabulka 14: Parametry pro prvkovou analýzu metodou ICP-OES*

<b>Čerpadlo</b>	3-kanálová peristaltická pumpa
<b>Zmlžovač</b>	Typ Meinhard
<b>Mlžná komora</b>	Cyklonová
<b>Generátor</b>	Rádiová frekvence 40,68 MHz
<b>Chladicí zařízení</b>	GenCo pro chlazení cívky a generátoru
<b>Odsávání</b>	Přímé napojení na plazmovou komoru
<b>Plasma</b>	Průtok plazmového plynu 12,5 l/min Průtok nosného plynu 0,2 l/min Plně demontovatelný hořák Vstříkovací tryska o průměru 3 mm
<b>Optický systém</b>	Termoregulovatelný Ohnisková vzdálenost 1 m Optická mřížka s rozlišením 2 400 g/mm Optické rozlišení < 5 pm pro 160 – 320 nm a < 10 pm pro 320 – 800 nm
<b>Vlnová délka</b>	160-800 nm
<b>Detekce</b>	Dual PMT s High Dynamic Detection systémem
<b>Příslušenství</b>	Autosampler AS-500 Zvlhčovač argonu



### 3.2 Použité chemikálie

Tabulka 15: Chemikálie pro HPLC

Standard	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
Quercetin	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	min. 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
Maltosa monohdrát	36032	100	Lachner	Česká republika	6363-53-7
D-frukosa	180,16	100	LACHEMA	Česká republika	57-48-7
D-glukosa	180,16	≥99,5	SIGMA ALDRICH	Francie	50-99-7

*Tabulka 16: Chemikálie pro iontovou chromatografii*

Standard	Mr [g/mol]	Čistota [%]	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
Kyselina chinová	192,17	98%	SIGMA ALDRICH	Německo	77-95-2
Formiát	46,03	98	Lachner	Česká republika	64-18-6

*Tabulka 17: Chemikálie pro ICP-OES*

Prvek	Koncentrace	Startovní materiál	Matrix	Obchodní název	Objem
Draslík	1001 ± 2 mg/l	KNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	MERCK	-
Sodík	1,000 ± 0,002 g/l	NaCl 99,999 %	H <sub>2</sub> O	ASTASOL	500 ml
Fosfor	1,000 ± 0,002 g/l	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 g/l	Zn 99,999%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	100 ml
Hořčík	1,000 ± 0,002 g/l	Mg 99,99%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	500 ml
Vápník	1,000 ± 0,002 g/l	CaCO <sub>3</sub> 99,995%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	500 ml
Měď	1,000 ± 0,002 g/l	Cu 99,999%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	100 ml
Mangan	1,000 ± 0,002 g/l	Mn 99,98%	HNO <sub>3</sub> 2%	ASTASOL	500 ml
Křemík	1,000 ± 0,002 g/l	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 99,9%	H <sub>2</sub> O	ASTASOL	500 ml
Železo	1,000 ± 0,002 g/l	Fe 99,999%	HNO <sub>3</sub> 2% (v/v)	ASTASOL	500 ml

### 3.3 Použitý materiál

Pro tuto práci byly vybrány vzorky světlých výčepních piv vyrobených v České republice. Pro porovnání bylo do studie vybráno i několik druhů nesoucí označení CHZO. Přehled testovaných piv je popsán v tabulce 18

*Tabulka 18: Vybrané druhy piv*

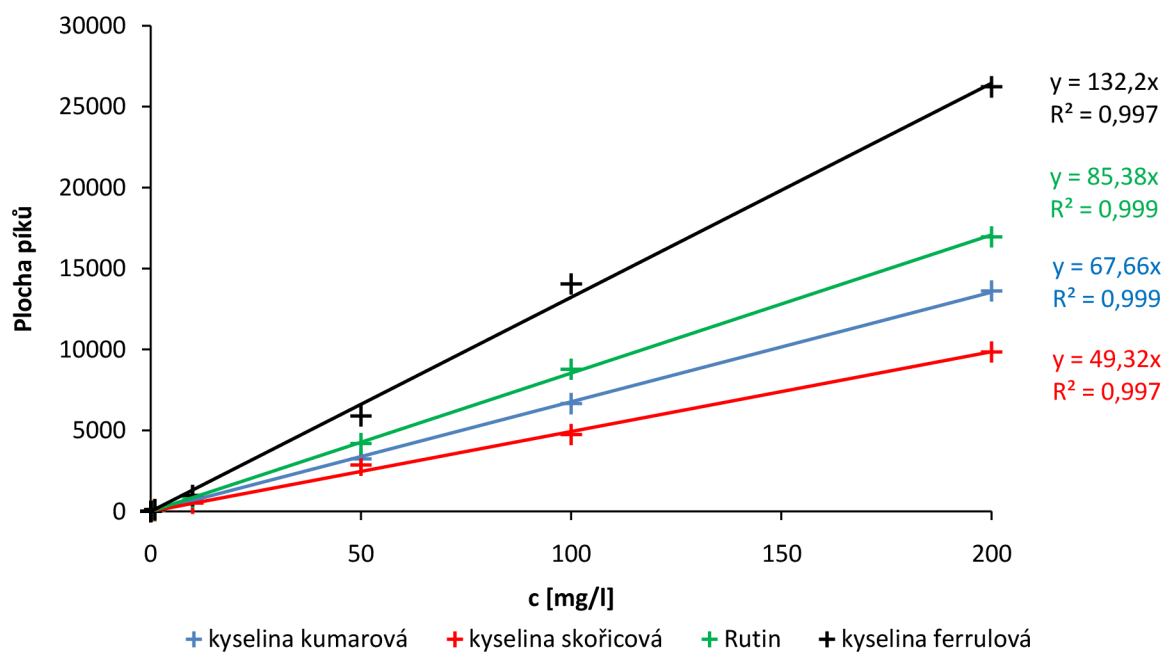
<b>Pivo</b>	<b>Název</b>	<b>Alkohol (%)</b>	<b>Výrobce</b>	<b>CHZO</b>
7	Bulač sv. výčepní	4,2	Selský pivovar, s.r.o., Havířov	ne
8	Krušovice	4,2	Heineken, Krušovice	ano
9	Svijanská desítka	4,0	Pivovar Svijany, a.s., Svijany	Ne
10	Holba Šerák	4,7	Pivovar Holba, a.s., Hanušovice	Ne
11	Pražáčka	4,0	Tradiční pivovar v Rakovníku, a.s., Rakovník	Ano
24	Olivětínský opat	4,0	Pivovar Broumov, s.r.o., Broumov	Ne
25	Chotěboř	4,1	Pivovar Chotěboř, s.r.o., Chotěboř	Ne
26	Delegát	4,0	Zámecký pivovar Břeclav, s.r.o., Břeclav	Ne
27	Grunt	4,0	CZECH BEVERAGE INDUSTRY COMPANY, a.s., Vyškov	Ne
28	Zámecká desítka	4,2	Zámecký pivovar, a.s., Bratčice	Ne
29	Bohemia regent	4,6	Bohemia Regent, a.s., Třeboň	Ne
60	Gambrinus originál	4,3	Plzeňský Prazdroj, a.s., Plzeň	Ano
61	Samson	4,1	Pivovar Samson, a.s., Praha 4	Ano
62	Rohozec podskalák	4,2	Pivovar Rohozec, a.s., Turnov	Ne
63	Platan 10%	4,0	Pivovar Protivín, Praha	Ne
64	Budweiser Budvar	4,0	Budějovický Budvar, n.p., České Budějovice	Ano
65	Ferdinand	4,0	Pivovar Ferdinand, s.r.o., Benešov	Ne
66	Bakalář	4,0	Tradiční pivovar v Rakovníku, a.s., Rakovník	Ano

### 3.4 Příprava roztoků

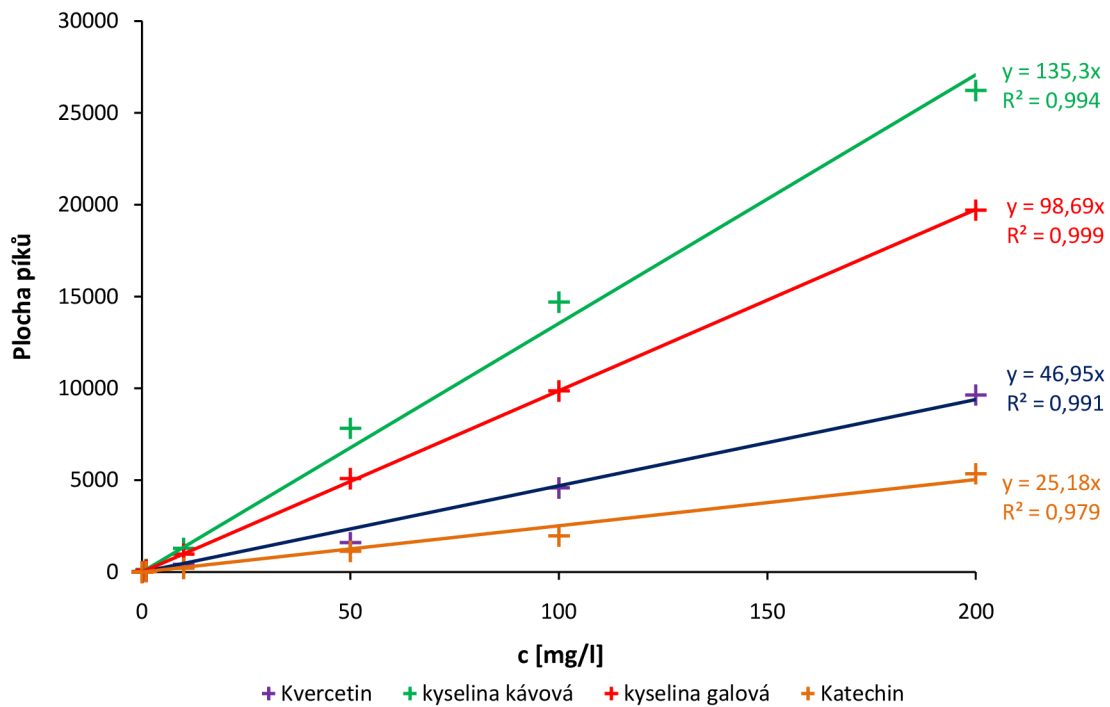
#### 3.4.1 Příprava kalibračních roztoků

##### 3.4.1.1 Kalibrační roztoky pro polyfenolické látky

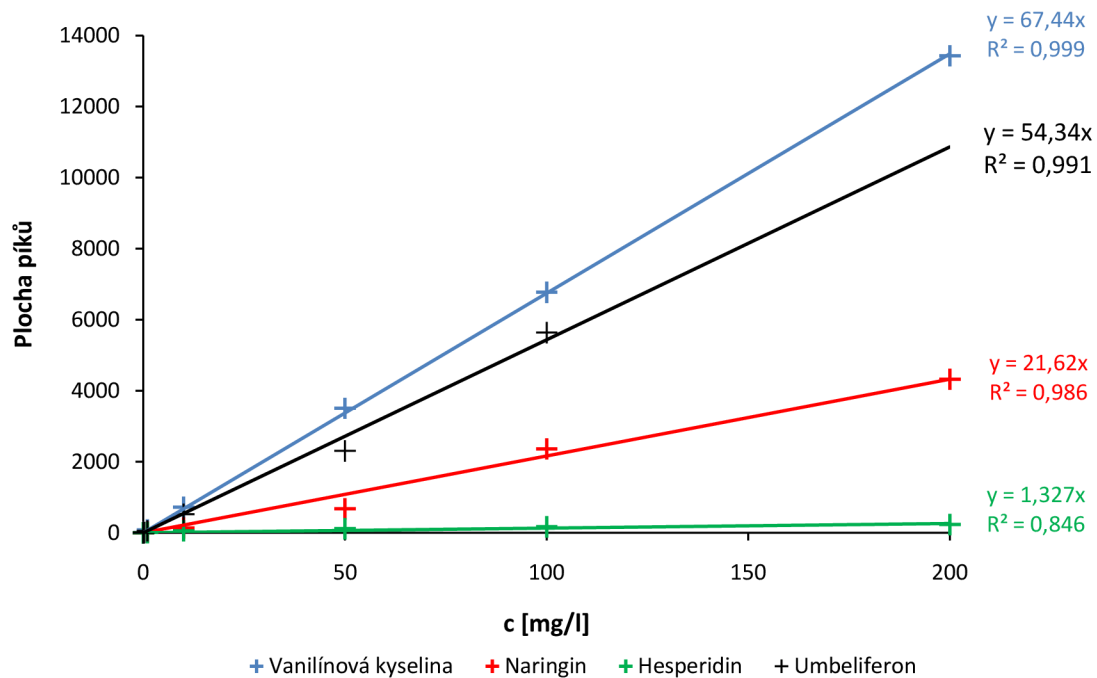
Do 50 ml odměrných baněk byly připraveny zásobní roztoky standardů o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z těchto zásobních roztoků byly poté připraveny směsné kalibrační roztoky o koncentracích 10; 50; 100 a 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kalibrační křivky jsou zobrazeny v grafech 1, 2, 3.



*Graf 1: Kalibrační roztoky 1. Část*



**Graf 2: Kalibrační roztoky 2. Část**



**Graf 3: Kalibrační roztoky 3. Část**

### 3.4.1.2 Kalibrační roztoky pro prvkovou analýzu

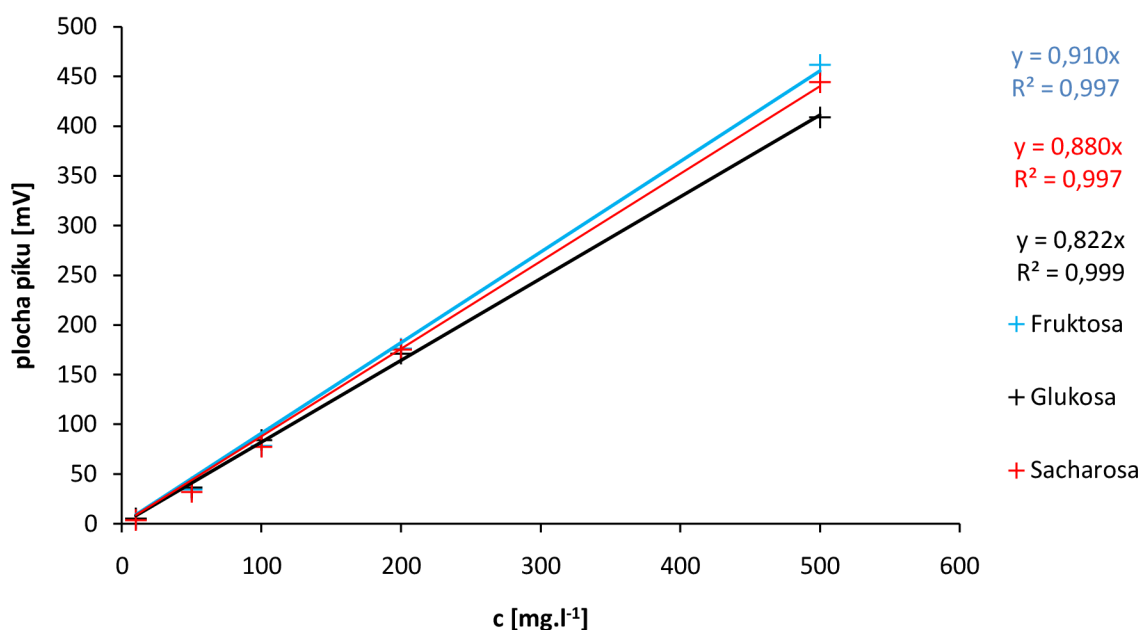
Ze zásobních roztoků o koncentracích  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  byla připravena do 50 ml odměrné baňky jednobodová směsná kalibrace pro mikro prvky Fe, Mn, Cu, P, Zn o koncentracích  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a Si o koncentraci  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro makro prvky Ca, Mg, Na byla připravena jednobodová směsná kalibrace o koncentracích  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a K o koncentraci  $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.4.1.3 Kalibrační roztoky pro organické kyseliny

Ze zásobních roztoků o koncentracích  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  byly připraveny do 50 ml odměrných baněk kalibrační roztoky organických kyselin v rozmezí 10; 20; 25; 50 a  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.4.1.4 Kalibrační roztoky pro stanovení sacharidů

Do 50 ml odměrných baněk byly připraveny zásobní roztoky standardů glukosy, fruktosy a sacharosy o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z těchto zásobních roztoků byly poté připraveny směsné kalibrační roztoky o koncentracích 10; 50; 100; 200 a  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kalibrační křivky jsou zobrazeny v grafu 4.



Graf 4: Kalibrační křivky sacharidů

## 3.5 Analýza vzorků pív

### 3.5.1 Stanovení polyfenolických látek

Všechny vzorky piva byly odplyněny po dobu 30 minut na ultrazvuku a napipetovány do 2 ml vialek. Následně byly vloženy do autosampleru a byla spuštěna analýza metodou HPLC-UV. Každý vzorek byl 2-3krát proměřen. Analýza vzorků probíhala při vlnových délkách 250; 260; 290; 350 a 360 nm. Standardní roztoky byly proměřovány jen jednou za stejných vlnových délek a průtoku.

Jednotlivé standardy byly spolu se vzorky vyhodnoceny v programu Agilent offline. Po provedení integrace píků všech standardů a vzorků byly získané hodnoty zprůměrovány. Z hodnot standardních roztoků byly sestrojeny kalibrační křivky, viz grafy 1, 2 a 3 a z rovnice regrese vyhodnoceny koncentrace jednotlivých sloučenin. Pro HPLC analýzu nebylo nutné vzorky piva ředit.

### **3.5.2 Stanovení sacharidů**

Všechny vzorky piva byly odplyněny po dobu 30 minut na ultrazvuku a napipetovány do 2 ml vialek. Následně byly vloženy do autosampleru a byla spuštěna analýza. Každý vzorek byl kvůli velké spotřebě dusíku proměřen pouze jedenkrát. Analýza byla provedena pomocí metody HPLC s ELSD detekcí. Za stejných podmínek byly proměřeny i standardy glukosy, fruktosy a sacharosy. Ze standardních roztoků byly sestrojeny kalibrační křivky a z rovnice regrese byly po integraci píků vyhodnoceny koncentrace sacharidů ve vzorcích piva.

### **3.5.3 Stanovení prvkové analýzy**

Vzorky piva byly odplyněny po dobu 30 minut na ultrazvuku a naředěny do plastových zkumavek. Pro stanovení mikro prvků (Fe, Mn, Cu, P, Zn a Si) metodou ICP-OES byly vzorky naředěny 10krát a pro stanovení makro prvků (K, Ca, Mg a Na) byly vzorky naředěny 25krát destilovanou vodou. Následně byly vloženy do autosampleru a podrobeny analýze. Koncentrace byly vyhodnoceny pomocí ICP-OES.

### **3.5.4 Stanovení organických kyselin**

Vzorky piva byly odplyněny po dobu 30 minut na ultrazvuku a naředěny do zkumavek. Pro stanovení organických kyselin byla použita metoda iontové chromatografie. Všechny vzorky bylo nutné naředit 2krát. Následně byly podrobeny analýze. Byly změřeny i standardní roztoky, ze kterých byly sestrojeny kalibrační křivky a z rovnic regrese byly vyhodnoceny koncentrace organických kyselin ve vzorcích.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Analýza polyfenolických sloučenin

Jednotlivé vzorky piva byly analyzovány metodou HPLC-ELSD, avšak použití ELSD detektoru pro tato stanovení se ukázalo nevhodným, neboť nebylo možné polyfenolické látky tímto detektorem vůbec detekovat.

Z tohoto důvodu byla analýza provedena s UV detekcí při jednotlivých vlnových délkách. Kyselina gallová, katechin, naringin a hesperidin byly detekovány při vlnové délce 280 nm, neboť při této délce vykazovaly tyto sloučeniny největší absorpci. Umbeliferon, rutin a kvercetin byly detekovány při vlnové délce 350 nm, viz obrázek 15 a ostatní fenolické kyseliny byly vyhodnoceny při 290 nm, viz obrázek 13 a obrázek 14.

Z polyfenolických sloučenin byla nejvíce zastoupena kyselina gallová, jejíž koncentrace se pohybovala v rozmezí od 13,1621 do 55,4514 mg·l<sup>-1</sup>. Naopak nejméně zastoupenými byly naringin a kvercetin. Naringin byl detekován jen ve dvou vzorcích piv v množstvích 0,02868 a 0,2359 mg·l<sup>-1</sup>. Kvercetin byl detekován pouze ve vzorku č. 65. V ostatních vzorcích byl pod limitem quantifikace.

Výčepní piva byla analyzována i ve studii VÚPS [38] za použití coulometrického detektoru. V této studii byl v pivech zastoupen nejvíce naringin o koncentraci 4,62 mg·l<sup>-1</sup>. V zahraniční studii [16] byla analyzována indická piva metodou LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry). Složení indických piv se značně liší od našich tuzemských piv. Byly zde analyzovány polyfenolické látky. Např. kyselina kávová, jejíž koncentrace se pohybovala v rozmezí 0,21-4,7 µg·l<sup>-1</sup> a rutin od 0,2 do 111 µg·l<sup>-1</sup>.

Tato práce se zabývá analýzou světlých výčepních piv vyrobených v ČR. Do analýzy bylo zařazeno několik vzorků piv s označením CHZO, viz kapitola 2.6, pro porovnání s ostatními vzorky. Při porovnání výsledků jednotlivých látek v rámci všech analyzovaných vzorků piv nedochází k velkým rozdílům mezi vzorky s označením CHZO a ostatními druhy piv. Analyzované vzorky piv pochází z různých českých pivovarů, avšak pro jejich výrobu mohly být použity stejné odrůdy chmele, sladu a stejný způsob výroby, jako pro piva s označením CHZO.

Rozdílné složení polyfenolických sloučenin může být následkem použití chmelových náhražek, nebo jiného typu sladu. Množství polyfenolických látek závisí od kvality výchozích surovin, zejména sladu a chmele a taky na výrobním procesu, během kterého dochází k vylouhování polyfenolických látek do roztoku.

*Tabulka 19: Vyhodnocení fenolických kyselin v mg·l<sup>-1</sup>*

Pivo	Kyselina gallová	Kyselina skořicová	Kyselina kávová	Kyselina vanilinová	Kyselina kumarová	Kyselina ferulová
7	13,1621	0,1852	0,3797	0,2130	0,5991	<LOQ
8	21,2609	0,3697	0,2550	0,4073	0,7148	1,3729
9	15,8500	0,3535	0,2045	0,1255	0,6740	1,7458



*Tabulka 19: Pokračování*

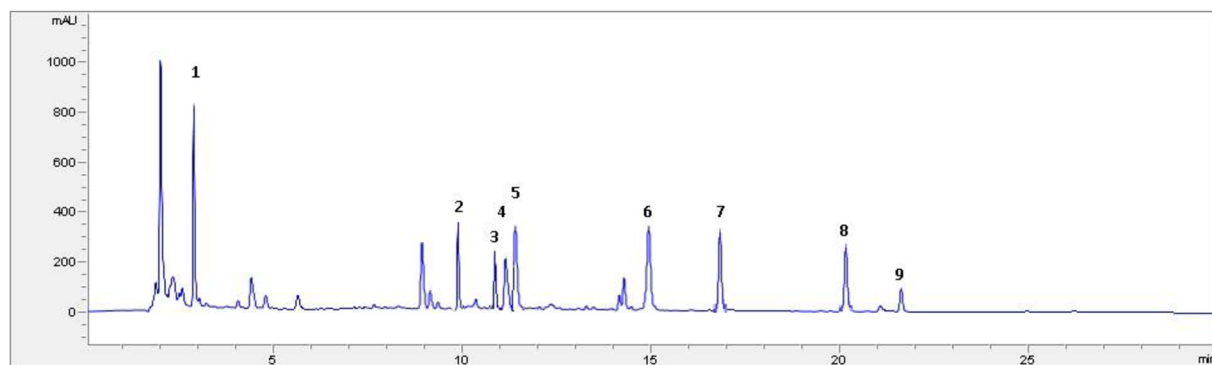
<b>Pivo</b>	<b>Kyselina gallová</b>	<b>Kyselina skořicová</b>	<b>Kyselina kávová</b>	<b>Kyselina vanilinová</b>	<b>Kyselina kumarová</b>	<b>Kyselina ferulová</b>
<b>10</b>	17,0605	<LOD	<LOQ	0,6584	0,4212	2,7587
<b>11</b>	21,0565	<LOD	0,0941	0,1092	0,6006	1,1117
<b>24</b>	21,0315	<LOD	0,4612	0,3455	0,2734	2,6089
<b>25</b>	30,6019	<LOD	0,4634	0,6895	3,2589	3,0809
<b>26</b>	32,7602	<LOD	0,2912	0,1335	0,2335	1,9962
<b>27</b>	21,9576	<LOD	<LOQ	1,3909	0,3562	2,1135
<b>28</b>	27,4020	<LOD	<LOQ	1,4190	0,1375	2,4372
<b>29</b>	46,4981	<LOD	<LOQ	0,4478	0,5720	2,6936
<b>60</b>	55,4514	<LOD	0,3437	0,5427	0,5646	1,5193
<b>61</b>	32,8970	<LOD	0,4682	0,3848	0,4826	0,9421
<b>62</b>	32,2459	<LOD	0,6874	0,3069	0,2564	3,9856
<b>63</b>	47,1324	<LOD	0,4845	0,9193	0,5934	2,2451
<b>64</b>	33,0413	<LOD	0,7409	0,4448	0,1774	3,0026
<b>65</b>	46,2438	<LOD	0,6430	0,5153	0,4161	2,5265
<b>66</b>	49,9914	<LOD	0,4845	0,4626	0,5232	1,7186

*Tabulka 20: Vyhodnocení polyfenolových látek v mg·l<sup>-1</sup>*

<b>Pivo</b>	<b>Rutin</b>	<b>Naringin</b>	<b>Hesperidin</b>	<b>Kvercetin</b>	<b>Katechin</b>
<b>7</b>	0,1113	<LOD	7,1339	<LOQ	0,3217
<b>8</b>	0,7180	<LOD	<LOD	<LOQ	0,6698
<b>9</b>	1,2520	<LOD	<LOD	<LOQ	0,4911
<b>10</b>	2,0028	<LOD	<LOD	<LOQ	0,4170
<b>11</b>	0,8390	<LOD	<LOD	<LOQ	0,6923

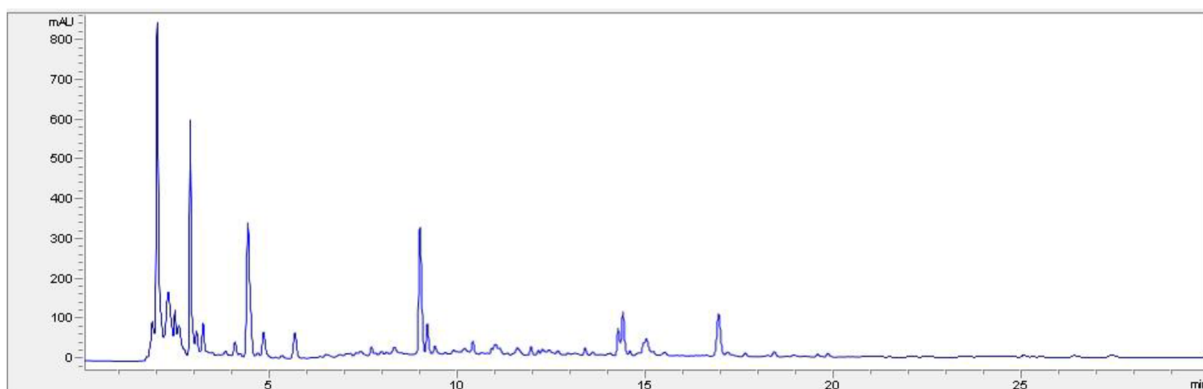
**Tabulka 20: Pokračování**

<b>Pivo</b>	<b>Rutin</b>	<b>Naringin</b>	<b>Hesperidin</b>	<b>Kvercetin</b>	<b>Katechin</b>
<b>24</b>	1,9079	<LOD	<LOD	<LOQ	1,3145
<b>25</b>	2,3296	0,2868	<LOD	<LOQ	2,0770
<b>26</b>	1,4348	<LOD	<LOD	<LOQ	2,9071
<b>27</b>	1,5191	<LOD	<LOD	<LOQ	1,4059
<b>28</b>	1,8377	<LOD	<LOD	<LOQ	1,6600
<b>29</b>	1,8845	0,2359	<LOD	<LOQ	2,1326
<b>60</b>	1,2614	<LOD	<LOD	<LOQ	1,4138
<b>61</b>	0,7186	<LOD	<LOD	<LOQ	0,9531
<b>62</b>	3,1325	<LOD	<LOD	<LOQ	0,5838
<b>63</b>	1,7627	<LOD	4,3708	<LOQ	1,6640
<b>64</b>	2,3700	<LOD	<LOD	<LOQ	1,3264
<b>65</b>	2,0420	<LOD	<LOD	0,1629	2,5874
<b>66</b>	1,4705	<LOD	<LOD	<LOQ	0,2780

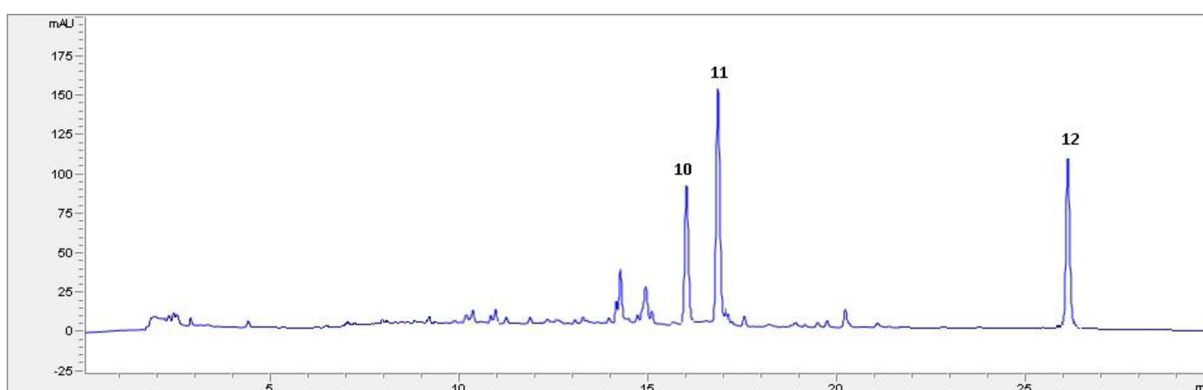


**Obrázek 13:** Vzorek piva s přidavky standardů při 290 nm.

1. Kyselina gallová, 2. Katechin, 3. Kyselina skořicová, 4. Kyselina kávová, 5. Kyselina vanilinová, 6. Kyselina kumarová, 7. Kyselina nerulová, 8. Naringin, 9. Hesperidin



*Obrázek 14: Reálný vzorek piva při 290 nm*



*Obrázek 15: Vzorek piva s přidavky standardů při 350 nm.*

*10. Umbeliferon, 11. Rutin, 12. Kvercetin*

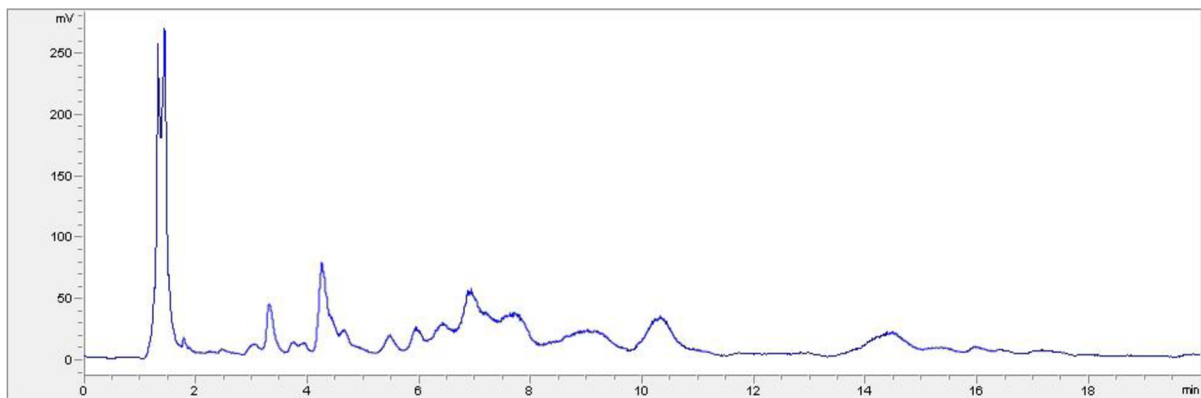
## 4.2 Analýza sacharidů v pivech

V této analýze byly stanovovány cukry fruktosa, glukosa a sacharosa. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v tabulce 21. V této práci byla pro analýzu sacharidů použita metoda HPLC s ELSD detekcí. ELSD detektor je univerzální a velice citlivý, proto byly výsledné píky roztřepané, viz obrázek 16. Pro adekvátní identifikaci se vzorek piva č. 27 navíc obohatil standardy glukosou, fruktosou a sacharosou. Chromatogram sacharidů s přidavkem standardu je zobrazen na obrázku 17.

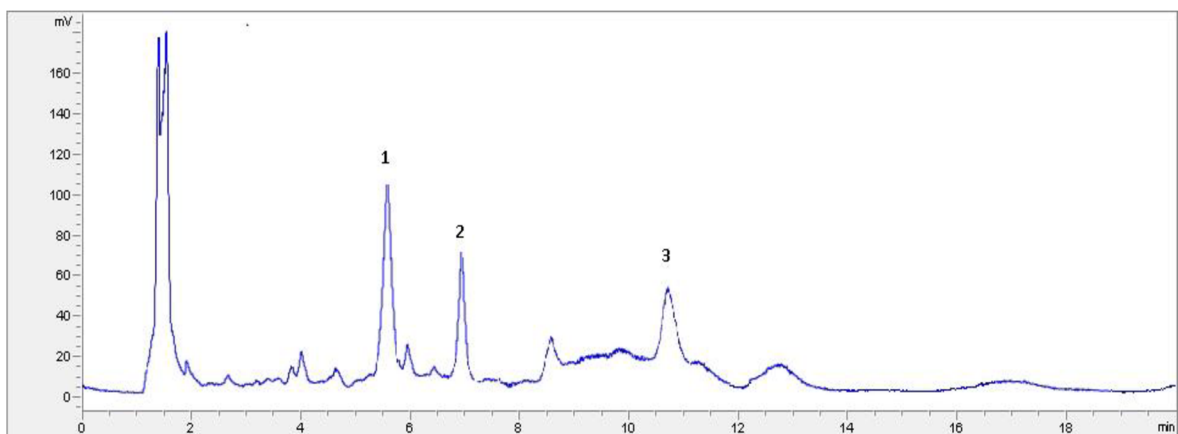
Koncentrace fruktosy se pohybovala od 8,79 do 1873,30  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Glukosa byla stanovena v rozmezí 9,30-4635,83  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a sacharosa se pohybovala v rozpětí 4,43-1709,77  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

V zahraniční studii [39] byla analyzována glukosa a fruktosa rovněž metodou HPLC-ELSD. Koncentrace glukosy se zde pohybovala v rozpětí 0-1200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrace fruktosy byla stanovena od 0-5400  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Množství sacharidů v pivu závisí především od kvality sladu, neboť sladový ječmen obsahuje značné množství škrobu. Během rmutování je škrob štěpen na jednoduché sacharidy, které dále vstupují do biochemických reakcí během fermentace. Odlišné koncentrace sacharidů v různých typech piva, závisí především na druhu vyšlechtěného ječmene, výrobě sladu a způsobu rmutování. Piva s označením CHZO jsou vyráběny dekokčním třírmutovým způsobem. Tento způsob výroby však nelze zaručit u ostatních druhů piv, neboť rmutování může probíhat a jedním až třech krocích.



**Obrázek 16:** Reálný vzorek piva



**Obrázek 17:** Vzorek piva s přidavkem standardů

1. Fruktosa, 2. Glukosa, 3. Sacharosa

**Tabulka 21:** Vyhodnocení sacharidů v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

<b>Pivo</b>	<b>Fruktosa</b>	<b>Glukosa</b>	<b>Sacharosa</b>
<b>7</b>	15,60	11,56	4,43
<b>8</b>	8,79	9,30	15,91
<b>9</b>	360,77	201,70	409,89
<b>10</b>	591,54	606,35	391,82
<b>11</b>	761,21	202,15	292,50
<b>24</b>	379,45	126,08	1709,77
<b>25</b>	125,05	779,48	351,14
<b>26</b>	1466,48	273,58	330,11

*Tabulka 21: Pokračování*

<b>Pivo</b>	<b>Fruktosa</b>	<b>Glukosa</b>	<b>Sacharosa</b>
<b>27</b>	174,18	417,46	867,84
<b>28</b>	104,18	76,08	11,25
<b>29</b>	977,47	461,56	753,41
<b>60</b>	<LOD	4635,83	84,20
<b>61</b>	35,16	221,20	224,43
<b>62</b>	61,98	822,34	284,66
<b>63</b>	776,92	295,80	685,80
<b>64</b>	1873,30	777,44	15,23
<b>65</b>	30,77	123,58	<LOD
<b>66</b>	488,02	173,92	142,61

### **4.3 Elementární analýza piva**

Metodou ICP-OES byly analyzovány některé vybrané kovy jako měď, železo a zinek. Tyto prvky se v pivech vyskytovaly v minimálním množství. Koncentrace těchto kovů se pohybovaly v rozmezí 0,01-0,27 mg·l<sup>-1</sup>. Ze všech analyzovaných prvků vyhodnocených v tabulce 22 a tabulce 23, byl v pivech nejvíce zastoupen fosfor o koncentraci 299-468 mg·l<sup>-1</sup> a draslík v rozpětí 92-478 mg·l<sup>-1</sup>.

Ve srovnání se zahraniční literaturou [40], kde byla provedena analýza metodou ICP-OES na pivech ležáckého typu, byly výsledky stanovení v průměru srovnatelné s výsledky v této práci. Obsah vápníku zde, byl stanoven v průměrné hodnotě 30 mg·l<sup>-1</sup> a koncentrace kovů železa a mědi se pohybovala v rozmezí 0,05-0,08 mg·l<sup>-1</sup>. Pouze stanovení hořčíku se lišilo asi o 11%.

Obsah stopových prvků a minerálů je závislý nejen na použitém sladu a typu chmele, ale značné množství těchto látek je obsaženo také ve vodě, která se používá pro výrobu piva. Pivovary používají vodu jednak z různých oblastí a také jinak upravenou. Tyto podmínky vysvětlují odchylky ve stanovení konkrétních prvků pro různé druhy pív, které jsou zobrazeny v tabulce 22.

**Tabulka 22: Vyhodnocení prvkové analýzy v mg·l<sup>-1</sup>**

<b>Pivo</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>P</b>	<b>Si</b>
<b>7</b>	0,11±0,01	0,0130±0,0006	0,12±0,01	395±7	73±2
<b>8</b>	0,12±0,01	0,054±0,002	0,12±0,01	468±6	36±2
<b>9</b>	0,123±0,003	0,0520±0,0003	0,109±0,001	363±4	36,5±0,5
<b>10</b>	0,1540±0,0003	0,046±0,001	0,096±0,004	386±5	48,6±0,5
<b>11</b>	0,150±0,002	0,035±0,001	0,118±0,001	366±5	33,5±0,4
<b>24</b>	0,12±0,01	0,206±0,005	0,101±0,004	471±9	75±1
<b>25</b>	0,10±0,03	0,272±0,03	0,0790±0,0005	392±6	55±1
<b>26</b>	0,06±0,03	0,11±0,01	0,048±0,003	391±7	75±2
<b>27</b>	0,08±0,03	0,082±0,005	0,055±0,002	356±1	51±1
<b>28</b>	0,11±0,02	0,037±0,001	0,118±0,001	299±3	89±2
<b>29</b>	0,14±0,01	0,091±0,003	0,024±0,001	461±3	57±2
<b>60</b>	0,02±0,01	0,031±0,003	0,0360±0,0004	382±10	21,7±0,1
<b>61</b>	0,01±0,01	0,101±0,003	0,064±0,002	414±3	39,4±0,1
<b>62</b>	LOD	0,092±0,002	0,060±0,001	268±3	48,8±0,6
<b>63</b>	<LOD	0,0140±0,0003	0,0140±0,0003	304±2	52,9±0,3
<b>64</b>	<LOD	0,023±0,003	0,109±0,002	329±4	43,1±0,2
<b>65</b>	0,02±0,01	0,29±0,01	0,13±0,01	315±2	46,3±0,9
<b>66</b>	0,02±0,02	0,050±0,001	0,088±0,003	323,2±0,9	32,4±0,5

**Tabulka 23:** Vyhodnocení prvkové analýzy v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

<b>Pivo</b>	<b>Zn</b>	<b>Ca</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>
<b>7</b>	<LOD	23,8±0,8	465,1±0,2	87±2	10,9±0,3
<b>8</b>	<LOD	76±1	466,0±0,2	100±1	20,5±0,9
<b>9</b>	<LOD	42±1	404,6±0,1	84±1	84,2±0,9
<b>10</b>	<LOD	24,8±0,5	451,3±0,5	68,6±0,9	12,7±0,2
<b>11</b>	<LOD	43,4±0,9	429,1±0,1	81±2	26,0±0,3
<b>24</b>	0,029±0,001	13,9±0,2	348±8	55±1	11,7±0,1
<b>25</b>	0,018±0,002	13,9±0,9	377±6	47±1	5,29±0,09
<b>26</b>	0,0150±0,0005	23,1±0,2	411±5	55,3±0,6	167±1
<b>27</b>	0,023±0,001	32,9±0,6	382±6	57±1	16,8±0,4
<b>28</b>	0,017±0,001	18,6±0,5	478±8	87±4	269±7
<b>29</b>	0,028±0,001	7,2±0,2	341±7	50,9±0,8	8,3±0,4
<b>60</b>	<LOD	23,3±0,2	365±8	61±1	6,0±0,2
<b>61</b>	<LOD	14,1±0,2	375±3	72±1	8,76±0,07
<b>62</b>	0,0150±0,0004	19,6±0,5	92±10	51,0±0,9	25,5±0,4
<b>63</b>	0,0150,001	31,5±0,5	288±6	65±1	33±1
<b>64</b>	0,010±0,001	15,3±0,3	347±4	83±3	11,1±0,1
<b>65</b>	0,016±0,002	28,9±0,5	252±4	76±2	29,7±0,9
<b>66</b>	0,0350±0,0002	45,0±0,9	372±3	73±1	20,5±0,3

#### 4.4 Analýza organických kyselin

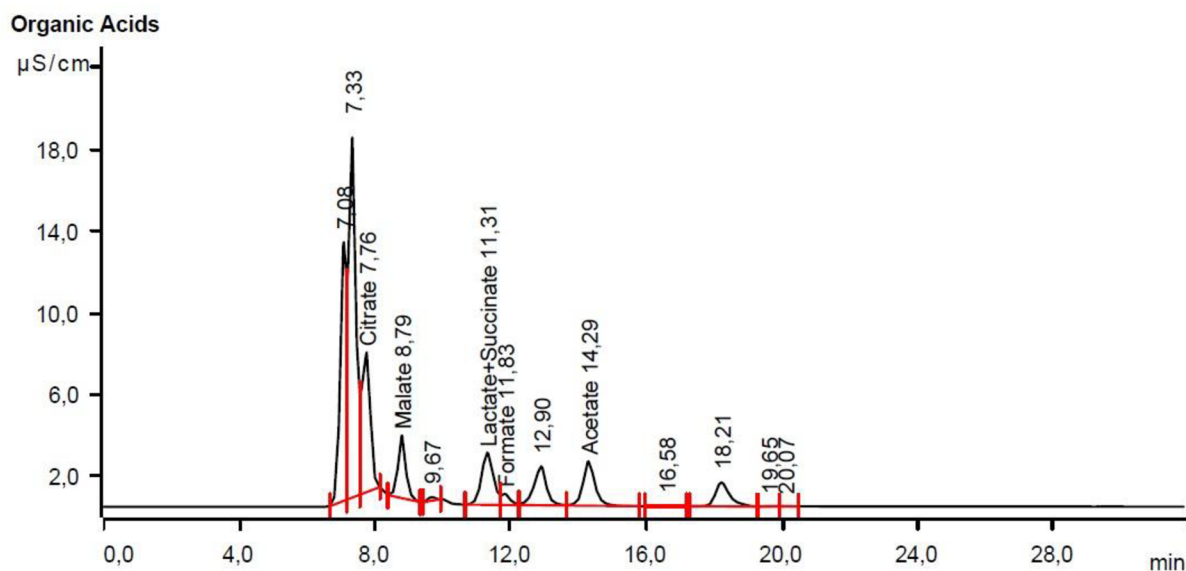
V této práci byly analyzovány tyto kyseliny: citrát, malát, laktát, sukcinát, formiát a acetát. Jednotlivé organické kyseliny byly stanoveny metodou iontové chromatografie, viz obrázek 18. Identifikace byla provedena porovnáním retenčních časů se standardy, viz. obrázek 19. Citrát byl stanoven v rozmezí koncentrací 101,15-249,29  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , malát od 3,80 do 93,78  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a acetát od 34,33 do 132,66  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Nejmenší koncentrace z organických kyselin vykazoval formiát, který byl v mnoha případech pod mezí detekce.

V tabulce 24 je kromě jednotlivých organických kyselin také směs laktátu a sukcinátu. Tyto kyseliny měly při vyhodnocení standardních roztoků totožný retenční čas eluce. Rovněž ve vzorcích piva se projeví jako směs obou kyselin, které nebylo možné odseparovat. Pro lepší separaci těchto dvou kyselin by bylo vhodné použití jiného složení mobilní fáze, nebo jiné metody.

V porovnání se zahraniční studií [41] vycházelo stanovení malátu v rozmezí 37-93 mg·l<sup>-1</sup>, citrátu od 99-124 mg·l<sup>-1</sup> a acetátu od 11 do 159 mg·l<sup>-1</sup>. Tyto rozdíly jsou zejména způsobeny typem piva, neboť zahraniční studie se věnuje analýze piv ležáckého typu, která mají vyšší podíl extraktu původní mladiny a i proces kvašení probíhá delší dobu.

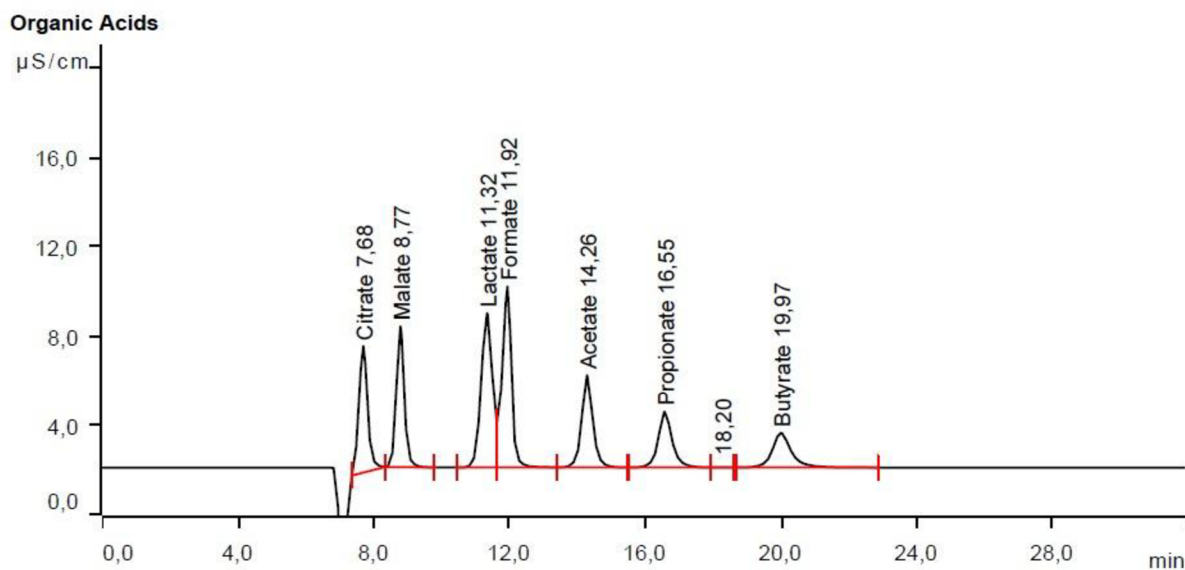
Z výsledků vyplývá, že koncentrace organických kyselin jsou v pivu mnohonásobně větší množství než koncentrace polyfenolických látek. Tento rozdíl může spočívat v tom, že obsah polyfenolických sloučenin závisí na jejich vylouhování do roztoku během přípravy mladiny, na rozdíl od organických kyselin, které vznikají během procesu fermentace. Proces fermentace trvá několik dní, na rozdíl od přípravy mladiny, jejíž příprava trvá asi 4 hodiny.

V průběhu kvašení vzniká glykolýzou pyruvát, který následně vstupuje do Krebsova cyklu, jehož meziprodukty jsou organické kyseliny jako např. citrát, malát, laktát, sukcinát a acetát.



**Obrázek 18:** Organické kyseliny ve vzorku piva





**Obrázek 19:** Standardy organických kyselin

**Tabulka 24:** Vyhodnocení organických kyselin v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

<b>Pivo</b>	<b>Citrát</b>	<b>Malát</b>	<b>laktát + sukcinát</b>	<b>Formiát</b>	<b>Acetát</b>
<b>7</b>	101,15	5,40	129,10	<LOD	122,12
<b>8</b>	112,55	93,78	59,73	11,71	120,49
<b>9</b>	119,14	75,98	86,61	<LOD	67,74
<b>10</b>	134,01	95,22	39,46	11,18	111,70
<b>11</b>	<LOD	37,77	3,80	<LOD	49,39
<b>24</b>	249,29	86,40	92,85	13,07	89,16
<b>25</b>	228,45	5,32	139,95	<LOD	45,37
<b>26</b>	223,24	78,95	84,04	7,81	56,45
<b>27</b>	191,52	<LOD	186,18	<LOD	78,13
<b>28</b>	182,84	3,80	187,38	16,43	89,32
<b>29</b>	244,92	89,05	69,96	6,20	90,34
<b>60</b>	211,79	70,56	41,13	4,61	78,01
<b>61</b>	204,03	5,11	234,63	<LOD	34,33

*Tabulka 25: Pokračování*

<b>Pivo</b>	<b>Citrát</b>	<b>Malát</b>	<b>laktát + sukcinát</b>	<b>Formiát</b>	<b>Acetát</b>
<b>62</b>	221,97	53,99	100,02	7,06	75,46
<b>63</b>	224,13	75,14	116,38	8,64	62,72
<b>64</b>	236,19	92,13	198,43	9,74	126,34
<b>65</b>	236,50	68,56	113,14	8,15	132,66
<b>66</b>	248,08	83,18	121,42	<LOD	78,10

## 5. ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla diskutována výroba piva a vliv výchozích surovin pro jeho výrobu. Hotové pivo obsahuje řadu sloučenin, které mají příznivý vliv na zdraví člověka. Cílem práce bylo stanovení polyfenolických sloučenin metodou HPLC-ELSD a stanovení organických kyselin metodou IC. Zároveň s těmito analýzami byla provedena kvantifikace stopových prvků a minerálů metodou ICP-OES. Analýzy byly provedeny na 18 vzorcích světlých výčepních piv vyrobených v České republice, z nichž některé měly těsně před dobou jejich expirace.

Analýzou HPLC-ELSD nebylo možné detekovat vybrané polyfenolické sloučeniny, proto byla zvolena UV detekce. Z výsledků vyplývá, že nejvíce zastoupenou látkou v pivu byla kyselina gallová. Naopak nejméně vyskytující se polyfenolickou sloučeninou byl naringin a kvercetin, které byly detekovány pouze ve dvou vzorcích piv. Koncentrace jednotlivých látek nebyly rovnoměrně zastoupeny, což mohlo být způsobeno odlišným způsobem výroby piva, nebo různými druhy výchozích surovin. Dalším faktorem, způsobujícím rozdíly koncentrací stanovovaných látek může být také doba expirace konkrétního piva, neboť během stárnutí piva dochází k pozvolnému rozkladu některých sloučenin. Polyfenolické sloučeniny nejsou zcela stálé a časem dochází k jejich rozkladu.

Metodou IC byly stanoveny koncentrace organických kyselin. Tyto karboxylové kyseliny vznikají jako meziprodukty biochemických reakcí probíhajících během fermentace. Většina těchto kyselin má v pivu příznivý vliv, neboť jsou přírodními konzervanty a mají vliv na stabilitu piva. Výsledky analýzy jednotlivých kyselin nevykazovaly žádné velké rozdíly v jednotlivých pivech. Jediným problémem, byla separace laktátu a sukcinátu, která byla analyzována jako směs těchto dvou kyselin.

Metodou ICP-OES byla provedena analýza stopových prvků a minerálů. Největší zastoupení ve všech vzorcích piv měly P, Si a K. Obsah těchto prvků je spojen zejména s použitou vodou, která bývá pro výrobu piva různě upravována a v níž se tyto prvky nachází v dostatečném množství.

Výsledky všech analýz v této práci i zahraničních studií potvrzují, že na obsah analyzovaných látek v pivu mají značný vliv kvalita a jednotlivé druhy výchozích surovin pro výrobu piva. Pro jednotlivé typy piv (výčepní, ležáky) je důležitý konkrétní způsob výroby, který má rovněž značný vliv na obsah organických kyselin a dalších sloučenin v pivu.

Další studie by se mohly zaměřit na separaci směsi organických kyselin, které nebylo možno v rámci použití daných podmínek odseparovat. Rovněž by byla možnost zabývat se nalezením podmínek detekce polyfenolických sloučenin pomocí ELSD detektoru.

## 6. SEZNAM LITERATURY

- [1] BASAŘOVÁ, Gabriela a Ivo HLAVÁČEK. *České pivo*. 2. vyd. Praha: Nuga, 1999, 231 s. ISBN 80-859-0308-3.
- [2] Druhy piva. Pivovar.cz *České pivo a pivovary* [online]. ©2010-2016 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://www.pivovar.cz/druhy-piv/>
- [3] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014, 425 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 9788074182082.
- [4] CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007, 207 s., 8 s. barev. obr. příl. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [5] Pěstování chmele. *Český chmel-tradice kvality* [online]. [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: [http://www.cz hops.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=57&Itemid=58&lang=cs](http://www.cz hops.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=58&lang=cs)
- [6] Chmel otáčivý. *Květena České republiky - plané rostliny* [online]. 2015 [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=184>
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 699 s., [72] s. obr. příl. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
- [8] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015, 626 s. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [9] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [10] *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé centrum, 1996, 495 s. ISBN 80-967-0641-1.
- [11] NADÁNSKÝ, Pavol a Daniela ŠMOGROVIČOVÁ. SENZORICKÁ STABILITA PIVA. *Chemické listy* [online]. 2010, 104(9), 838-845 [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_09\\_838-845.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_09_838-845.pdf)
- [12] *Pivovarský kalendář*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 1998-. ISBN 978-80-86576-68-X.
- [13] České pivo má v mnoha ohledech rozdílné složení oproti zahraničním pivům. *Štamgast&Gurmán* [online]. 2016 [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: <http://www.stamgastgurman.cz/aktualita.php?id=960>

- [14] Ječmenářská ročenka. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 1998-. ISBN 978-80-86576-67-1.
- [15] Pivní ročenka.: pro milovníky dobrého českého piva. Olomouc: Baštan, 2012-. ISBN 978-80-87091-25-8.
- [16] PAI, Tapasya V., Siddhi Y. SAWANT, Arindam A. GHATAK, Palak A. CHATURVEDI, Arpita M. GUPTE a Neetin S. DESAI. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, 52(3), 1414-1423. DOI: 10.1007/s13197-013-1152-2. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1152-2>
- [17] RACEK, Jaroslav. Oxidační stres a jeho ovlivnění. Praha: Galén, c2003, 89 s. Repetitorium. ISBN 80-726-2231-5.
- [18] ČEPIČKA, Jaroslav a Marcel KARABÍN. Polyfenolové látky piva - přirozené antioxidanty. *Chemické listy* [online]. 2002, 96(2), 90-95 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002\\_02\\_03.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002_02_03.pdf)
- [19] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [20] MCMURRY, John. Organická chemie. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [21] ZDENĚK ŠÍPAL, [AJ.], OBR. NAKRESLIL PETR JOB a VZORCOVÁ SCHÉMATA MILOSLAV HEŘMÁNEK. *Biochemie: Celostát. vysokošk. učeb. pro stud. ped. a přírodověd. fak. stud. oboru 76-12-8 učitelství všeobecně vzděl. předmětů*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992. ISBN 978-800-4217-365.
- [22] BIERMAN, Edwin L. Carbohydrates, sucrose, and human disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1979, 32, 2712-2722.
- [23] NOVÁKOVÁ, Lucie. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [24] NOVÁKOVÁ, Lucie. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Praha: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [25] ŠIMKO, Peter. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B*. 2002, 770(1-2), 3-18. DOI: 10.1016/s0378-4347(01)00438-8.
- [26] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.

- [27] KATZ, Elena and others. Handbook of HPLC. New York: M. Dekker, 1998. ISBN 08-247-4685-6.
- [28] HPLC: practical and industrial applications. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001, 461 s. ISBN 08-493-0003-7.
- [29] 1260 Infinity Evaporative Light Scattering Detector. *Agilent Technologies* [online]. 2016 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-detectors/1260-infinity-evaporative-light-scattering-detector>.
- [30] WATREX [online]. Praha: Watrex Praha s.r.o., ©2007-2012 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://www.watrex.cz/watrex/cz/datasheet.php>
- [31] FARKOVÁ, Marta. Instrumentální analytická chemie - praktikum. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 167 s. ISBN 978-802-1055-346.
- [32] KEALEY, D. a P. J. HAINES. *Analytical chemistry*. 1. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2002, x, 342 s. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.
- [33] STUŽKA, Václav. Analytická atomová optická spektrometrie. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000, 81 s. ISBN 80-244-0206-8.
- [34] OTRUBA, Vítězslav (ed.). Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: sborník přednášek 2015. 1. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2015, 288 stran. ISBN 978-80-905704-7-4.
- [35] ANALYTICAL INSTRUMENTS. INDUCTIVE COUPLED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETER. [online]. 2015 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z: <http://analyticalprofessional.blogspot.cz/>
- [36] INDUCTIVE COUPLED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETER. Analytical Instruments [online]. 2015 [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: <http://analyticalprofessional.blogspot.cz/p/oil.html>
- [37] BUREŠ, Vladislav. Laserová ablace se hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu – LA-ICP-MS [online]. 2011 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/5596309/>. Prezentace.
- [38] KELLNER, Vladimír. Studium jednoduchých polyfenolových látek v pivech různé provenience. *Kvasný průmysl*. 2010, 56(5), 234-238. ISSN 0023-5830.
- [39] LEHTONEN, Pekka a Ritva HURME. LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SUGARS IN BEER BY EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTION. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1994, 100(5), 343-346 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1994.tb00834.x. ISSN 00469750.

- [40] Uptake and Release of Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn During Beer Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2015, 73(2), 179-184. DOI: 10.1094/ASBCJ-2015-0402-01. ISSN 03610470. Dostupné také z: <http://www.asbcnet.org/publications/journal/vol/2015/Pages/ASBCJ-2015-0402-01.aspx>
- [41] MONTANARI, Luigi, Giuseppe PERRETTI, Fausta NATELLA, Alessia GUIDI a Paolo FANTOZZI. Organic and Phenolic Acids in Beer. *LWT - Food Science and Technology*. 1999, 32(8), 535-539. DOI: 10.1006/fstl.1999.0593. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643899905935>
- [42] Vícezrné není celozrné. Zdraví ze stravy [online]. 2014 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: <http://www.zdravizestavy.cz/news/vicezrne-neni-celozrne/>

## 7. SEZNAM ZKRATEK

ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
CHZO	Chráněné zeměpisné označení
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
VÚPS	Výzkumný ústav pivovarský a sladařský
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion exchange chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
NP-HPLC	HPLC na normálních fázích (Normal phase HPLC)
RP-HPLC	HPLC na reverzních fázích (Reverse phase HPLC)
ODS	Oktadecylsilikagel
RI	Refraktometrický detektor (Refractive Index Detector)
ELSD	Odpařovací detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry)
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)