



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra technologických zařízení staveb

**Moderní laboratorní metody při výrobě piva
Bakalářská práce**

**Anežka Prokopiusová
Výživa a potraviny**

Vedoucí práce: doc. Ing. Ladislav Chládek, CSc

© 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Moderní laboratorní metody při výrobě piva" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Ladislavu Chládkovi, CSc, za odborné a podporující vedení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Michalu Kořánovi za ochotu a cenné rady. V neposlední řadě také velmi děkuji své rodině a blízkým přátelům za podporu.

Moderní laboratorní metody při výrobě piva

Souhrn

Tématem bakalářské práce je popis laboratorních metod používaných při vstupní kontrole surovin a při stanovení kvality hotového piva. V práci je uveden postup výroby piva a následně u jednotlivých surovin uvedeny jakostní parametry často podpořené českými normami ČSN. Parametry jsou uvedeny u ječmene a sladu, chmelu, násadních kvasnic, varní vody, piva a případných surogátů. Popsané laboratorní analýzy jsou standardizované dle EBC, MEBAK či ASBC. Také jsou uvedené moderní laboratorní metody u stanovení kvality surovin, jež se využívají nebo můžou v budoucnu nahradit stávající metody v pivovarských laboratořích. U analýzy piva jsou uvedeny metody, jež jsou vyhotovovány moderními přístroji, které uspokojují současné standardy kontroly kvality.

Klíčová slova: analýzy, doplňky, chmel, kvasinky, laboratoř, mladina, pivo, slad, voda

Contemporary laboratory methods at brewing beer

Summary

The topic of the bachelor thesis is the description of laboratory methods used in the initial control of raw materials and in the quality determination of finished beer. The thesis presents the procedure of beer production and then the quality parameters for individual raw materials, often supported by Czech ČSN standards. The parameters are given for barley and malt, hops, hatching yeast, brewing water, beer and possible surrogates. The laboratory analyses described are standardised according to EBC, MEBAC or ASBC. Modern laboratory methods for the determination of the quality of raw materials that are used or may in the future replace existing methods in brewery laboratories are also presented. For the analysis of beer, methods are given which are performed with modern instruments that satisfy current quality control standards.

Keywords: adjuncts, analysis, beer, hop, laboratory, malt, water, yeast, wort

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíl práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Proces výroby piva	10
3.1.1	Historie a popis výroby piva	10
3.1.2	Výroba sladu	10
3.1.3	Příprava mladiny	11
3.1.4	Chlazení a kvašení mladiny	11
3.1.5	Filtrace	13
3.1.6	Pasterace a stáčení	13
3.2	Laboratorní metody při stanovení kvality vstupních surovin.....	14
3.2.1	Laboratorní stanovení kvality varní vody.....	14
3.2.1.1	Stanovení parametrů varní vody.....	15
3.2.1.2	Úprava vody	19
3.2.2	Laboratorní stanovení kvality sladu a surogátů	21
3.2.2.1	Stanovení ukazatelů kvality ve sladovnickém ječmeni a sladu	22
3.2.2.2	Chemické složení a jeho stanovení	25
3.2.2.3	Náhražky sladů	29
3.2.3	Laboratorní stanovení kvality chmelu	31
3.2.3.1	Stanovení parametrů chmele.....	32
3.2.3.2	Chemické složení chmelu a jeho stanovení	34
3.2.4	Laboratorní stanovení kvality kvasinek	40
3.2.4.1	Stanovení parametrů kvasinek.....	41
3.2.5	Laboratorní stanovení kvality piva	43
3.2.5.1	Stanovení parametrů hotového piva	43
4	Závěr	52
5	Literatura.....	53

1 Úvod

Pivo je slabě alkoholický nápoj, vyráběný ze čtyř základních surovin, a to z vody, chmele, sladu a kvasnic. Vlastnosti a podíl základních surovin ovlivňují složení mladiny, barvu piva, pěnivost, chuť a koloidní stabilitu piva (Kosař et al., 2000). Varní proces piva se skládá z následujících kroků: šrotování sladu, rmutování, scezování sladiny, výroba mladiny, separace horkých kalů, chlazení mladiny, provzdušňování mladiny, zakvašování mladiny, hlavní kvašení a ležení piva (Chládek, 2007). Následuje stáčení a tepelné ošetření piva.

Aby tento proces mohl proběhnout hladce a výsledný produkt měl dostatečnou kvalitu, je nutné provádět analýzy nejen během varního procesu, ale už při výběru surovin. Tato práce se zaměřuje právě na laboratorní metody využívané nejen v pivovarské praxi, kde je často nutná rychlost analýzy a její vyhodnocení. Z tohoto důvodu jsou využívány laboratorní přístroje, které jsou schopny stanovit několik parametrů najednou z malého množství vzorku. Většina těchto přístrojů je standardizovaná podle EBC, MEBAK či ASBC. Avšak technický vývoj přináší nové či upravené metody pro přesnější stanovení parametrů v pivu a surovinách, které zatím nejsou převedené do pivovarské praxe. Tudíž tato práce má nabídnout soupis standardních i moderních metod, což může být přínosné jak pro odborníky, tak i pro širší veřejnost věnující se této problematice.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce byl popis laboratorních metod využívaných v pivovarských laboratořích, zejména metody stanovující kvalitu vstupních surovin i hotového piva. Za přínos si tato práce klade soupis jakostních parametrů a jejich laboratorní stanovení, které jsou součástí kontroly kvality jak u surovin, tak i u hotového piva.

3 Literární rešerše

3.1 Proces výroby piva

3.1.1 Historie a současnost výroby piva

Pivo se řadí mezi nejoblíbenější alkoholické nápoje v České republice hned vedle vína. Nicméně v posledních letech se ukazuje klesající trend oblíbenosti piva v České republice, největší podíl na tom mají koronavirové restriktce, jež výrazně ovlivnily výstav piva (Český svaz pivovarů a sladoven, 2021). Dle statistiky Celní správy v roce 2021 české pivovary vyprodukovaly 14 368 701,6 hektolitrů piva což je méně než předchozích letech. Už v roce 2020 klesl export oproti předchozímu roku o 381 tisíc hektolitrů na pět milionů hektolitrů, nicméně import do ČR vzrostl o 56 tisíc hektolitrů na 492 tisíc hektolitrů (České noviny, 2021).

Tento alkoholický nápoj má v našich končinách velkou tradici, jeho historie sahá až do starověku, kdy se odhaduje počátek vaření piva, a to v Mezopotámii přibližně mezi 3000-4000 let před naším letopočtem (Chládek, 2007). Historici se domnívají, že Slované v šestém století přinesli chmel a jako první na světě vařili pivo chmelené (Chládek, 2007).

3.1.2 Výroba sladu

Mletí sladu neboli šrotování se provádí za účelem vymletí endospermu sladových zrn na vhodný poměr jemných a hrubších částic, které se využijí později jako filtrační materiál při scezování (Olšovská et al., 2017). Mechanické rozrušení je potřebné pro zpřístupnění extraktivních látek sladu a jejich rozpouštění, dále pak biologické a chemické změny probíhající při rmutování v navazujícím procesu (Basařová et al., 2010). Sladový šrot se smíchá s varní vodou ve vystírací kádi a směs se začne pomalu zahřívát (rmutovat), škrobová zrna obsažená v rozemletém sladu začínají při pomalém zahřívání bobtnat a vznikne škrobový maz při teplotě 52 °C (Chládek, 2007). Při teplotě 65 °C dochází ke ztekucení škrobového mazu, což je enzymový děj, při němž se zkracují řetězce molekul amylosy a amylopektinu až dojde ke zcukření, kdy jsou v roztoku přítomné štěpné produkty škrobu (Basařová et al., 2010).

Po ukončení rmutování se vzniklá směs rozděljuje na dvě fáze, a to fází kapalnou tzv. sladinu a pevnou tzv. mláto (Basařová et al., 2010). Tento proces probíhá ve dvou fázích, a to scezování předku a vyslazování mláta (Kosař et al., 2000). Provádí se ve scezovací kádi, kde po určité době mláto sedimentuje na dno kádě a vytvoří vrstvu vysokou 20–30 cm, přes kterou protéká sladina a tím se čistí (Chládek, 2007). První část sladiny je kalná, a tudíž se přečerpává nazpět nad mláto do té doby, než zákal sladiny neklesne na 40-50 jednotek EBC (Basařová et al., 2010). Sleduje se čirost a stupňovitost sladiny, přičemž po protečení sladiny je potřeba vysladit mláto kvůli zvýšenému množství extraktu (cukru) (Chládek, 2007). Mláto se prolévá horkou vodou a stupňovitost je měřena sacharometrem, vyslazování se opakuje, dokud není stupňovitost ve výstřelkách do 1 % (Chládek, 2007). Vyslazené mláto se využívá ke zkrmování hospodářskými zvířaty, výrobě bioplynu či jako přídavek do stavebních materiálů (Kosař et al., 2000).

3.1.3 Příprava mladiny

Po scezování nastává vaření sladiny s chmelem (chmelovar) a vzniká horká mladina. Během vaření sladiny se postupně přidává chmelový granulát, chmelové extrakty nebo výjimečně přírodní chmel, který vyžaduje další zařízení pro zpracování chmelových šištic (Chládek, 2007). Vaření sladiny s chmelem má několik důležitých cílů, které jsou nezbytné pro další postup. Prvním cílem je odpaření přebytečné vody a docílení obsahu extraktu, jenž je odpovídající typu vyráběného piva, také odpaření těkavých látek, jako jsou chmelové silice, dimethylsulfid a jiné (Basařová et al., 2010). Dalším cílem je inaktivace enzymů a sterilizace mladiny (Kosař et al., 2000). Inaktivace všech enzymů probíhá již při zahřívání mladiny až k varu, sterilizace mladiny se zajišťuje varem, sníženým pH a aseptickým působením látek chmele a tím umrtvuje bakterie, plísňe a kvasinky pocházející ze surovin a předchozího zpracování (Basařová et al., 2010). Jedním z nejdůležitějších pochodů v chmelovaru je vyloučení vysokomolekulárních bílkovin a tvorba lomu (Kosař et al., 2000). Pro specifickou vlastnost piva jako je hořkost, má velký význam rozpouštění a izomerace hořkých chmelových látek (Basařová et al., 2010). Hořké chmelové látky jako α a β -hořké kyseliny mají rozdílnou rozpustnost a odlišně se podílejí na intenzitě a charakteru piva (Basařová et al., 2010). Nejvíce hořkost ovlivňují α -hořké kyseliny (humulony), při varu mladiny částečně izomerizují na Iso- α -hořké kyseliny neboli isohumulony (Kosař et al., 2000). Při ukončení chmelovaru se kontroluje obsah extraktivních látek v mladině, což musí odpovídat typu vyráběného piva (Olšovská et al., 2017). Chmelovar také zajišťuje rozpuštění a upravení složek chmele a chmelových produktů konkrétně polyfenoly, dusíkaté látky, lipidy a dusičnany (Basařová et al., 2010).

Po ukončení chmelovaru dochází ve vířivé kádí vlivem dostředivé síly k separaci hořkých kalů v mladině, vyloučených při chmelovaru (Basařová et al., 2010). Mladina obsahuje hořké kaly, obsahující vysokomolekulární dusíkaté látky, hořké chmelové látky, sacharidy, minerální látky a tuky (Basařová et al., 2010). Za vyšších teplot se vylučují z roztoku hrubé kaly, jemné kaly se odlučují ve větší míře až po ochlazení mladiny pod 60 °C (Basařová et al., 2010). Hořbý kal musí být z mladiny úplně oddělen kvůli zanášení povrchu kvasničných buněk vločkami kalu (Kosař et al., 2000). Hrubý kal lze odstranit mnoha zařízeními, a to chladicími stokami, usazovací kádí, vířivou kádí, či odstředivkami, nebo dekantéry (Kosař et al., 2000). Jemné kaly lze odstranit pomocí zákvasné kádě, sedimentační kádě, vířivé kádě (v kombinaci s hrubými kaly), filtrace studené mladiny za pomoci naplavovacích síťových nebo svíčkových filtrů (Basařová et al., 2010).

3.1.4 Chlazení a kvašení mladiny

Pro chlazení mladiny na zákvasnou teplotu (6 °C) se používají dnes výlučně uzavřené systémy, nicméně otevřené systémy např. sprchový chladič je využíván už pouze ve výjimečných případech (Basařová et al., 2010). Chlazení v uzavřených systémech probíhá např. v trubkových nebo deskových chladičích (Basařová et al., 2010). Načež uzavřené systémy jsou výhodnější z hlediska menšího rizika kontaminace. Za výstupem zchlazené mladiny z chladiče se provádí provzdušňování pomocí svíček z keramických nebo ocelových pórovitých materiálů nebo Venturiho trubcí (Basařová et al., 2010).

Následující nedílnou součástí pro výrobu piva je kvasný proces rozdělený na hlavní kvašení a dokvašování. Při kvašení piva jde o řízenou přeměnu sacharidů na alkohol a CO₂, pro vytvoření vhodných organoleptických vlastností piva (Kosař et al., 2000). Průběh kvašení závisí na složení mladiny, druhu použitých kvasnic, zákvasné dávce, teplotě kvašení, tlaku či objemu nádob (Kosař et al., 2000). Hlavní kvašení probíhá buď klasickým způsobem v otevřených kádích umístěných v chladicích místnostech zvané spilky, nebo v uzavřených kvasných nádobách či cylindrokonicích tancích (CKT) (Olšovská et al., 2017). Ze spilek je nutné odvádět vzniklý CO₂ aby se nehromadil a nedocházelo k otravám a život ohrožujícím situacím (Basařová et al., 2010). Po napuštění provzdušněné mladiny do otevřených nebo uzavřených kvasných kádí nebo CKT následuje proces zakvašování, jehož hlavní úlohou je distribuce kvasinek do celého objemu mladiny, zároveň je potřeba zvýšení obsahu rozpuštěného kyslíku, aby byl nastartován metabolismus kvasinek (Kosař et al., 2000). Pro výrobu piva se cíleně využívají kvasinky převážně druhu *Sacharomyces cerevisiae*, existuje přibližně 1000 kmenů tohoto druhu v mezinárodních sbírkách (Basařová et al., 2010). Pivovary kvasnice získávají v sušeném i tekutém stavu. Kvasinky se rozdělují na svrchní a spodní pivovarské kvasinky, mezi zástupce spodních kvasinek patří *S. cerevisiae (carlsbergensis)*, využívají se při výrobě ležáků plzeňského typu a sedimentují na dně kvasné nádoby (Basařová et al., 2010). Pro výrobu piv typu „Ale“, „porter“, se využívají kvasinky svrchního kvašení *S. cerevisiae subsp. Cerevisce* (Kosař et al., 2000). Rozdíl mezi spodním a svrchním kvašením je teplota a délka hlavního kvašení, spodní kvašení probíhá při teplotě 7-15 °C a trvá 6-8 dní, zatím co svrchní kvašení probíhá při 15-16 °C, může vystoupat až ke 24 °C a prokvašení mladiny trvá 48 hodin (Olšovská et al., 2017). Hlavní kvašení se dělí na čtyři stádia, při prvním stádiu začínají rozptýlené kvasnice v mladině proces lihového kvašení, který lze poznat podle pěny na povrchu mladiny a uvolňování oxidu uhličitého (Chládek, 2007). Konec prvního stádia se vyznačuje houstnutím pěny a soustředěním do středu kvasné nádoby kvůli uvolňování oxidu uhličitého a stoupání po stěnách kvasné nádoby (Chládek, 2007). Druhým stádiem kvašení se vyznačuje objevování bílých kroužků, trvá přibližně dva až tři dny (Chládek, 2007). Třetím stádiem hlavního kvašení jsou vysoké hnědé kroužky, kdy se mění barva bílých kroužků na hnědé kvůli chmelovým a tríslovinovým látkám vynášených oxidem uhličitým nad hladinu kvasící mladiny (Chládek, 2007). Následně probíhá aglutinace a sedimentace kvasnic, přičemž vzniká nízká hustá deka z vyloučených látek na povrchu mladého piva, kvasinky sedimentují na dno kvasné kádě a probíhá sběr kvasnic, po jejich vyprání a promytí studenou vodou se mohou využít k dalšímu zakvašení (Olšovská et al., 2017). Také kvasničná deka se musí sebrat z povrchu mladého piva kvůli negativnímu ovlivnění chuti mladého i hotového piva při jejím propadnutí do piva (Basařová et al., 2010).

Následuje převedení mladého piva do ležáckých tanků a takzvané dokvašování, při kterém pivo leží při teplotě 0-3 °C pro dosažení chuťové zralosti a sycení piva vznikajícím oxidem uhličitým při zkvašování zbylého extraktu (Olšovská et al. 2017). Tímto procesem získá pivo přirozenou koloidní stabilitu (Basařová et al., 2010). Obvyklá doba dokvašování a zrání trvá u deseti stupňových výčepních piv dvacet jedna dnů, u dvanácti stupňových ležáků se doba vyšplhá až na 70 dnů (Basařová et al., 2010). U svrchně kvašených piv probíhá dokvašování za přídavku tekutého cukru na podporu dokvašování či kuléru pro zvýšení barvy

při výrobě piva typu „Ale“, pivo je v s těmito přísady v kontaktu osm až patnáct dní při teplotě 13-16 °C (Basařová et al., 2010).

3.1.5 Filtrace

Filtrace piva spočívá v oddělení suspendovaných částic v pivu od filtrátu, který je čirý (Basařová et al., 2010). Oddělované částice obsahují mikroorganismy jako jsou kvasinky či bakterie a zákalotvorné částice, což jsou bílkoviny či polyfenoly, odlučující se v roztoku s klesající teplotou (Basařová et al., 2010). Způsobů filtrace je vícero, lze provést sedimentací neboli oddělení pevné a kapalné fáze na základě rozdílné měrné hmotnosti, nebo pomocí porézní filtrační přepážky, kde se zachytí pevné částice (Kosař et al., 2000). Dále lze filtrovat přes různé filtrační materiály, nejčastěji se v pivovarech používá křemelina či perlit (Basařová et al., 2010). Křemelina se získává ze schránek rozsivek, mikroskopických rostlin řadící se k řasám řádu *Diatomaceae* (Basařová et al., 2010). Důležitá vlastnost je permeabilita, tedy průtočnost křemeliny, úměrná její jemnosti a poréznosti, kdy při filtraci vznikne filtrační koláč a průtok přes něj umožňuje zachytit jemné kalové částice až do velikosti 0,1 μm (Kosař et al., 2000). Filtrační materiál perlit je z hlinito-křemičitých hornin sopečného původu, pro použití se upravuje v rotační peci zahřátím na 800–850 °C, přičemž vázaná voda se přemění na páru a v materiálu expanduje (Basařová et al., 2010). Objem se zvětší až třicetkrát, po rozemletí a protřídění se získá filtrační materiál (Basařová et al., 2010). Vedle filtračních materiálů jsou různé druhy filtrů, dnes hojně používané naplavovací filtry, jež lze rozdělit na deskové, svíčkové či síťové filtry (Kosař et al., 2000). Při filtraci se často používají také přípravky pro zajištění koloidní trvanlivosti, srážecí stabilizátory (tanin), adsorpční (silikagel), enzymové (papain) či antioxidační (kyselina askorbová) (Olšovská et al., 2017). Při přehnaném užití stabilizačních prostředků lze očekávat snížení plnosti chuti piva, zhoršení pěnivosti či zhoršení sensorické stability (Olšovská et al., 2017). Dále jsou vyvíjeny a využívány membránové moduly v jejichž pórech se zachytí koloidní látky a nedochází k možnému předávkování, jako je tomu u stabilizačních prostředků (Basařová et al., 2021). Zfiltrované pivo přechází do přetlačných tanků, které se nesmí při přečerpání provzdušnit z důvodu narušení koloidní a sensorické stability (Basařová et al., 2010).

3.1.6 Pasterace a stáčení

Finálním krokem výroby piva je stáčení do obalů a expedice hotového zlatavého moku. Značnou roli ve výběru obalů hrají kulturní zvyklosti, tradice či vývoj trhu. Historicky se využíval pro stáčení hotového piva dřevěný sud, dnes se využívají nerezové sudy pro přímé spotřebitele a pro výčepy. Mezi nejvíce využívané obaly piva malého objemu patří skleněné lahve různých typů, plastové vyfukované lahve a nápojové plechovky. Pro větší objemy piva se využívají ocelové sudy různých objemů (10–150 l), party soudky, plastové jednocestné sudy či tanky (Basařová et al., 2021).

Plnění probíhá tak, že se pivo stáčí do nerezových sudů, nápojových plechovek, skleněných nebo plastových lahví, předplněných oxidem uhličitým na požadovaný tlak (Olšovská et al., 2017). Po naplnění láhve dojde k jejímu uzavření korunkovacím strojem, ve kterém se nejdříve korunka přitiskne na hrdlo láhve a následně se pružinou vtlačí do uzavíracího

kroužku (Basařová et al., 2021). Německá firma Krones vyvinula v roce 2019 kombinovaný plnič s korunkovacím strojem typ Dynafil, ve kterém se láhev naplní a uzavře během jedné otáčky plničího a uzavíracího stroje. (Chládek, 2019).

Pivovar je povinen zajistit u hotového piva po dobu deklarovanou na etiketě mikrobiologickou, koloidní i chuťovou trvanlivost (Kosař et al., 2000). Biologické stability piva lze dosáhnout přísným dodržováním čistoty, zamezující kontaminaci nežádoucími mikroorganismy v průběhu výroby piva (Kosař et al., 2000). Jedním ze způsobů je pastace, proces, při němž dochází působením tepla k inaktivaci mikroorganismů (Basařová et al., 2010). V pivovarech se používá tunelová či průtoková pastace, v tunelové pastě se pivem naplněné lahve ohřívají postupně sprchováním teplou a horkou vodou při průchodu tunelem na teplotu 62 °C (Kosař et al., 2000). Při průtokové pastaci piva (pastéry PPP) se nápoje postupně v několika sekcích ohřívají deskovými výměníky na teplotu 68–70 °C, výhodou tohoto pastéru je možnost předehřívání studeného piva v rekuperační sekci deskovým výměníkem, ve kterém prochází protiproudě horké již pasterované pivo, které své teplo předává přicházejícímu nápoji (Chládek, 2007). Předehřáté pivo se pak dohřívá na požadovanou teplotu v dohřívací sekci, poté prochází výdržníkovou sekci, ve které setrvá po dobu 60 sekund a vrací se do rekuperační sekce a dochlazovací sekce. (Chládek, 2007). Průtoková pastace probíhá před stočením piva do spotřebitelských obalů, zejména party soudků, plastových lahví, sudů nebo tanků (Basařová et al. 2021). V porovnání účinnosti pastace vychází lépe tunelová pastace především v zajištění mikrobiologické stability piva i přes vyšší pořizovací cenu a provozní náklady (Basařová et al. 2021). I průtoková pastace má své výhody, z nichž nejdůležitější je, že nedochází ke změně organoleptických vlastností piva a je nižší spotřeba energie při jejím provozu, avšak je nezbytné udržovat dokonalou sterilitu potrubí, stáčecího aparátu i umytých obalů, jinak by účinek pastace ztratil smysl (Basařová et al. 2021).

3.2 Laboratorní metody při stanovení kvality vstupních surovin

3.2.1 Laboratorní stanovení kvality varní vody

Co se týče množství suroviny je varní voda hlavní surovinou, protože pivo obsahuje největší podíl právě vody. Proces výroby piva je velmi náročný na spotřebu vody, avšak jen část je využita přímo při výrobě piva např. při rmutování, vaření, filtraci či balení piva a větší část vody je využita na čištění, ať už spotřebitelských obalů či mytí nebo sterilizaci potrubí, kudy proudí pivo v jednotlivých šaržích (Anderson et al., 2019; Olajire, 2020). Pivo je tvořeno z 90 % vodou, která má různé vlastnosti a parametry, které mohou ovlivnit chuť, jde o hodnotu pH, koncentraci iontů, přítomnost mikrobů a reziduí dezinfekčních prostředků (Anderson et al., 2019). Kvalita varní vody je klíčová, protože při nevhodném složení minerálů obsažených ve vodě, může dojít k nepříznivému ovlivnění varního procesu, zejména se jedná o poruchy kvašení a následné ovlivnění organoleptických vlastností (Olšovská et al., 2017).

Ionty ve vodě mohou ovlivnit pH rmutu, mladiny i piva, a také enzymatické a neenzymatické reakce, tudíž je důležité znát přesné složení vody. Mezi klíčové ionty ve varní vodě se řadí vápník, hořčík, sodík dále pak draslík. Ionty zodpovědné za snižování pH jsou vápenaté a hořečnaté ionty, především vápenaté ionty mají důležitou funkci ve stabilizaci α –

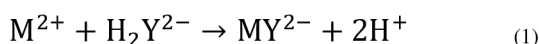
amylázy během rmutování, nebo také při reakci s fosfáty, fytáty, peptidy a bílkoviny, čímž snižují hodnoty pH rmutu a mladiny (Punčochářová et al., 2019).

Pro každý pivovar je klíčový přístup k vodnímu zdroji a jeho kvalita, jelikož jeho složení může být ovlivňováno geologickým místem původu vody. Voda se rozděluje na spodní a povrchovou vodu, zatímco spodní voda je získávána z pramenů a studní, povrchová voda je získávána z řek, přehrad či rybníků. Spodní voda může obsahovat vyšší obsah iontů a rozpuštěných plynů ale méně mikroorganismů, zatímco povrchová voda obsahuje částice zemin, organické a anorganické složky a také mikroorganismy (Chládek, 2007).

3.2.1.1 Stanovení parametrů varní vody

Požadavky na varní vodu lze rozdělit na skupiny jako organoleptické vlastnosti, kde se jedná o barvu, zákal, chuť a vůni vody, dále na mikrobiologické vlastnosti, a to především na nepřítomnost patogenů či na obsah organických a anorganických látek ve vodě (Punčochářová et al., 2019). Nejdůležitější parametry varné vody jsou takové, aby varní voda byla pitná, čistá a bez choroboplodných zárodků.

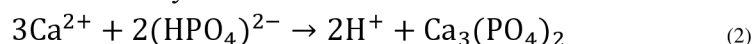
První důležitá charakteristika u varní vody, která je podstatná i pro samotný proces výroby piva je tvrdost vody, kterou lze dělit na uhličitanovou a neuhličitanovou tvrdost (Punčochářová et al., 2019). Lze také tvrdost popsat jako přechodnou či trvalou, přechodnou tvrdost způsobují hydrogenuhličitanové hořčičku či vápníku a během varu se částečně či úplně rozkládají, nýbrž trvalá tvrdost je tvořena například sírany, chloridy, křemičitany a dusičnany vápenatých či hořečnatých iontů a ve vodě zůstávají (Chládek, 2007). Celková tvrdost vody se dá definovat jako součet všech iontů alkalických zemin, jedná se především o vápenaté, hořečnaté, strontnaté a barnaté ionty, avšak poslední dva zmíněné ionty mají zanedbatelný význam (Kosař et al. 2000 ; Punčochářová et al., 2019). Stupeň tvrdosti je možné vyjádřit v německých, francouzských, anglických či amerických stupních, které se od sebe odlišují, nicméně dnes je využívána jednotka mmol/l (Kunze, 2010). Z hlediska tvrdosti můžeme vodu rozlišit na vodu měkkou, pokud obsahuje méně než 1,3 mmol. l⁻¹ iontů dále pak od 1,3-2,5 mmol. l⁻¹ je středně těžká voda, tvrdá voda je od 2,5-3,8 mmol. l⁻¹ a velmi tvrdá voda je nad hodnotu 3,8 mmol. l⁻¹ (Kunze, 2010). Tvrdost vody je stanovována dle ČSN ISO 6059 (757384) pomocí komplexometrické titrace vzorku vody při hodnotě pH=10 za použití indikátoru Eriochromová čerň, reakce je popsána níže (1). Tvrdost vody může být vyjádřena v mmol/l nebo ve °N, 1 °N se rovná 10 mg CaO nebo 7,2 mg MgO v 1 litru. Rovnice popisující srážecí reakci.



V kvalitě varní vody hraje obsah iontů hlavní roli což dokazuje tabulka č.1, kde jsou uvedené hraniční koncentrace iontů ve vodě. Mezi ionty, jež mají největší vliv na hotové pivo patří vápník, hořčík, sodík, chloridy a sírany (Anderson et al., 2019). Nejdůležitější je vápenatý iont, který během rmutování reaguje s fosforečnany ze sladu a tím snižuje pH rmutu viz rovnice (2) (Eumann, 2006; Buiatti, 2009). Dále má vápník pozitivní vliv na enzymovou aktivitu při rmutování, protože jakmile je snížena hodnota pH, následuje uvolnění enzymů a díky tomu

může probíhat proteolýza a zcukření, což vede ke zvýšení výtěžku extraktu a zvýšení obsahu rozpustného dusíku (Buiatti, 2009). Další pozitivní vliv při snížení pH vápenatými ionty je spatřován ve snížení viskozity mladiny, a tudíž rychlejší filtraci která snižuje extrakci tříslovin a aromatických látek (Buiatti, 2009). Vápník napomáhá i v dalších krocích pivovarského procesu, kde jsou vápenaté ionty nezbytné pro tvorbu lomu, srážení bílkovin nebo také zvýšení flokulace a sedimentace kvasinek během varu (Buiatti, 2009). Tyto ionty jsou také důležité při zrání, kdy je zlepšeno čiření, stabilita a chuť piva (Buiatti, 2009). Vápenaté ionty napomáhají odstraňovat oxaláty jež jsou přítomné během kvašení a můžou zapříčinit nežádoucí sekundární kvašení piva (Eumann & Schildbach, 2012). Obsah vápníku je možné uměle navýšit přidávkem chloridu vápenatého, síranu vápenatého nebo pomocí iontoměníčů (Eumann, 2006).

Reakce vápenatého iontu s fosforečnany ze sladu.



Druhým důležitým iontem vyskytující se ve vodě je hořečnatý, ale problémem je že nemusí mít dostatečně pozitivní vliv na pH z důvodu větší rozpustnosti fosforečnanu hořečnatého, jež vzniká stejně jako fosforečnan vápenatý (Eumann, 2006). Pro jeho nižší rozpustnost by byl nutný přibližně dvojnásobný obsah hořečnatých iontů oproti vápenatým, aby to mělo účinek na pH, navíc hořečnaté soli nepřispívají k dobré chuti piva (Eumann, 2006). Nicméně hořečnaté ionty jsou nutné pro metabolismus kvasinek, a i v malém množství jsou podstatné jako kofaktor enzymů (Buiatti, 2009). Proces snížení pH za přispění vápenatých a hořečnatých iontů můžou překazit hydrogenuhličitany, které zvyšují pH rmutu (Eumann & Schildbach, 2012). Dochází k tomu z důvodu tvorby kyseliny uhličitě z hydrogenuhličitanu a následné odstranění ze rmutu, v podobě oxidu uhličitého díky zahřívání (Eumann & Schildbach, 2012). Ve vodě se také vyskytuje sodný iont, jenž ovlivňuje sladkost a jemnost v koncentracích od 70 do 150 mg/l (Buiatti, 2009). Sodný iont je chuťově příjemnější ve spojení s chloridovými ionty než se sírany, ale pokud je koncentrace vyšší než 150 mg/l může dojít k narušení chuti (Buiatti, 2009). Někdy se také přidává do pivovarské vody chlorid sodný, jinde dávají přednost chloridu draselnému, protože draslík neovlivní výslednou chuť do kysela jako to může být u sodíku (Buiatti, 2009). Nicméně pokud je správně nadávkován chlorid sodný, je možné vytvořit plnost chuti piva (Buiatti, 2009). Dalším iontem ve vodě je draslík, má podobné účinky jako sodný iont, ovšem obsah ve vodě není nijak závratný, na rozdíl od draslíku pocházející ze sladu, kde je ho větší množství (Kosař et al., 2000). Je potřebný pro metabolismus kvasinek, ale nad 10 mg/l může inhibovat některé enzymy (Buiatti, 2009). Dalšími kationty ve vodě jsou mangan a železo, přičemž mangan se podílí na aktivitě některých enzymů, nejvíce při štěpení bílkovin, avšak při vysoké koncentraci je přibarvena pěna, objevuje se zákal nebo hrubá příchut' piva, u železa je účinek poněkud složitější (Kosař et al., 2000). Železo při vyšší koncentraci (nad 0,2 mg/l) může zhoršit zcukření, přibarvit mladinu a při přechodu až do piva zbarvit i pěnu, ovšem její kvalita je díky železu zlepšena (Kosař et al., 2000). Další pozitivní účinek má železo v nízkých koncentracích na kvašení, ale při vyšších koncentracích dochází naopak k degradaci kvasnic (Kosař et al., 2000). Z ostatních prvků jsou podstatné ještě dva, a to zinek a měď, přičemž zinek je nezbytný pro metabolismus kvasnic a měď působí katalyticky při oxidačně-redukčních reakcích (Kosař et al., 2000). Ve varní vodě se vyskytují i anionty jako jsou

chloridy, sírany, dusitany či dusičnany. Koncentrace chloridů by se měla stále pohybovat pod 50 ppm, kvůli riziku vzniku koroze zařízení z nerezové oceli, jež můžou chloridy společně s horkou vodou způsobit (Eumann & Schildbach, 2012). S tím souvisí výskyt chloru v různých podobách, které by ve varní vodě neměly být přítomny z důvodu oxidace, která může uškodit finálnímu produktu zejména z hlediska trvanlivosti (Eumann & Schildbach, 2012). Nebo dokonce samotný chlor může zreagovat s mladinou a složkami piva za vzniku chlorfenolů, čímž vznikne nepříjemná medicínální příchut' (Eumann & Schildbach, 2012). Díky chloraci můžou vznikat jako vedlejší produkty trihalomethany, které jsou považovány za karcinogenní, je tedy nutné dbát na obsah menší než 10 ppb (kdy 1 ppb = 0,001 mg/kg) (Eumann & Schildbach, 2012). Sírany mají svůj původ z vápenatých a hořečnatých solí, přičemž se účastní enzymatických a metabolických procesů, čímž ovlivňují celý technologický proces (Kosař et al., 2000). Mají pozitivní vliv na rozklad škrobu a bílkovin, a tudíž i na filtraci mladiny a sedimentaci rmutu, také přispívají ke zvýraznění hořkosti a takzvané křupavé a suché chuti, avšak při vyšších koncentracích může být chuťový profil drsný či slaný (Buiatti, 2009). Dusičnany nepředstavují samy o sobě problém, přesto by koncentrace ve vodě měla být pod 50 mg/l a je to z důvodu působení některých mikroorganismů, které můžou napomoci k přechodu z dusičnanového iontu na dusitanový (Kosař et al., 2000). Dále pak může zreagovat dusitanový iont se sekundárními aminy za vzniku nitrosaminů, které jsou silnými karcinogeny (Kosař et al., 2000). Pokud jsou ve vodě přítomné dusitany, může to značit přítomnost škodlivých mikroorganismů, mimo jiné dusitanové ionty působí negativně na kvasinky a zároveň možnost vzniku nitrosaminů je stejná jako u dusičnanů (Kosař et al., 2000).

Tabulka č. 1 Požadované chemické složení a limity pro varní vodu (Eumann, 2006).

		Rozsah hodnot		Cílová hodnota
		Min.	Max.	
pH	mg/l	5	9,5	
Ca	mg/l	70	90	80
Mg	mg/l	0	10	
Na	ppm CaCO ₃	0	20	
HCO ₃	mg/l	10	50	25
Cl	mg/l	30	80	50
SO ₄	mg/l	30	150	100
NO ₃	mg/l	0	25	
SiO ₂	mg/l	0	25	
Zbytková alkalinita	ppm CaCO ₃	0	20	<0
THM	µg/l	0	10	
Fe	mg/l	0	0,1	
Mn	mg/l	0	0,05	
NH ₄	mg/l	0	0,5	
NO ₂	mg/l	0	0,1	
BrO ₃	mg/l	0	0,01	
H ₂ S	µg/l	0	5	
Zákal	NTU	0	0,5	

Obsah jednotlivých prvků lze stanovit mnoha způsoby. Dle ČSN jde především o stanovení metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) v různých kombinacích s dalšími přístroji a detektory. Následuje přehled metod dle ČSN pro stanovení jednotlivých prvků.

- Stanovení sodíku a draslíku dle ČSN ISO 9964-2 (757378)
- Stanovení stopových prvků pomocí AAS s grafitovou kyvetou dle ČSN EN ISO 15586 (757381)
- Stanovení kobaltu, niklu, mědi, zinku, kadmia a olova dle ČSN ISO 8288 (757382)
- Stanovení vápníku a hořčíku dle ČSN ISO 7980 (757383)
- Stanovení vybraných prvků optickou emisní spektrometrií a indukčně vázaným plazmatem dle ČSN EN ISO 11885 (757387)
- Stanovení vybraných prvků včetně izotopů uranu za použití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem dle ČSN EN ISO 17294-2 (757388)

Také lze provádět skupinové stanovení iontů kde v obou případech je u iontové chromatografie i konduktometrická detekce.

- Stanovení rozpuštěných aniontů F^- , Cl^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} dle ČSN EN ISO 10304-1 (757391)
- Stanovení rozpuštěných aniontů CrO_4^{2-} , I^- , SO_3^{2-} , SCN^- , $S_2O_3^{2-}$ dle ČSN EN ISO 10304-3 (757391)

Ionty ve varní vodě je možné rozdělit do dvou skupin, první z nich se řadí do primárních standardů a týkají se bezpečnosti vody, a tudíž jsou tyto parametry právně vymahatelné, protože jsou stanoveny maximální limity pro kontaminující látky, načež druhá skupina je nevymahatelná, poněvadž se týká především chuti a pH (Anderson et al., 2019). Do první skupiny patří například vedlejší produkty dezinfekce, jde o bromičnany, trihalomethany, chlor, dusičnany a dusitany a ke druhé skupině se řadí měď, chloridy, ionty železa a manganu, křemičitany, sírany nebo hliník (Anderson et al., 2019). Ionty ve vzorcích můžou být stanoveny vedle standardních metod jako AAS nebo rentgenové fluorescence pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) (Anderson et al., 2019). Tato metoda dokáže analyzovat širokou škálu vzorků, její výhodou je mimo jiné účinnost a specifčnost díky nízkému prahu detekce a vysokému rozlišení, nebo je možné ji využít v kombinaci s kapilární elektroforézou, což je separační technika (Anderson et al., 2019).

Dalším parametrem ve varní vodě je hodnota pH, která souvisí s tvrdostí vody a iontovou silou (Basařová et al., 2021). Ve vodě je pH měřeno pomocí pH metru, pitná voda má hodnotu okolo 7,5. S pH souvisí zásaditost (nebo také alkalita) vody neboli schopnost neutralizovat kyseliny (Anderson et al., 2019). Alkalita vody funguje jako pufrovací systém, který vychytává přebytečné vodíkové ionty a tím chrání před výkyvy pH (Anderson et al., 2019). Pufrovací systém vody je tvořen oxidem uhličitým nebo kyselinou uhličitou, dále uhličitánem a hydrogenuhličitánem (Anderson et al., 2019). Zásaditost lze změřit za pomoci titrace s použitím indikátoru methyloranž, nebo také lze použít autoanalyzátor

s rozsahem 10-200 mg/l CaCO₃, nicméně nevýhodou je, že barva a zákal vzorku může rušit stanovení (Anderson et al., 2019).

Jak již bylo napsáno výše, je nezbytné dbát na mikrobiální nezávadnost vody, proto je důležité rozpoznat mikroorganismy ve varní vodě. Ve vodě, jež je ve styku s pivem je nutné stanovit množství *Escherichia coli*, koliformních bakterií, enterokoků, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* a mikroorganismů kultivovatelných při teplotách 22 a 36 °C (Basařová et al., 2021). Mikroorganismy obsažené ve vodě se také můžou nalézt v kvasnicích a v pivu, nejčastěji jsou to zástupce rodů *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Lactococcus* (Basařová et al., 2021). Mikroby je možné identifikovat díky polymerázové řetězové reakci (PCR) nebo pomocí kultivačních metod, avšak vzorky musí být před analýzou zkoncentrovány pomocí ultrafiltrace (Anderson et al., 2019). Tyto metody jsou buď komplikované a nákladné jako u PCR, nebo časově náročné, a ne zcela specifické jako u kultivačních metod, proto je možné využít pro mikrobiální identifikaci MALDI-TOF-MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) pro včasné rozpoznání bakteriálních rizik z vody (Graham et al., 2015; Anderson et al., 2019). Metoda MALDI-TOF-MS je využitelná ke stanovení gram pozitivních bakterií, pomocí membránové filtrace v kombinaci s magnetitovými nanočásticemi konjugovaných s vankomycinem, díky čemuž je možné separovat a zjistit koncentraci bakterií *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a jiných bakterií (Anderson et al., 2019).

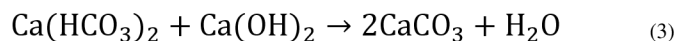
3.2.1.2 Úprava vody

Úprava kvality vody je obvyklá záležitost, pokud pivovar potřebuje změnit vlastnosti vody, kterou recykluje z předchozího použití nebo využívá vodu z vlastních vodních zdrojů. Vodu je možné rozdělit na skupiny podle sekce, kde je využívána a v každé technologické sekci jsou důležité odlišné parametry vody (Eumann & Schildbach, 2012). Jedná se o vodu filtrovanou, servisní, varnou, ředící a vodu do kotlů (Eumann & Schildbach, 2012). Například u vody do kotlů není problém výskytu mikroorganismů, ale spíše obsah solí a jiných anorganických látek a u vody, která je využívána na čištění je to přesně naopak (Kunze, 2010). Postupy pro úpravu vody se kombinují právě v závislosti na následném využití vody, a tedy jde o odstranění suspendovaných látek, odstranění rozpuštěných látek, snížení zbytkové alkality ve varní vodě, eliminaci mikrobů a odstranění rozpuštěných plynů (Kunze, 2010).

První fází je odstranění suspendovaných složek jako je rozpuštěná zemina a rostlinné materiály, v neposlední řadě také odstranění nestabilních složek jako jsou železo a mangan, které podporují oxidaci a srážení (Kunze, 2010; Eumann & Schildbach, 2012). První fáze je realizována pomocí usazovacích nádrží, kdy suspendované látky jsou usazovány na dno, nicméně tímto procesem se neodstraní 100 % těchto látek, a proto jako další krok je využívána filtrace (Kunze, 2010). Částice rozptýlené ve vodě, které způsobují zákal jsou převedeny na nerozpustné formy pomocí solí železa a hliníku, které podporují srážení a díky tomu můžou být sraženiny následně odfiltrovány (Kunze, 2010). Využívají se různé druhy filtrací, uhlíkové filtrace s reverzní osmózou, pískové či vícevrstvé filtry a v poslední době i ultrafiltrace (Eumann & Schildbach, 2012; Olajire, 2020). Ultrafiltrace se osvědčila u velmi znečištěných povrchových vod, kdy je možné zachytit parazity, bakterie a také viry, navíc téměř odstraňuje

zákal díky vytvoření zárodečné bariéry, která všechny tyto mikroorganismy a látky způsobující zákal zachytí (Eumann & Schildbach, 2012). Následně se odstraňují rozpuštěné látky vyskytující se ve formě iontů, kdy je odstraňováno především železo a hořčík (Kunze, 2010). Za pomoci provzdušňování, skrápění, vstřikování či jinými technikami jsou železnaté a hořečnaté ionty převedeny na nerozpustné látky, a tudíž mohou být odfiltrovány (Kunze, 2010). Pro varní vodu je důležitá úprava změkčování pomocí přídavku hydroxidu vápenatého, který způsobuje přeměnu hydrogenuhličitanů na uhličitany, které se opět srážejí a usazují jako uhličitán vápenatý (Eumann & Schildbach, 2012). Tímto procesem je tedy snižována uhličitánová tvrdost, neuhličitánová tvrdost není nijak ovlivněna (Eumann & Schildbach, 2012). Změkčování vody je také možné provést pomocí iontoměníčů či záhřevem (Kunze, 2010). Změkčování pomocí hydroxidu vápenatého popisuje tato rovnice (3):

Rovnice změkčení vody pomocí přídavku hydroxidu vápenatého.



V rámci úpravy vody se dále odstraňují dusičnany, vyskytující se především ve znečištěných vodách dusíkatými hnojivy, a jsou odstraňovány pomocí iontové výměny, reverzní osmózy a elektrodialýzy (Basařová et al. 2021). Voda může být také upravena odvzdušněním (deaerací), kdy se používají vakuové odparky, membránové techniky, nebo odvětrání oxidem uhličitým, dusíkem nebo vodní parou (Basařová et al. 2021). Nicméně odvzdušněná voda se využívá spíše na zředění vysokokonzentrovaných dávek na požadovanou koncentraci mladiny, nebo na zředění nízkoalkoholických a nealkoholických nápojů (Basařová et al. 2021). Nakonec je voda upravena, aby byla hygienicky nezávadná, protože při zanesení nežádoucích mikroorganismů by mohlo dojít k narušení činnosti kvasinek při kvašení (Basařová et al. 2021). Sterilita vody je docílena pomocí působení UV záření, ozonu, chlorace či iontů stříbra (Kunze, 2010). Sterilizace UV zářením se provádí UV lampami při vlnové délce 200 až 300 nm, již po 1 minutě jsou mikroorganismy usmrceny, pokud je dodržena vrstva upravované vody a voda neobsahuje zákal (Kunze, 2010; Basařová et al. 2021). Aplikace ozonu je velmi spolehlivá, protože ozon způsobí oxidaci, díky které dojde k rozkladu buněčných membrán (Kunze, 2010). Z hlediska kvality vody pro pivovarnictví je to vhodný postup, protože nepřenáší žádné pachy a příchutě do piva, ale rozpuštěný kyslík z tohoto procesu může způsobit korozi potrubí a zařízení (Basařová et al. 2021). Další způsob úpravy vody je chlorování, kdy je využita kyselina chlorná vytvořená zavedením chloru do vody (Kunze, 2010). Tento způsob ale není příliš výhodný, přestože je levný, může docházet ke změnám chuti za přítomnosti fenolů ve vodě (Kosař et al., 2000). Proto je výhodnější použít oxid chloričitý, protože nedochází k žádné změně chuti, a navíc vznikají velmi málo organické sloučeniny s halogeny, přičemž náklady na tuto metodu jsou nízké (Kosař et al., 2000).

Odpadní vodu využitou při předchozím procesu vaření piva nebo při sanitaci je důležité bezpečně zlikvidovat nebo zrecyklovat, nicméně úprava pro bezpečné opětovné využití je nákladná a problematická pro pivovary, proto je snaha co nejvíce snížit potřebu vody pro dílčí procesy výroby piva (Olajire, 2020). Opětovné využití odpadní vody je možné díky čištění vody

v bioreaktorech, ať už jde o membránové bioreaktory s membránovou filtrací, či bioreaktor s fluidním ložem (Werkneh et al., 2019).

3.2.2 Laboratorní stanovení kvality sladu a surogátů

Ječmen je jednou ze čtyř hlavních přísad potřebných k výrobě piva. Ječmen neboli *Hordeum vulgare* dodává škrob potřebný k výrobě piva, který se na varně přeměňuje na fermentovatelný extrakt (Kunze, 2010). Pro výrobu sladu se nejčastěji používá ječmen dvouřadý vzpřímený a zřídka pěstovaný ječmen paví, ve výrobě převažují jarní odrůdy ječmene a případně při nedostatečné sklizni se využívají ozimé odrůdy (Basařová et al., 2021). Pro výrobu různých druhů sladu je důležitý výběr odrůdy ječmene a jeho sladovnické vlastnosti, které lze regulovat technologicky (Basařová et al., 2021). U nás se nejčastěji pěstují a také využívají odrůdy jarního dvouřadého ječmene, například Rubín, Jubilant, Forum, Malz nebo novější odrůdy jako Splitfire, Francin či Bojos a mnoho dalších (Chládek, 2007; Basařová et al. 2021). Vyrábí se světlé slady plzeňského typu a tmavé slady mnichovského typu, případně slad vídeňského typu, který je přechodným typem mezi světlými a tmavými slady (Basařová et al., 2021). Tmavé slady, určené převážně k výrobě tmavých piv, se vyznačují vysokou hodnotou barvy kongresní sladiny (11-17,3 j. EBC), vyšším obsahem bílkovin, výrazným aroma, nižší extraktivností a nižší aktivitou sladových enzymů (Basařová et al., 2021). Slad plzeňského typu se využívá pro výrobu světlých typů ležáků, konzumních a speciálních piv, mezi typické vlastnosti sladu patří nízká hodnota barvy kongresní metody (3-4,2 jednotek EBC), dostatečná aktivita amylolytických enzymů a dobré proteolytické rozluštění sladu (Olšovská et al., 2017; Basařová et al., 2021). Přičemž kongresní metoda je sjednocený postup na mezinárodní úrovni pro kvalitativní hodnocení sladu (Basařová et al., 2021). Tato metoda je založena na infuzním rmutování a pro důkladné posouzení kvality jsou potřebné další rozborů (mechanické, fyzikální a chemické) (Basařová et al., 2021). Primární ukazatel sledovaný v kongresní sladině je extraktivnost sladu, dále jodová normalita, rychlost filtrace, hodnota pH, barva sladiny a další ukazatele (Kunze, 2010). V laboratoři se pomocí rmutovací lázně (viz Obrázek č. 1) stanoví výtěžnost sladu pomocí dvou vzorků, kde jeden z nich je 50 gramů nahrubo a 50 gramů najemno mletého sladu, následně je přidáno 200 mililitrů vody a za stálého míchání rmutováno třicet minut při 45 ° C (Kunze, 2010). Poté je teplota zvýšena na 70 ° C a je přidáno 100 ml vody, dále je po dobu jedné hodiny udržována teplota, během celého procesu je sledováno zcukření (Kunze, 2010). Dalším krokem je zředění rmutu za přídavku 450 ml destilované vody a přefiltrování, načež je filtrace ukončena, když se filtrační koláč zdá suchý (Kunze, 2010). Získaný produkt se nazývá kongresní sladina, u níž je nejdůležitější analýzou zjištění získaného extraktu měřeného pomocí pyknometru, refraktometru či hustoměru (Kunze, 2010). Extrakt je vyjádřen v procentech jak ve vodném roztoku, tak i v suchém zrně, což je důležitější ukazatel, avšak obecně platí čím vyšší procentuální hodnota tím lepší slad (Kunze, 2010). Také je porovnáván extrakt u obou výše uvedených vzorků a pokud rozdíl hodnot je malý, tím lepší je slad, protože mletí má malý dopad na extraktivnost sladu (Kunze, 2010).

Obrázek č. 1. Rmutovací přístroj 1-CUBE určený pro laboratoře
(Dostupné z: <https://www.1-cube.com/produkty?categoryId=18471&id=854858&action=itemDetail&oid=6544091&nid=11556>)



3.2.2.1 Stanovení ukazatelů kvality ve sladovnickém ječmeni a sladu

Důležitými ukazateli kvality ječmene je především klíčivost, energie klíčení a také rychlost klíčení (Kosař et al., 2000). Tyto parametry jsou podstatné pro dobrý průběh výroby sladu a piva, protože nízká klíčivost zrna negativně ovlivňuje jak průběh sladování, tak má i vliv na většinu kvalitativních parametrů sladu (Kosař et al., 2000). U ječmene potažmo ve sladu se stanovují mechanické, fyzikální a chemické jakostní parametry (viz tabulka č. 2) (Basařová et al., 2021). Dalším hlediskem pro kontrolu ječmene pro sladování je mikrobiologická kontrola, protože ječmen pro výrobu sladu může být napaden bakteriemi, které se přirozeně mohou vyskytovat v zrnech (Perretti et al., 2011). Zrna mohou být napadena plísní či poškozena škůdci, což může mít negativní dopad na výslednou kvalitu piva (Perretti et al., 2011).

Tabulka č. 2 Přijatelné limitní hodnoty jakostních ukazatelů u sladu (Hartman et al., 2017)

Ukazatelé sladovnické jakosti	Běžné pivo			
	nepřijatelný limit - meze		Optimální hodnoty	
N látky	9,5	11,7	10,2	11
Extrakt v sušině	81,5	83		
Relativní extrakt (45 ° C)	35	53	40	48
Kolbachovo číslo	40	53	42	48
Diastatická mohutnost	220	300	220	300
Dosažitelný stupeň prokvašení	79	82	79	82
Friabilita	79	86	79	86
Obsah beta-glukanů	max. 250		100	

Klíčivost ječmene je procento všech zrn ve vzorku, které jsou schopné klíčit, hranice je minimálně 96 % zrn ve vzorku (Kunze, 2010). Energie klíčení vypovídá o procentu zrn, které během tohoto testu vyklíčí za standartních sladovnických podmínek, při nichž se sleduje, zda zrna ječmene začala klíčit po třech a pěti dnech (Kunze, 2010). Pátý den testu by měla být energie klíčení 96-98 % a třetí den by hodnoty měly být co nejbliž těmto procentům (Kunze, 2010). Pro stanovení klíčivosti lze použít i rychlejší stanovení pomocí metody TIC (tetrazolium – tetrachlorid), která je vhodná k určení energie klíčení záhy po sklizni ječmene (Kunze, 2010).

Mezi mechanické a fyzikální kritéria sladu patří objemová hmotnost a hmotnost tisíce zrn (Basařová et al., 2021). Dle normy ČSN EN ISO 7971-2 (461013) je zrno nasypáno do měrného válce o objemu jeden litr a následně je zvážena nádoba se zrnem, z toho je zjištěna čistá hmotnost zrna v jednom litru, jednotky jsou v $g \cdot l^{-1}$ a podle přepočítávací tabulky je hodnota převedena na $kg \cdot hl^{-1}$. Dle Basařové (2021) platí, že vyšší objemovou hmotnost mají slady s vyšším obsahem škrobu. Z rozdílu objemové hmotnosti ječmene a sladu lze zjistit stupeň rozluštění sladu, platí že čím větší je rozdíl těchto hodnot, tím s vyšší pravděpodobností dojde k účinnější degradaci vysokomolekulárních látek, což znamená zlepšení přístupnosti škrobu v endospermu zrn pro jeho štěpení sladovými enzymy (Basařová et al., 2021).

Hmotnost tisíce zrn se vyjadřuje v gramech suché hmoty, přičemž čím nižší průměrná hodnota tisíce zrn sladu, tím je slad lépe rozluštěn, a tudíž je vyšší pravděpodobnost pro lepší prokvašení piva (Basařová et al., 2021).

Moučnatost je závislá částečně na genetických vlastnostech odrůdy ječmene a posuzuje se podle ní rozluštěnost sladu, sklovitost je velmi ovlivněna podmínkami při pěstování, sklizni a posklizňovými úpravami ječmene (Basařová et al., 2021). Měření moučnatosti lze provádět farinatomem, což částečně podléhá subjektivnímu posuzování, objektivně se provádí prosvětlováním zrna diafanoskopem, přičemž moučnatá zrna jsou méně průchodná pro světlo než zrna sklovitá (Basařová et al., 2021). Pro stanovení moučnatosti se také používají přístroje založené na průchodu laserového paprsku zrnem, nebo pomocí elektronové mikroskopie je hodnocena struktura endospermu (Basařová et al., 2021).

Křehkost (friabilita) sladu je důležitým ukazatelem, protože zrna, která jsou křehká se dobře melou a tím je ovlivněn nejen proces sladování, ale i kvalitativní parametry piva jako je např. pěnivost, což souvisí s jeho rozluštěním neboli odbouráním buněčných stěn tvořenými

z neškrobových polysacharidů a bílkovin (Basařová et al., 2021). Friabilita neboli křehkost sladu se stanovuje pomocí tří přístrojů. První z přístrojů je friabilimetr, který stanovuje křehkost pomocí vážení propadu při protlačování zrn sladu sítím (Basařová et al., 2021). Druhým přístrojem je sklerometr používaný pro měření síly potřebné k přeříznutí zrna a současně stanovuje homogenitu, třetí přístroj je Mürbimetr, který měří energii potřebnou k propíchnutí zrna jehlami na obou koncích (Basařová et al., 2021). K výpočtu je nutné znát tvrdost ječmene, což se stanoví pouze jednou jehlou (Basařová et al., 2021). U kvalitního sladu by měla být friabilita v rozsahu 80-90 % a sklovitost méně než 2 %, při friabilitě nad 90 % došlo k nadměrnému rozluštění sladu, tudíž jsou vyšší sladovací ztráty a nedostatečná pěnivost piva (Kosař et al., 2000).

Extrakt v sušině sladu představuje, kolik procent se uvolní extraktivních látek ze sladu do vodného roztoku neboli sladiny při kongresním rmutování. Je to důležitý ekonomický ukazatel, protože to vyjadřuje že ze sladu s vyšším obsahem extraktu se vyrobí větší množství piva. Stanovení relativního extraktu dodává informace o aktivitě cytolytických a proteolytických enzymů ve sladu, jde o poměr extraktu získaného při teplotě 45 °C a extraktu získaném při kongresním rmutování (Hartman et al., 2017).

Kolbachovo číslo vyjadřuje množství rozpustných dusíkatých látek ve sladince ku celkovému obsahu dusíkatých látek ve sladu (Hartman et al., 2017). Avšak z hlediska technologie výroby piva je důležitější hodnota α -aminodusíku či hodnota celkového rozpustného dusíku ve 100 ml kongresní sladiny (Kosař et al., 2000). Obsah aminodusíku je důležitý pro výživu kvasinek (Kunze, 2010).

Diastatická mohutnost či síla sladu vyjadřuje enzymový potenciál, především β -amylázy ve sladu, díky níž dochází ke štěpení škrobu na jednoduché sacharidy při rmutování (Hartman et al., 2017).

Obsah všech látek, jež mohou být zkvaseny pivovarskými kvasinkami vyjadřuje ukazatel, který se nazývá dosažitelný stupeň prokvašení (Hartman et al., 2017).

Mezi důležité kvantitativní parametry je zařazena barva sladu, která ovlivňuje barvu piva a jeho chemické složení vycházející právě z vlastností sladu (Perretti et al., 2011). Měření je prováděné na kongresní mladině dle EBC, buď vizuálně pomocí srovnávacích standardizovaných kotoučů, nebo spektrofotometricky při vlnové délce 430 nm (Perretti et al., 2011). Avšak absorbance je ovlivněná suspendovanými pevnými částicemi, které mohou být přítomné ve vodě a tudíž vzorky, které nejsou čiré nelze spektrofotometricky analyzovat, ale lze použít filtraci pro odstranění zákalu (Perretti et al., 2011).

Mikrobiologická kontrola sladového ječmene je prováděna, protože slad může být zasažen různými nežádoucími mikroorganismy, plísněmi či může být poškozen od hmyzu (Perretti et al., 2011). Přičemž při sladování snadno dochází k aktivnímu růstu prokaryotických a eukaryotických společenstev, kam patří bakterie grampozitivní i gramnegativní, kvasinky a vláknité houby (Perretti et al., 2011). K aktivnímu metabolismu mikroorganismů dochází během třech fází sladování, což je máčení, klíčení a sušení, během nichž produkují enzymy, které pomáhají rozkládat škrob, bílkoviny a buněčné stěny, díky čemuž byl prokázán i pozitivní vliv na kvalitu piva (Perretti et al., 2011). Také se ukázalo, že slupka máčených zrn je pokryta biofilmem mikrobiálního původu, který chrání buňky před stresovými vlivy z prostředí jako jsou extrémní hodnoty pH, obsah vody, teploty, avšak to má negativní vliv na vznik zákalu

v kongresní sladině (Perretti et al., 2011). Povaha tohoto zákalu byla zkoumána pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Perretti et al., 2011).

Ve sladu se po hvozdění sleduje vlhkost, obsah extraktu a obsah bílkovin, přičemž u odleželých sladů se vlhkost lehce zvyšuje, což má příznivý vliv na mletí (Basařová et al., 2021). U příliš vlhkého sladu se může projevit snížená extraktivnost nebo skladovací problémy, jako možné rozvinutí mikrobiální kontaminace či problémy při kvašení, tudíž by maximální vlhkost sladu neměla překročit 15 % (Kunze, 2010; Basařová et al. 2021). Kritériem spjatým s vlhkostí je extraktivnost sladu, hodnotí se z ekonomického ale i technologického hlediska, protože extraktivnost sladu ovlivňuje kvašení, chemické složení piva i organoleptické vlastnosti (Basařová et al., 2021). Obecně se stanovuje vlhkost v obilovinách dle normy ČSN EN ISO 712 (461014). Pro stanovení je použito 5 gramů rozemletého zrna s přesností na 4 desetinná místa, následně je vzorek umístěn do předehřáté sušárny na teplotu 130-133 ° C a sušen dvě hodiny. Po vyjmutí ze sušárny je umístěna uzavřená miska do exikátoru, kde dojde k vychladnutí a poté je vzorek s miskou navážen.

3.2.2.2 Chemické složení a jeho stanovení

Chemické složení sladu značně ovlivňuje průběh výroby piva, mimo jiné ovlivňuje i chemické, biologické a organoleptické vlastnosti (Basařová et al., 2021). V tabulce č. 3 je přehled chemického složení obilky ječmene, dále jsou také popsány jednotlivé složky ječmene, a tudíž z toho vychází chemické složení sladu. Samotné zrno ječmene se skládá ze tří složek, a to z klíčku, endospermu a obalových vrstev.

Tabulka č. 3 Chemické složení zrna ječmene (Kosař et al. 2000)

Obilka	
Sacharidy	
škrob [%]	60 – 65
(amylosa 17–24 % škrobu)	
(amylopektin 76–83 % škrobu)	
nízkomolekulární sacharidy	
sacharosa [%]	1 – 2
ostatní cukry [%]	1
rafinosa	0,3 – 0,5
maltosa	0,1
glukosa	0,1
fruktosa	0,1
neškrobnaté polysacharidy	
hemicelulosa:	
β-glukany [%]	3,3 – 4,9
pentosany [%]	9,0
celulosa [%]	4 – 7
Tuky [%]	3,5
Fosfáty	
fytin [%]	0,9
Polyfenoly [%]	0,1 – 0,6
Dusíkaté látky [%]	9,5 – 11,9 (7 – 18)
rozpuštěné dusíkaté látky [%]	1,9
albuminy a globuliny	3,5
hordeiny (prolaminy)	3 – 4
gluteliny	3 – 4
Minerální látky [%]	2

Mezi hlavní složky ječného zrna patří škrob, což je rezervní polysacharid a zdroj živin pro klíček při klíčení (Kosař et al., 2000). Škrob vzniká v rostlinách při asimilaci CO₂ při fotosyntéze z jednoduchých sacharidů (Kosař et al., 2000). Škrobová zrna jsou tvořena z 98 % škrobem a zbylá 2 % jsou proteiny, lipidy, obalové látky a minerální látky, jako jsou fosforečnany, vápník a hořčík (Basařová et al., 2021). Škrob se nachází ve škrobových zrnech v endospermu ječmene, jejichž stěny jsou tvořené z bílkovin a neškrobových polysacharidů, kdy u dobře rozluštěných sladů jsou stěny škrobových zrn dobře odbourané díky sladování a tím je zpřístupněn škrob pro působení amylytických enzymů (Basařová et al., 2021). Ve sladu se vyskytují malá a velká škrobová zrna, přičemž zastoupení jednotlivých typů zrn je genetická vlastnost jednotlivých odrůd ječmene, což ovlivňuje technologický proces výroby piva například z hlediska extraktivních látek uvolňovaných při sladování (Basařová et al. 2021; Fox, 2009). Škrob je tvořen méně větvenými řetězci amylosy a větvenými řetězci amylopektinu, u amylosy jsou glukózové jednotky spojené vazbami α -1,4 a základní složkou je maltóza (Fox, 2009; Basařová et al. 2021). Amylosa se při jodometrii barví do modré barvy (Kosař et al., 2000). Amylopektin je tvořen glukózovými jednotkami s vazbami α -1,4 a α -1,6, základní disacharid je maltóza a isomaltóza (Basařová et al., 2021). Řetězce amylopektinu se rozlišují na řetězce A a řetězce B, u řetězců A dochází k větvení pouze na redukujícím konci, řetězce B mohou mít více míst větvení a díky tomuto větvení má schopnost amylopektin mazovatět (Basařová et al., 2021). Amylopektin je barven při jodometrii do červena až červenofialova (Kosař et al., 2000). Stanovení sacharidů je možné provádět pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC), díky níž je možné stanovit například obsah oligosacharidů v mladině (Blšáková et al., 2022). Dále lze stanovit škrob v ječmeni Ewersovou polarimetrickou metodou, která je pomalejší nebo pomocí infračervené spektroskopie (NIR), díky níž se stanoví nejen obsah škrobu ve sladu, ale také další parametry (Hartman et al., 2010). Je to metoda rychlá, nedestruktivní a přesná (Hartman et al., 2010).

V rámci organických látek jsou významné dusíkaté látky, které se objevují variabilně ve sladu v závislosti na vnějších podmínkách, jako jsou například klimatické podmínky, odrůda, složení půdy, výběr předplodiny aj., které částečně ovlivňují vhodnost zrna na sladování (Kosař et al., 2000). Celkový obsah bílkovin v ječmeni je tedy 8 až 13 % v sušině, nicméně pro sladovnický ječmen je žádanější obsah bílkovin 10 až 11 % (Fox, 2009). Tvorba dusíku v ječmeni probíhá za příjmu amoniaku a organických kyselin vznikajících jako meziprodukty při štěpení sacharidů (Kosař et al., 2000). Dusíkaté látky ve sladu představují různé sloučeniny obsažené v pivu, které mohou mít pozitivní i negativní význam při výrobě piva, přispívají k plnosti chuti piva, nebo mají vliv na pěnivost a stabilitu piva (Basařová et al., 2021). Mezi dusíkaté látky se řadí vysokomolekulární a nízkomolekulární sloučeniny (Basařová et al., 2021). Nízkomolekulární látky jsou stěžejní pro metabolismus a rozmnožování kvasinek, ale také přispívají k produkci látek, které jsou zodpovědné za starou chuť piva (Basařová et al., 2021). Základní složkou ve tvorbě nebiologických zákalů jsou vysokomolekulární dusíkaté látky, které také přispívají k tvorbě prekurzorů, které můžou vytvářet látky negativně ovlivňující chuť (Basařová et al., 2021). Mezi základní zástupce proteinů v ječmeni patří albuminy, globuliny, prolaminy (hordein), gluteliny a glykoproteiny (Basařová et al., 2021). Dále jsou důležité i složené proteiny jako jsou fosfoproteiny

a lipoproteiny, které negativně ovlivňují pěnovost, chromoproteiny, které obsahují látky zodpovědné za barvu, jako jsou antokyany a chlorofyl, či nukleoproteiny obsahující dusíkaté báze (Basařová et al., 2021). Při rmutování dochází ke zvýšení podílu rozpustných dusíkatých látek oproti obsahu dusíkatých látek ve sladu, zatímco obsah aminodusíku je poloviční, tudíž při zpracování nedostatečně rozluštěného sladu nedochází k zajištění dostatečného obsahu aminodusíku pro metabolismus kvasinek (Basařová et al., 2021). Stanovení obsahu bílkovin v ječmeni je důležité z technologického hlediska, protože při vyšším obsahu bílkovin v ječmeni dochází ke snižování možného extraktu ze sladu (Kunze, 2010). V laboratoři se provádí stanovení Kjeldahlovou metodou či pomocí spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR) (Kunze, 2010). Dle normy ČSN 46 1011-18 (461011) je stanovován obsah dusíkatých látek ve sladu následovně: nejprve je dusík převeden pomocí horké kyseliny sírové a přítomnosti katalyzátoru na formu NH_4^+ iontů, které jsou vytěsněny hydroxidem sodným při destilaci do kyseliny borité a následně se dusíkaté látky stanoví acidometricky. Destilát se titruje roztokem kyseliny sírové do bodu ekvivalence (do světla růžové barvy) a to samé je provedeno se slepým vzorkem.

Dále je možné analyzovat obsah jednotlivých aminokyselin, polypeptidů i bílkovin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Anderson et al., 2019). Volné aminokyseliny obsažené v mladině jsou přijímány kvasinkami během kvašení až na jednu aminokyselinu, což je prolin, který není stravitelný kvasinkami, a tedy tvoří velkou část nízkomolekulárních dusíkatých látek, které mohou vytvářet při procesu vaření aromatické látky (Anderson et al., 2019). Pro rychlou analýzu proteinů v pivě je možné použít kapilární elektroforézu, pomocí níž je možné separovat čtyři aminokyseliny obarvené fluoresceinem za méně než 140 milisekund, tato metoda by se dala využít pro rychle se rozkládající konformery bílkovin, avšak má své nevýhody v rámci vysokých nároků na detekční systém a problémy s teplotními rozdíly uvnitř kolony, které mohou zkreslit výsledek (Anderson et al., 2019).

Mezi neškrobové sacharidy v ječném zrně patří celulózy, hemicelulózy, glykany či lignin (Basařová et al., 2021). Zpevňující složku buněčných stěn tvoří celulóza, tvořená z glukózových jednotek vázaných β -1,4 – glykosidovými vazbami, přičemž celulóza je ve vodě nerozpustná a enzymaticky i chemicky špatně štěpitelná (Kosař et al., 2000; Basařová et al. 2021). Celulóza se neúčastní a nemění během sladování a rmutování, nicméně při scezování sladiny a vyslazování mláta působí jako kypřící složka ve filtrační vrstvě mláta (Basařová et al., 2021). Vedle celulózy ječmen obsahuje další polysacharid, což je hemicelulóza, která se podílí na stavbě a pevnosti stěn buněk (Kosař et al., 2000). Je to látka neškrobová a nerozpustná ve vodě, přičemž její štěpné produkty jsou rozpustné ve vodě a nazývají se gumovité látky (Basařová et al. 2021). Gumovité látky jsou tvořeny nižšími β -glukany, které nepříznivě ovlivňují viskozitu sladiny, mladiny i piva tím, že zvýší viskozitu, nicméně β -glukany mají pozitivní vliv na pěnovost a chuť (Basařová et al., 2021). Dalším negativem těchto látek je nepříznivý vliv na extraktivnost kvůli omezenému přístupu sacharolytických enzymů při štěpení škrobu (Basařová et al., 2021). Betaglukany se dělí na rozpustné a nerozpustné podle své struktury a druhu obiloviny, přičemž nerozpustné betaglukany vytváří ve vodném prostředí zesítené agregáty gelu (Basařová et al., 2021). Při procesu sladování a rmutování se betaglukany částečně štěpí, avšak při nedokonalém rozštěpení enzymy dochází ke snížení varního výtěžku sladu, prodlouží se

doba scezování a je horší průběh filtrace, za což je zodpovědný vyšší obsah betaglukanů ve sladu (Kosař et al., 2000). Při stanovení betaglukanů je problém s rozlišením gelových a rozpustných betaglukanů, stanovení betaglukanů probíhá pomocí chemických metod jako je fluorometrie s barvivem Calcofluor za použití průtokového injekčního přístroje (Kupetz et al., 2017). U betaglukanů s vysokou molekulární hmotností jsou preferovány kolorimetrické metody (Kupetz et al., 2017). Nebo lze stanovit betaglуканы enzymovými metodami, které jsou založené na štěpení vazeb β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) glukanasou produkovanou *Bacillus subtilis*, nebo za využití celulózy z *Penicillium funiculosum* s extrakcí betaglukanů pomocí hydrazinu či kyseliny perchlorové (Basařová et al., 2021).

Tuky neboli lipidy jsou látky tvořené glycerolem a estery mastných kyselin. Do této skupiny patří mastné kyseliny, acylglyceroly, fosfolipidy, lipoproteiny a lipopolysacharidy a také steroly. Ve sladu se lipidy vyskytují ve formě olejových kapiček, které jsou uloženy v aleuronové vrstvě, slupce a semenáčku (Kunze, 2010). Během sladování dochází ke spotřebování části tuků při látkové výměně v rámci dýchání, avšak většina tuků zůstává v mlátu (Kosař et al., 2000). Lipidy v pivu mají pozitivní i negativní vliv na kvalitu piva, přičemž pozitivní vliv je spatřován při fermentaci mladiny, kdy dochází k aktivaci růstu kvasinek za anaerobních podmínek a dochází ke zrychlení a zintenzivnění fermentace, právě díky lipidům a nenasyceným mastným kyselinám (Bravi et al., 2014). Negativní vliv lipidů vězí v ovlivnění chuti a stability pěny, za vznik nežádoucí stárnoucí chuti jsou zodpovědné kyseliny linolová a linolenová (Bravi et al., 2014). Složení mastných kyselin v ječmeni je možné analyzovat plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem a kapilární kolonou (Musa et al., 2018).

Polyfenolové sloučeniny jsou látky různých fyzikálních a chemických vlastností, v pivu bylo identifikováno více než padesát fenolických sloučenin, jejichž obsah se liší v závislosti na surovinách a způsobu vaření (Carvalho et al. 2022). Jsou soustředěny převážně ve slupce a aleuronové vrstvě ječmene (Kunze, 2010). Fenolické sloučeniny v pivu jsou rozlišovány jako fenolové kyseliny (kyselina hydroxybenzoová, skořicová a fenyloctová), flavonoidy (flavanoly, flavony, flavonony, flavonoly a proanthokyanidiny) a neflavonoidy (stilbeny, chalkony, lignany a hydrolyzované tanniny) (Carvalho et al. 2022). Polyfenoly v ječmeni mají vliv na chuť, koloidní stabilitu a trvanlivost piva (Carvalho et al. 2022). Pozitivními vlastnostmi polyfenolů je oddálení stárnoucí chuti piva, schopnost vázat se s polypeptidy a jsou nápomocné při vylučování kalů z mladiny (Basařová et al., 2021). Negativními vlastnostmi polyfenolů je tvorba nebiologických zákalů ve stočeném pivu, zvyšování barvy u sladiny, mladiny a piva a možné nežádoucí účinky na chuť (Basařová et al., 2021). Polyfenolické látky mají antioxidační účinek, ale pokud jsou zoxidovány ztrácí tím své pozitivní účinky a převládají ty negativní (Kunze, 2010). Fenolické sloučeniny ječmene lze stanovit pomocí HPLC s PDA detektorem, například s mobilní fází octové kyseliny a acetonitrilu (Musa et al., 2018).

Slad obsahuje mimo jiné sírné sloučeniny v různých podobách, jako např. netěkavé látky, jež nejsou zodpovědné za zhoršené organoleptické vlastnosti, avšak jsou to prekurzory pro látky, které mohou vznikat za určitých podmínek a jsou senzory aktivní (Kosař et al., 2000). Chutě a vůně za které můžou sírné sloučeniny jsou popisované např. po dušené zelenině, zkažených vejcích, po cibuli nebo po spálené gumě, obecně se tyto chutě charakterizují jako svíravé, štiplavé, zatuchlé a plesnivé (Kosař et al., 2000). Konkrétně byly

stanoveny v pivu sloučeniny jako oxid siřičitý, thioalkoholy, sulfidy, thioestery, thiazoly či thiofeny, které mohou pocházet z pivovarských surovin, vznikat při technologické výrobě nebo jsou důsledkem bakteriální kontaminace výrobního zařízení (Kosař et al., 2000). Prekurzory dimethylsulfidu jsou S – methylmethionin a dimethylsulfoxid pocházející ze sladu, dimethylsulfid je tvořen odlišným mechanismem, S-methylmethionin se rozkládá během sušení sladu a vaření mladiny na dimethylsulfid, zatímco dimethylsulfoxid je redukován kvasinkami při fermentaci, nebo může jít o metabolit bakterií kazící mladinu (Yang et al., 1998; Kucharczyk et al., 2020). Hlavní roli v obsahu dimethylsulfidu však určuje S-methylmethionin (Yang et al., 1998). Nejvíce je tvořen neaktivní prekurzor dimethylsulfidu při klíčení, kdy je během vyšší teploty přeměňován na aktivní prekurzor, proto je snaha během klíčení a máčení přeměnit co nejméně neaktivních prekurzorů na aktivní, díky úpravě podmínek během klíčení a máčení (Kunze, 2010).

3.2.2.3 Náhražky sladů

Surogáty sladu neboli sladové náhražky jsou při výrobě piva používány z ekonomického hlediska či pro docílení určitých vlastností u konkrétních druhů piv (Olšovská et al., 2017). Dle Bogdan & Kordialik-Bogacka (2017) je až 85-90 % piv vařeno s přidavkem náhražek, nicméně procentuální použití na jednotlivých kontinentech se velmi liší, zatímco v Evropě jsou náhražky používány z 10 až 30 procent, v Americe či Austrálii je to až 50 %, v Africe dokonce až 75 %. Při výrobním procesu vaření piva je nejdražší položka právě slad, proto se využívají různé zdroje extraktu, aniž by došlo k výraznému poklesu kvality (Szwed et al., 2014). Sladové náhražky se rozdělují na škrobnaté a cukernaté surogáty, jejich použití je také ovlivněné technologickým vybavením pivovarů a jsou častěji využívány v Africe, Asii či Americe (Kosař et al., 2000). Pro snížení nákladů na použité suroviny pro výrobu sladu je nutné dbát na vhodný výběr náhražky, která by se měla vyznačovat snadným zpracováním a množstvím extraktivních látek (Szwed et al., 2014). Při jejich užití je také brán větší zřetel na jakostní požadavky, jako je aktivita proteolytických enzymů, aktivita amylas či barva sladiny (Kosař et al., 2000). V menší míře nahrazení škrobu nezpůsobí výrazné sensorické změny, avšak při větším využití surogátů dochází k poklesu barvy (Olšovská et al., 2017). Mimo sladové náhražky lze využít různé enzymové či amylasové preparáty, když je nutné upravit pH rmutu (Kosař et al., 2000).

Jako škrobové náhražky se využívají různé suroviny, které mají vysoký obsah škrobu či polysacharidů využitelných k výrobě piva (Olšovská et al., 2017). Mezi suroviny pro částečné nahrazení sladu z ječmene patří zejména surogáty z nesladových obilovin, kam se řadí pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, proso a čirok, pak také lze jako náhražku použít nesladové pseudoobiloviny jako je pohanka, amarant nebo quinoa (Bogdan & Kordialik – Bogacka, 2017; Ndife et al., 2019). Tyto náhražky mají své omezení, například kukuřičné zrno nemá slupku, která by byla nápomocná při filtraci, nebo má nižší enzymatickou aktivitu (Ndife et al., 2019). Slupka a klíček se odstraňuje, protože obsahuje vyšší množství tuku, avšak výhodou kukuřice je extraktivnost, která je podobná jako u ječmenného sladu (Kosař et al., 2000). Kukuřice je používána převážně na svrchně kvašená piva (Basařová et al., 2021). Pšenice je využívána při výrobě pšeničných sladů zvláště pro různé

pivní speciály v Belgii a Německu, výhodou pšenice je vysoká míra extraktivnosti, ale její nevýhodou je vysoký obsah lepku, který zapříčiňuje potíže při scezování a tím dochází ke snížení koloidní stability (Kosař et al., 2000 ; Basařová et al., 2021). Škrobové náhražky mohou být také v tekutém stavu ve formě hydrolyzovaných škrobových sirupů, sladových výtažků nebo sirupů z hydrolyzovaných obilovin (Bogdan & Kordialik-Bogacka, 2017).

Vedle škrobových surogátů se využívají také cukernaté náhražky, které jsou přidávány do mladiny až během chmelovaru (Kosař et al., 2000). Při surogaci cukernými náhražkami se obvykle nepřekračuje mez nahrazení 20 %, častěji je to jen 5-10 %, s ohledem na stupeň rozluštění sladu tedy stupeň rozluštění bílkovin (Basařová et al., 2021). Při nadměrné surogaci cukernými náhražkami dochází ke snížení obsahu dusíkatých a polyfenolových látek, je zvýšené prokvašení a obsah alkoholu, nebo je také ovlivněna pěnivost piva (Basařová et al., 2021). Náhražky cukru jsou v tekutém i pevném stavu, mezi nejčastější náhražky jsou krystalový cukr, cukrový kulér či cukrové sirupy (Kosař et al., 2000). Krystalový cukr se využívá v různých variantách, jako je cukr řepný či třtinový, rafinovaný a nerafinovaný, u piv takto surogovaných lze pozorovat světlejší barvu a zvýšený obsah alkoholu (Basařová et al., 2021). Cukrový kulér je připraven ze sacharózy, která je zahřívána na teplotu 180–200 °C buď za přítupu vzduchu, nebo ještě lépe ve vakuu, při použití cukrového kuléru dochází k navýšení barvy, protože má 4 - 6krát lepší barvicí schopnost než barvicí slad (Kosař et al., 2000). V neposlední řadě se využívá jako cukernatá náhražka škrobový cukr neboli cukrový sirup, nejčastěji je vyráběn z bramborového či obilného škrobu pomocí enzymové či chemické hydrolýzy minerálními kyselinami za vyšší teploty a tlaku (Basařová et al., 2021). V závislosti na surovině obsahuje cukrový sirup glukózu, maltózu, maltotriózu a další oligosacharidy v různých poměrech a také je proměnlivá zkvasitelnost sirupů v mezích od 35 do 82 % (Kosař et al., 2000). Sirupy se přidávají stejně jako krystalový cukr do mladiny při chmelovaru (Basařová et al., 2021). Nicméně díky použití cukerných přídatných látek se změní složení mladiny, což může ovlivnit růst kvasinek a jejich výkonost při kvašení (Bogdan & Kordialik-Bogacka, 2017). Díky použití cukrových náhražek se zvýší hustota mladiny a tím je ohrožené kvašení z důvodu změny podmínek důležitých pro kvasinky, kde se především jedná o naředění základních živin (Bogdan & Kordialik-Bogacka, 2017). Dle Piddocke et al., (2009) bylo zjištěno že sladina obohacená maltózou zlepšuje rychlost růstu kvasinek, fermentovatelnost mladiny nebo také lepší chuť piva než sladina obohacená glukózovým sirupem.

Mezi další látky přidávané s náhražkami sladu mohou být enzymové preparáty, protože surogáty postrádají z části nebo zcela hydrolytické enzymy, které jsou v běžném sladu zodpovědné za rozklad nerozpustných vysokomolekulárních látek na rozpustné nízkomolekulární látky (Bogdan & Kordialik-Bogacka, 2017). Pokud by při přidavku většího množství surogátu (nad 20 % u pšenice, ovsa či nesladového ječmene) nebyl použit exogenní enzymatický přípravek, mohlo by dojít k nedostatečnému rozkladu dílčích látek (škrob, bílkoviny aj.) a tím by byl snížen extrakt v mladině, a tudíž i konečný obsah alkoholu (Bogdan & Kordialik-Bogacka, 2017).

Metody pro stanovení škrobových surogátů, a především pro nesladové obiloviny se využívají metody dle EBC a jsou to metody stejné jako jsou uvedeny výše u ječmenného sladu. Jsou tedy měřeny základní chemické a fyzikální vlastnosti, a to je vlhkost, hmotnost tisíce zrn,

objemová hmotnost, sklovitost měřená pomocí farinatomu, friabilita a nerozluštěná zrna měřená pomocí frabilimetru (Blšáková et al., 2022). Dále je pak měřena rychlost filtrace, čírost mladiny, stanovení škrobu Ewersovou polarimetrickou metodou, stanovení dusíkatých látek Kjeldahlovou metodou, klíčivost či obsah β glukanu (Blšáková et al., 2022).

3.2.3 Laboratorní stanovení kvality chmelu

Třetí surovinou používanou pro výrobu piva je chmel (*Humulus lupulus L.*) z čeledi *Cannabaceae*, jde o popínavou dvoudomou rostlinu (Kunze, 2010). V pivovarnictví se používá květenství samičí rostliny obsahující hořké kyseliny a éterické oleje, které jsou žádoucí pro hořkou chuť piva (Kunze, 2010). Pro pivovarské účely je především pěstován chmel evropský, což je poddruh chmelu otáčivého a existuje mnoho odrůd tohoto chmele, jež je pěstován po celém světě (Kosař et al., 2000). Chmelová rostlina lze popsat jako kořenová soustava tvořená dřevěnou babkou, ze které vyrůstají hlavní kořeny až do hloubky šest metrů, nad půdu vyvstává réva s postranními větývkami (pazochy) a lístky s květenstvím, ze kterých vzniknou chmelové hlávky (Chládek, 2007). Hlávka je tvořena ze stopky, věténka, pravých a krycích listenů, kde na vnitřní straně listenů je produkován při zrání lupulin ve formě pryskyřičných zrněk, což je ta nejdůležitější složka pro pivovarnictví (Chládek, 2007). Z lupulinových žláz pochází aromatické složky nezbytné kvůli jejich vlivu na hořkost a aroma piva, jde především o α -hořké kyseliny (humulony) a β -hořké kyseliny (lupulony) (Tanaka et al., 2014). Nicméně chmelové šišťice také mají listeny, které hojně obsahují fenolické látky, u kterých bylo zjištěno mnoho pozitivních účinků na lidské zdraví a jejich využitelnost ve farmaceutickém průmyslu (Tanaka et al., 2014). Mimo jiné je dokázáno, že chmelové kyseliny mají významný vliv na tvorbu a stabilitu piva, tento vliv je založen na hydrofobnosti chmelových kyselin, schopnosti vázat polypeptidy, tendenci ke snižování povrchového napětí v kapalinách a schopnost navyšovat viskozitu (Roberts, 2016). Nejvíce se podílejí na tvorbě pěny Iso- α -kyseliny, právě kvůli jejich omezené rozpustnosti čímž snadněji přechází do pěny, kde jsou spojeny s polypeptidy z roztoku, dokonce i samotné α -kyseliny jsou pěnotvorné, ale pouze když jsou zpočátku rozpuštěné v pivu (Roberts, 2016).

Mezi hlavní pěstitelské oblasti patří Německo, USA, Čína či Česká republika, u nás především jde o Žateckou, Úštěckou a Tršickou oblast (Kunze, 2010). Chmel lze rozdělit na chmel hořký, což znamená, že má vysoký obsah humulonu, cohumulonu, lupulonu a kolupulonu, nebo na chmel dokončovací či aromatický (Nance & Setzer, 2011). Ke chmelení se využívají sušené hlavice chmele či chmelové produkty obsahující pouze složky chmelu (Kunze, 2010). Dnes už se přímo hlávkový chmel používá zejména při studeném chmelení, dále jsou z něj vyráběny právě chmelové produkty, jako jsou granulované chmely (pelety) či pastovité extrakty (Chládek, 2007). Důvodem pro využívání chmelových produktů je jednak zpracování méně kvalitních chmelů, dále jeho snadnější skladování, vyšší stabilita vlastností chmelu a využitelnost hořkých látek (Chládek, 2007). Chmel má pro výrobu piva nepostradatelný význam, co se týče stability piva, protože chrání pivo před škodlivými mikroorganismy nebo alespoň zpomaluje jejich neblahý vliv (Olšovská et al., 2017). Dle Andersona (2019) byly prokázány protiplísňové a antibiotické vlastnosti na různých agarech, kde byl pozorován malý nebo žádný růst mikroorganismů.

Existuje mnoho odrůd chmelu, rozdělují se podle různých ukazatelů, mezi nejčastější patří vegetační doba zrání, kdy se odrůdy dělí na rané, polorané a pozdní (Basařová et al., 2021). Nebo se odrůdy dělí podle obsahu chmelových pryskyřic, podle tohoto ukazatele se dělí na jemné aromatické chmele s nižším obsahem α -hořkých kyselin, aromatické chmele, hořké chmele a na vysokoobsažné hořké chmele vyznačující se vyšším obsahem pryskyřic, avšak s možným hrubějším aroma (Basařová et al., 2021). Jemné aromatické chmele skýtají odrůdy jako je žatecký poloraný červeňák (Saaz), Tettngang, Spalt a Lubin, pod aromatické chmele patří odrůdy jako Sládek, Cascade, Golding aj. či Hersbrucker a Hallertauer, které jsou tradiční (Basařová et al., 2021). Hořké odrůdy chmele jsou například Premiant, Bor, Northern Brewer a nakonec odrůdy vysokoobsažných chmelů jsou Magnum, Nugget, Taurus či Columbus (Basařová et al., 2021).

Obsah aromatických složek závisí na technologii, podle které je pivo připraveno a jaké chmelové přípravky byly použity, také záleží na době přidání chmelu a chmelových produktů do mladinové pánve (Brendel et al., 2019). Nejčastější využívané chmelové produkty jsou chmelové pelety, extrakty a dnes již nepříliš používané chmelové šišťice (Brendel et al., 2019). Nejčastěji je přidáván chmel do horké mladiny na začátku varu, kvůli přeměně hořkých kyselin (α -kyselin) na rozpustnější Iso – α -kyseliny, přičemž výtěžek hořkých kyselin během varu se zvyšuje, zatímco co jsou těkavé látky během varu odpařeny (Rettberg et al., 2018). Pro výraznější chmelové aroma se přidávají větší dávky v pozdějších fázích varu, buď v mladinové pánvi nebo dokonce ve whirlpoolu, což lze označit jako pozdní chmelení a výsledkem je světlejší barva piva (Rettberg et al., 2018). Profil fenolických látek při brzkém a pozdním chmelení se značně liší, například u pozdně chmelovaných piv převládají terpenové deriváty, jako jsou epoxidy, humulenu či oxidy linaloonu (Rettberg et al., 2018). Také existuje suché chmelení, kdy se chmel přidává do studeného piva, přidávají se šišky či pelety při kvašení před filtrací, jde o extrakci za studena s rozpouštědlem v podobě vodného roztoku ethanolu (Rettberg et al., 2018).

Chmelové produkty jsou široká skupina chmelových přípravků používaných místo chmelových hlávek, jde o chmelové pelety obohacené či izomerizované, nebo extrakty různým způsobem získané (Kunze, 2010). Chmelové pelety jsou vyráběny ze sušeného chmele rozemletého na prášek a jsou slisovány do tvaru pelet, v dnešní době jsou čím dál tím více populární obohacené pelety o lupulin (Kunze, 2010). Také se používají ethanolové chmelové extrakty, které můžou být čistě pryskyřičné se standardizovaným obsahem hořkých kyselin a látek, jako jsou proteiny či silice (Olšovská et al., 2017). Nebo existují extrakty dvojsložkové, což je směs ethanolového a vodného extraktu obsahující mimo jiné i polyfenoly (Olšovská et al., 2017). Existují také extrakty, které se získají extrakcí oxidem uhličitým, díky jeho nepolárním vlastnostem obsahují pouze nepolární složky chmele, a tedy hořké kyseliny a silice (Olšovská et al., 2017).

3.2.3.1 Stanovení parametrů chmele

Hodnocení kvality chmele se provádělo výhradně sensoricky před rozvojem chemických analytických metod, kdy byla hodnocena barva, lesk vyrovnanost hlávek, vůně, množství a barva lupulinu či poškození hlávek škůdci. Dodnes má v hodnocení jakosti chmele

své místo sensorická analýza (Krofta, 2008). Dnes jsou popsány analytické metody a postupy na jakostní požadavky dle metodik EBC (European Brewery Convention), ASBC (American Society of Brewing Chemists) či MEBAK (Brautechnische Analysenmethoden) či jsou popsány v našich normách. V našich normách je navíc zahrnuto nad rámec EBC a ASBC řada mechanických zkoušek, kdy se hodnotí otluky, jemnost vřeténka či těžkost hlávek (Krofta, 2008).

U chmele se provádí mechanické zkoušky, kdy je hodnoceno několik parametrů charakterizujících jejich velikost, hmotnost či tvar (Krofta, 2008). Jedná se o absolutní hmotnost sto hlávek, podíl vřetének ve hmotnosti hlávek, průměrná délka vřeténka, těžkost chmele, hustota hlávky, pravidelnost vřeténka a další, avšak v praxi jsou prováděny pouze tři tyto zkoušky (Krofta, 2008). Jedná se o obsah cizích a biologických příměsí, obsah semen a rozplevelení hlávek (Krofta, 2008). Stanovení cizích a chmelových příměsí v hlávkovém chmelu je prováděno dle norem ČSN 46 2520-4 (462520) a ČSN 46 2520-5 (462520), jde o hmotnostní podíl příměsí cizích (drátku, kamenů, provázků) či chmelových příměsí (části chmelové révy, listy aj.) vyjádřený v procentech z původního vzorku. Druhá používaná mechanická zkouška je stanovení obsahu semen v hlávkovém chmelu dle normy ČSN 46 2520-10 (462520), kde se jedná o stanovení hmotnostního podílu semen, v případě že je rostlina opylena, tvoří se v hlávkách semena, přičemž semena mohou negativně ovlivnit sensorické vlastnosti piva, kvůli obsahu lipidů (Krofta, 2008). Třetí zkouškou je rozplevelení hlávek dle normy ČSN 46 2520-6 (462520), kde jde o stanovení částí hlávek jako jsou pravé a krycí listeny, vřeténka a stopky, které se díky přesušení rozpadají a při prosévání sítím s určitou velikostí ok propadnou.

Pro stanovení kvality chmele jsou využívány také chemické analýzy popsány v metodikách EBC, ASBC či MEBAK a v českých normách. Do hodnocení kvality chmelu patří stanovení alfa kyselin, konduktometrická hodnota chmele, stanovení alfa a beta kyselin ve chmelu a chmelových extraktech metodou HPLC či spektrofotometricky (Krofta, 2008). Dále se stanovuje index skladování spektrofotometricky, stanovení obsahu a složení chmelových silic ve chmelu a chmelových extraktech, stanovení vlhkosti chmele či stanovení obsahu dusičnanů kapalinovou chromatografií aj. (Krofta, 2008).

Na nescifické stanovení obsahu α -kyselin lze použít metodu EBC 7.4, kde zároveň lze určit konduktometrickou hodnotu pomocí reakce α -kyselin s octanem olovnatým, nebo také metodu ASBC na stanovení hořkých kyselin fotometricky (Brendel et al., 2020). Pro analýzu chmelových pryskyřic (hořké kyseliny) a určení konduktometrické hodnoty platí, že jsou založené na extrakci do rozpouštědla jako je methanol či diethylether a probíhá následné měření koncentrace v rozpouštědle (Roberts, 2016 ; Brendel et al., 2020) . Koncentrace v rozpouštědle je zjišťována pomocí titrace methanolem roztokem octanu olovnatého a je změřena vodivost neboli konduktivita, v tomto měření jde o to, že alfa kyseliny se vysráží jako olovnaté soli a po jejich spotřebování dojde k nárůstu vodivosti, a to je bod ze kterého lze zjistit koncentraci alfa kyselin (Roberts, 2016). Pro stanovení hořkých kyselin je využívána HPLC, metoda je více popsána pod popisem chmelových pryskyřic ve chmelu.

Dalším kvalitativním parametrem je index skladování (HSI), který se stanovuje podle ASBC HOPS-6, přičemž tato metoda je důležitá, protože hlávkový chmel je nestabilní a v závislosti na skladování se mění složení důležitých složek, mezi nejvýznamnější projevy patří

úbytek alfa kyselin ve chmelu (Krofta, 2008). Tato metoda je založena na měření absorbance metanolového extraktu chmelu při 275 nm a poměru absorbancí měřených při 275 a 325 nm pomocí UV-VIS spektrofotometru, hodnota HSI menší než 0,35 ukazuje přijatelné meze indexu skladování, ale nad hodnotu 0,4 může index skladovatelnosti ukazovat na začátek degradace hořkých kyselin a jiných složek (Krofta, 2008; Roberts, 2016). Dle EBC 7.13 je index skladování chmele stanovován jako referenční metoda pro stárnutí chmele, protože metoda uvedena výše v textu nevyjadřuje přímo informace o kvalitě chmelu, proto znamením stárnutí aromatických sloučenin je epoxidová frakce (karyofylen, humulen) a analýza probíhá ve vztahu k neepoxidovaným formám, avšak tento postup je časově náročný na přípravu a stanovení probíhá na plynovém chromatografu (Brendel et al., 2020).

Stanovení vlhkosti chmele je podstatný faktor, protože při vyšší vlhkosti chmele může dojít k mikrobiální aktivitě, která může zhoršit kvalitu klíčových složek chmele (Roberts, 2016). Vyšší obsah vody nad 15 % zvyšuje riziko zapaření chmele, a tudíž jeho znehodnocení, či dokonce samovznícení, nicméně i při nízkém obsahu vody pod 6 % se kvalita chmelu snižuje, protože chmelová hlávka je křehká a při manipulaci se rozpadá, což je nežádoucí (Krofta, 2008). Optimální obsah vody v sušeném chmelu je 10 až 11 % hmotnostních, norma, která popisuje tuto zkoušku je ČSN 46 2520-3 (462520) a stanovení vlhkosti ve vzorku je provedeno tak, že je stanovené množství vzorku mletého chmele usušeno za daných podmínek a z rozdílů hmotnosti před a po sušení je vypočítán obsah vlhkosti ve vzorku.

Nežádoucí a cizorodé látky ve chmelu jsou také součástí hodnocení kvality chmele, protože chmel může obsahovat různé exogenní složky, jako jsou těžké kovy, rezidua pesticidů, viry, a především obsah dusičnanů, jež se můžou mikrobiální redukcí přeměnit na dusitany a následně vytvořit karcinogenní N-nitrosoaminy (Krofta, 2008). Stanovení dusičnanů je založeno na určení množství dusičnanových iontů, které přejdou do roztoku během patnácti minutového varu chmele s destilovanou vodou, následně se roztok naředí a koncentrace dusičnanů je měřena pomocí kapalinové chromatografie s přímou detekcí při vlnové délce 205 nm (Krofta, 2008). Stanovení reziduí pesticidů nemá sjednocený postup, protože záleží na povaze účinné látky i přes to však existují multireziduální metody, obecně však lze tento proces rozdělit na tři fáze a tím je extrakce účinné látky, oddělení balastních látek a čištění extraktu a následné analytické stanovení (Krofta, 2008).

3.2.3.2 Chemické složení chmelu a jeho stanovení

Na chemické složení chmele (viz tabulka č. 4) má vliv několik faktorů jako je odrůda, ročník, posklizňová úprava či z jaké oblasti chmel pochází, (Kosař et al., 2000). Mezi nejdůležitější složky chmelu patří chmelové pryskyřice zodpovědné za hořkou chuť piva, silice způsobující příjemné chmelové aroma piva a polyfenoly díky nimž je pivo chráněno před předčasným stárnutím, protože mají antioxidační účinky (Olšovská et al., 2017). Chmel také obsahuje látky nepříznivě ovlivňující technologii procesu výroby piva, zejména se jedná o dusičnany, rezidua postřiků, mohou se vyskytovat těžké kovy nebo rezidua chemických katalyzátorů (Kosař et al., 2000). Proto je důležité při nákupu hlávkového chmelu stanovovat jakostní parametry subjektivně jako je vůně, barva a lesk hlávek, nebo objektivně jako je

posouzení obsahu cizích a přirozených příměsí, napadení škůdci či obsah otlučených hlávek (Kosař et al., 2000). Chmel také obsahuje fenolické sloučeniny zejména flavonoidy což jsou sekundární metabolity (Tronina et al., 2020). Bylo zjištěno pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy, že chmel obsahuje okolo 14 % fenolických kyselin, flavonoidů, proanthokyanidinů, flavanonů nebo katechinů (Tronina et al., 2020). Tradiční metoda pro stanovení kvality chmelu dle ASBC je prováděna pomocí destilace vodní parou (Lamberti et al., 2021). Metody pro získání těkavých látek z chmelu je také destilace vodní parou, hydrodestilace, macerace a adsorpce, avšak tyto metody jsou náročné jak energeticky, tak časově z důvodu větších množství úprav před samotnou extrakcí či materiálově z pohledu spotřeby vody nebo organických rozpouštědel, pomocí nichž se těkavé látky extrahují (Lamberti et al., 2021). Pro získání těkavých látek z chmelu byla vyvinuta metoda mikrovlnná, ultrazvuková, superkritická a subkritická fluidní extrakce se šetrnějšími rozpouštědly k životnímu prostředí, přičemž v několika studiích se využilo superkritického oxidu uhličitého kvůli své zvláštní polaritě a viskozitě, díky níž dochází k extrakci α -kyseliny a lipofilní frakce, avšak výsledný produkt obsahuje více sloučenin než jen těkavé látky (Lamberti et al., 2021). Tato metoda je specifická v tom, že je snaha o regeneraci těkavých látek ve chmelu a díky ní je výsledný produkt stabilní a může být využit v procesu vaření piva, avšak zatím jde pouze o akademickou laboratorní metodu, která není převedena do průmyslu (Lamberti et al., 2021). Tudiž dále jsou uvedeny klasické a modernější metody pro stanovení jednotlivých složek chmelu.

Látka	Obsah [%]
voda	8 – 12
celkové pryskyřice	15 – 20
polyfenolové látky	2 – 6
silice	0,2 – 2,5
vosky a lipidy	1 – 3
dusíkaté látky	12 – 15
sacharidické látky (celulosa)	40 – 50
minerální látky	6 – 8

Tabulka č. 4 Průměrné chemické složení chmele (Kosař et al., 2000).

Chmelové pryskyřice zahrnují složky jako jsou měkké chmelové pryskyřice, sem jsou řazené specifické α -hořké kyseliny a β -hořké kyseliny, dále pak nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice (Basařová et al., 2021). Chmelové α -hořké kyseliny se skládají z hlavních složek a to humulonu, kohumulonu, adhumulonu a dvou vedlejších látek posthumulonu a prehumulonu a β -hořké kyseliny jsou tvořené lupulonem, kolupolonem a adlupolonem a vedlejšími složkami postlupulonem a prelupulonem (Hrnčíč et al., 2019). Ve vodě jsou téměř nerozpustné α -hořké kyseliny, protože jde o slabé kyseliny, a tudíž obtížně disociují, avšak při varu ve slabě kyselém prostředí tedy při varu sladiny dochází k izomeraci za vzniku Iso – α -hořkých kyselin, které již disponují lepší rozpustností a vykazují silnou senzoryckou hořkost (Kosař et al., 2000 ; Basařová et al., 2021). Při izomeraci Iso – α -hořkých kyselin vznikají trans a cis-Iso– α -hořké kyseliny, v pivu jsou obsaženy v rozmezí od 10 do 100 mg/l (Jaskula et al., 2007). Iso – α – hořké kyseliny jsou podstatné pro vznik a stabilitu pěny, protože utváří spolu s bílkovinami a kationty dvojmocných kovů povrch bublinek pěny, jejíž pružnost zabraňuje předčasnému opadnutí pívni pěny (Kosař et al., 2000). β -hořké kyseliny jsou druhou

nejvíce zastoupenou frakcí, avšak nemají tak velký význam jako α -hořké kyseliny, jsou jen velmi málo přeměňovány při chmelovaru na hlučiny rozpustné v mladině (Kosař et al., 2000). Avšak některé studie dokázaly, že β -hořké kyseliny ve srovnání s α -hořkými kyselinami mají vyšší antimikrobiální účinek (Hrnčíč et al., 2019). Také mikrobiální účinek spolu s hořkými kyselinami mají i jejich izomerizované formy (Roberts, 2016). Jejich účinek působí především na grampozitivní bakterie jako je *Acetobacter*, *Lactobacillus* a *Pediococcus* (Roberts, 2016). Jednotky hořkosti (IBU) dle EBC či ASBC značí obsah neizomerizovaných α -kyselin, ačkoliv tyto látky nepřispívají ke vnímané hořkosti (Roberts, 2016). Lze tuto jednotku hořkosti vnímat jako množství hořkosti, kterou pivovarníci můžou očekávat v pivu a je vyjádřena v miligramech Iso- α -kyselin na litr piva (Oladokun et al., 2017).

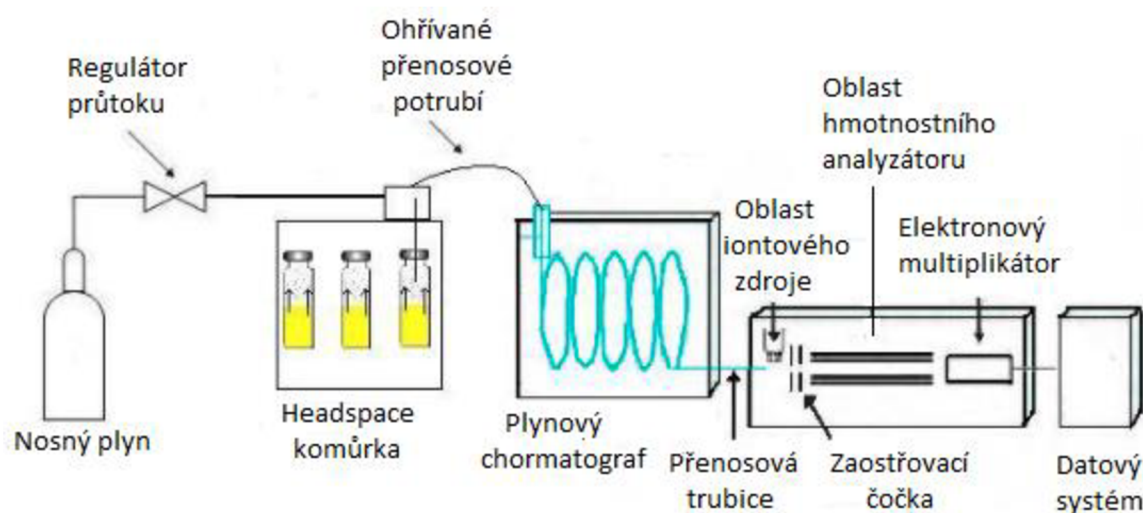
Metoda pro stanovení hořkých látek v pivu je spektrofotometrie v UV, při vlnové délce 275 nm je měřena absorpce izooktanového extraktu v okyseleném vzorku piva, avšak nevýhodou této metody je její nespecifita, protože vedle Iso – α -hořkých kyselin jsou měřeny i další látky, jako jsou polyfenoly, které mohou zkreslovat konečný výsledek a nesouvisí s hořkostí (Jaskula et al., 2007; Oladokun et al., 2017). Proto jsou proměřovány navíc u vzorku vlnové délky 325 nm pro alfa kyseliny a 355 nm pro beta kyseliny a výše uvedená vlnová délka (275nm) je pro alfa i beta kyseliny, ale tato metoda je rozšířena především v USA, kde je popsána v metodice ASBC jako Hops-6 a je určena pro čerstvé chmele (Krofta, 2008). Tudíž je využívána pro kvalitativní stanovení metoda EBC 7.7 vysokoučinná kapalinná chromatografie (HPLC), konkrétně extrakce kapalina-kapalina, při níž se stanovují najednou α – kyseliny a β -kyseliny a jejich analogy, měření je založené na chromatografickém dělení chmelových pryskyřic získaných extrakcí a následné detekce jednotlivých složek pomocí diodového pole či hmotnostní spektrofotometrie (Krofta, 2008; Brendel et al., 2020). Avšak i tato metoda má nevýhody, protože již dříve bylo zjištěno, že je při HPLC problém interakce Iso – α -kyselin s kyselinami a stopovými prvky, což vede ke špatnému rozlišení či výtěžnosti, a tudíž je vhodné používat důkladně demineralizované kolony (Jaskula et al., 2007).

Druhou složkou chmelu po pryskyřicích jsou chmelové silice, jejichž vlastnosti jsou ovlivněné odrudou, kterých existuje celá škála, dále se odlišují sensorickými vlastnostmi ovlivněné zeměpisnou polohou i klimatickými podmínkami (Anderson et al., 2019). Chmelové silice se rozdělují na uhlovodíkovou frakci, kyslíkatou frakci a frakci sirných sloučenin (Basařová et al., 2021). Uhlíková frakce je nejvíce zastoupenou složkou (70-80 %), je tvořena alifatickými uhlovodíky (pentan, isopren aj.), také monoterpeny (myrcen, β -karyofylen aj.) či seskviterpeny (α -humulen, β -farnesen) a mnoho dalších sloučenin, u těchto složek záleží na vzájemném poměru monoterpenů a seskviterpenů, které udávají výsledné aroma (Basařová et al., 2021). Přestože je uhlíková frakce původcem aroma chmele, těkavé látky z této frakce vytěkají během chmelovaru a přecházejí do mladiny minimálně, zatímco těkavé látky z kyslíkaté frakce jsou rozpustnější, a tím se dostanou do piva a společně s kvasnými produkty utvářejí pивní aroma (Kosař et al., 2000). Nejvíce aromatické látky jsou linaloon a myrcen, linaloon je primární původce chmelové chuti a jde o terpenický alkohol vonící po bergamotu a citrusech, zatímco myrcen je nejsilnější těkavá látka a spíše negativně ovlivňuje aroma piva, protože jeho koncentrace je pod sensorickou prahovou hodnotou, což je důsledek jeho odpařování během vaření mladiny (Aberl & Coelhan, 2012).

Pro analýzu silic se využívá převážně plynová chromatografie (GC) s hmotnostní spektrofotometrií (MS), nebo s plamenoionizační detekcí (FID) (Rettberg et al., 2018). K tomuto měření se využívají různé extrakční či koncentrační metody. Do těchto metod patří destilace vodní parou, extrakce organickými rozpouštědly či kapalným oxidem uhličitým, nebo sorpční extrakce, avšak většina těchto metod je náročná na přípravu vzorků i zpracování (Anderson et al., 2019). Především během extrakce se mohou vylouhovat netěkavé zbytky s esenciálními oleji, které mohou negativně ovlivnit plynový chromatograf (Anderson et al., 2019). Sice plynová chromatografie v kombinaci hmotnostní spektrofotometrií má nejširší mez použitelnosti v detekci chemických sloučenin, ale není schopna rozlišit izomerní či labilní sloučeniny (Anderson et al., 2019). Proto se v poslední době začíná využívat metoda headspace (HS)-trap jehož schéma je na Obrázku č. 2, díky níž se zkrátí doba přípravy vzorku, zamezí se nadměrným ztrátám analytu a také limity pro detekování jsou sníženy (Aberl & Coelhan, 2012; Anderson et al., 2019). Princip této metody spočívá v zahřátí vzorku uvnitř uzavřené vialky (uzavíratelné lahvičky), dokud není ustanovena rovnováha, poté je použit nosný plyn, který natlakuje obsah vialky (Aberl & Coelhan, 2012). K posunu rovnováhy se využívá třepání, míchání či zahřívání a tím rychleji dojde k nasycení plynné fáze (Rettberg et al., 2018). Následně je ochlazená část nosiče s adsorbentem naplněná extrahovanými párami ze vzorku, po dokončení extrakce par je do zařízení přiveden nosný plyn, který projde nosičem se vzorkem a tím odstraní vlhkost ze vzorku (Aberl & Coelhan, 2012). Poslední krok je tepelná desorpce a transport pomocí nosného plynu do kolony plynového chromatografu a hmotnostního spektrofotometru (Aberl & Coelhan, 2012). Pomocí této metody je možné rozlišit odrůdy chmele, a tudíž se usnadní výběr odrůdy pro konkrétní vařené pivo, přičemž silice byly rozlišeny pomocí kalibračních křivek, které jsou specifické pro daný analyt (Anderson et al., 2019). Avšak tuto analýzu omezuje nedostatečná citlivost především na těkavé látky v nízkých koncentracích nebo s vysokým bodem varu, tudíž je Headspace s plynovou chromatografií omezena na analýzu hojně zastoupených těkavých sloučenin (Rettberg et al., 2018). Tudíž pro lepší a šetrnější separaci těkavých látek lze použít mikroextrakci tuhou fází, kde je využíván adsorbent ve tvaru tyčinky a působí na něj headspace nad vzorkem čímž se zvýší citlivost 10 až 20krát v porovnání s použitím pouze headspace s plynovou chromatografií (Rettberg et al., 2018). Problém u této metody je menší účinnost u analýzy pevných vzorků chmelu, proto je spíše tato metoda využívána pro stanovení těkavých látek v kapalných vzorcích tedy pivo (Rettberg et al., 2018). Alternativou pro analýzu terpenů místo plynové chromatografie je vakuová ultrafialová spektroskopie, jež měří absorpci v rozsahu 120-240 nm, největší výhodou je, že všechny těkavé látky absorbují v tomto rozmezí a vykazují specifická absorpční spektra, díky nimž lze provést kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení (Anderson et al., 2019).

Obrázek č. 2 Schéma Headspace-trap metoda v kombinaci s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrofotometrií

(Dostupné z: <https://food.au.dk/foodhay/instruments/food-biophysics-platform/food-biophysics-lab/gcms-headspace/>)



Polyfenoly jsou třetí složkou chmele, lze je popsat jako sekundární metabolity rostlin a obvykle se dělí na skupiny flavonoly, flavan-3-oly, fenolové karboxylové kyseliny, což jsou deriváty kyseliny benzoové či skořicové, a další látky jako jsou prenylflavonoidy či stilbenoidy (Mikyška et al., 2022). Ve chmelu se vyskytuje 2-5 % polyfenolů v sušině (Kunze, 2010). Polyfenoly vykazují důležitou roli v obraně rostliny proti stresu různého původu, jako jsou reaktivní formy kyslíku a dusíku, UV záření, různé patogeny či paraziti (Brglez et al., 2016). Další pozitivní vlastnost fenolických látek je podpora tvorby lomu při chmelovaru, také podpora při odlučování kalů, protože dochází ke snižování obsahu fenolických látek z důvodu vysrážení komplexů tříslovin s bílkovinami během chlazení a kvašení (Basařová et al. 2021; Mikyška et al., 2022). Také bylo dokázáno, že polyfenoly přispívají k hořkosti piva zvláště v přítomnosti isohumulonů (Hahn et al., 2018). Avšak chmelové polyfenoly mohou mít i negativní význam, za což jsou zodpovědné oxidační a kondenzační reakce, díky nimž je horší výsledná kvalita piva, především co se týče barvy, zákalu a chuti piva (Basařová et al. 2021). U odrůd jemných aromatických chmelů byla zjištěna vyšší hladina polyfenolů, konkrétně u odrůdy žatecký poloraný červeňák než u jiných vysokoobsažných odrůd chmelu, zároveň nízký obsah fenolických látek vykazují chmelové přípravky a jednosložkové extrakty získané pomocí extrakce superkritickým oxidem uhličitým (Basařová et al. 2021).

Nebo je možné polyfenoly rozdělit dle jejich molekulové hmotnosti, protože to definuje jejich vlastnosti (Jaskula-Goiris et al., 2014). Nízkomolekulární fenolické látky jsou silné antioxidanty a zároveň se podílejí na redukující schopnosti polyfenolů v pivu, čímž zabraňují oxidaci piva a jeho poškození, také zlepšují chuťovou stabilitu (Jaskula-Goiris et al., 2014). Naopak polyfenoly s vyšší molekulovou hmotností přispívají ke změně barvy a tvorbě zákalu, jde především o proanthokyany, které se také mohou označovat jako tanoidy

(Jaskula – Goiris et al., 2014). Fenolické látky se běžně vyskytují i v jiných rostlinách, avšak skupina prenylflavonoidů a multifidolových glykosidů jsou v určitém množství obsaženy pouze v chmelu, také jsou vylučovány z lupulinové žlázy společně s hořkými kyselinami a těkavými oleji (Hrnčíč et al., 2019).

Mezi důležité prenylflavonoidy patří 8 - prenylnaringerin a 6 – prenylnaringerin, což jsou silné fytoestrogeny, nebo také izomery xanthohumolu (Hrnčíč et al., 2019). Druhými nejvíce zastoupenými látkami ve chmelových šišticích jsou flavanoly neboli katechiny a jejich polymery, proanthokyanidiny či kondenzované trísloviny (taniny) (Hrnčíč et al., 2019). Třetí skupinou jsou flavonoly, mezi které patří kvercetin a kaempferol (Hrnčíč et al., 2019). Jednotlivé fenolické sloučeniny mají odlišnou chemickou strukturu, a tudíž různé vlastnosti jako je reaktivita v rámci antioxidačních, antiradikálových a chelatačních schopností (Mikyška et al., 2022).

Polyfenoly v pivu lze analyzovat pomocí různých detektorů jako jsou coulometrické, elektrochemické a fotodiodové soustavy, či spektrometrie UV a hmotnostní spektrometrie ve viditelných spektrech (Hrnčíč et al., 2019). Pro kvantitativní analýzu prenylflavonoidů lze využít kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrofotometrií (Hrnčíč et al., 2019). Dle Hrnčíče (2019) na základě použití těchto metod bylo zjištěno mnoho fenolických sloučenin například hexosidy, pentosidy, chininové sloučeniny či konjugáty jako je kyselina feruloylchinová, kyselina kumarová-O-hexosid, katechin-O-dihexosid a mnoho dalších. Analýzu fenolických kyselin je také možné provést pomocí HPLC-UV (Oladokun et al., 2017). V další studii jsou uvedené metody pro komplexní separaci a strukturální analýzu fenolických látek, jde o kapalinovou chromatografii v různých variantách použitou k separaci (Tanaka et al., 2014). Pro separaci byla použita sekvenční kapalinová chromatografie ve třech až čtyřech krocích. Nejprve je použita vysokorychlostní protiproudá chromatografie, následně hydrofilní interakční chromatografie, kde se použije amid, třetí fáze je kapalná chromatografie s obrácenou fází s použitím oktadecylsilylové kolony či fenolová kolona, když nebyla úspěšná předchozí separace (Tanaka et al., 2014). Dle ASBC Beer-35 lze stanovit celkový obsah polyfenolů, metoda spočívá v reakci polyfenolů s železnatým iontem v alkalickém roztoku a následné měření absorbance při 600 nm, naměřená absorbance je vynásobena číslem 820, čímž je získán celkový obsah polyfenolů v pivu (Oladokun et al., 2017).

Složka zastoupená v sušině chmelu z 12 až 15 % jsou dusíkaté látky, z nichž 30 až 50 % přechází do hotového piva, avšak pro výrobu piva nemají větší význam (Kunze, 2010). Množství dusíkatých látek ve chmelu závisí především na odrůdě a podmínkách, při růstu a sklizni (Basařová et al. 2021). Usušené chmelové šišťice také obsahují v malých množstvích sacharidy a lipidy, avšak nemají žádný větší význam v technologii piva, o obsahu většího množství lipidů ve chmelu se jedná pouze v případě použití oplodněných šišek s větším počtem semen a tam se již může projevit negativní vliv na sensorické vlastnosti piva (Basařová et al., 2021).

3.2.4 Laboratorní stanovení kvality kvasinek

Kvasinky jsou jednobuněčný organismus, který se rozmnožuje pučením, a tedy nepohlavním rozmnožováním. Jde o fakultativně anaerobní organismus, tudíž může přežívat v aerobním i anaerobním prostředí, nicméně rod *Saccharomyces cerevisiae* v aerobním prostředí nevyužívá respirační aparát pro metabolismus sacharidů, ale produkuje ethanol a další látky přes pyruvát (Parapouli et al., 2020). Díky produkci a akumulaci vytvořeného ethanolu, který je pro většinu mikroorganismů toxický nebo statický, kvasinky zastaví ostatní mikrobiální druhy před využitím cukru, poté pokračují ve spotřebě vytvořeného ethanolu a tím podporují svůj vlastní růst (Parapouli et al., 2020). Kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* mají i další důležité vlastnosti, jako je odolnost vůči vysokým koncentracím sacharidů a vůči produkci aromatických těkavých sloučenin (Parapouli et al., 2020).

Během výroby piva jsou kvasinky nezbytné, protože přeměňují sacharidy obsažené v mladině na alkohol a oxid uhličitý, ale také jsou původcem syntetizujícím klíčové sloučeniny pro chuť a charakter piva (Canonico et al., 2014; Krogerus et al., 2017). Mezi tyto metabolity kvasinek se řadí vyšší alkoholy, organické kyseliny, estery, aldehydy a ketony nebo také sloučeniny síry (Buiatti, 2009). Rozmnožování kvasinek pro zaočkování mladiny probíhá tak, že vybraný kmen je rozmnožován pro získání dostatečného počtu buněk bez kontaminantů a ve vhodném fyziologickém stavu (Lodolo et al., 2008). Pro množení kvasinek je nezbytné zajistit příznivé podmínky pro růst, mezi něž patří dostatečný přísun kyslíku a také dostatek živin, jako jsou aminokyseliny, sacharidy, vitamíny a anorganické ionty (Lodolo et al., 2008). Samotné množení v laboratoři probíhá převedením kvasničné kultury např. ze šikmého agaru, který se převádí do 15 ml, následně je převeden do 200 ml a závěr pomnožování kvasinek probíhá v Carlsbergově baňce (Lodolo et al., 2008). V pivovarech je běžná praxe, že se kvasinky použijí opakovaně, nejčastěji čtyřikrát až šestkrát, kde z jednoho kvašení jsou odebírány kvasinky pro kvašení další a po vyčerpání se zakládá nový zákvas pomocí zamražených kultur (Buiatti, 2009; Gallone et al., 2018). Kvasné dávky se nejčastěji pohybují od 10 do 25 milionů buněk na 1 mililitr (Buiatti, 2009).

Kvasinky se rozdělují v závislosti na použití pro spodně a svrchně kvašené pivo, druh kvasinek pro spodní kvašení je *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis* a pro svrchní kvašení jsou využívány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*. (Kosař et al., 2000). Kvasinky se mimo jiné můžou dělit na pivovarské a ležácké, pod pivovarské patří většina kmenů *Saccharomyces cerevisiae*, ke kvasinkám ležáckým patří kmeny *Saccharomyces pastorianus* (synonymum pro *Saccharomyces carlsbergensis*), což jsou mezidruhově hybridy *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces eubayanus* (Gibson et al., 2017). Rozdíl mezi kmeny kvasinek je převážně v teplotách, při kterých kvasí, kdy kvasnice pro svrchní kvašení mají ideální teplotu mezi 18 až 22 °C, zatímco kvasnice pro spodní kvašení potřebují ideálně 8–15 °C (Stewart et al., 2013). Právě ležácké kvasinky jsou jedním z nejdůležitějších průmyslových organismů, protože díky nim je produkována světová výroba ležáckého piva, je to dáno kombinací vlastností jako je využití maltotriózy a tolerance vůči nízkým teplotám (Krogerus et al., 2017). Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopny přijímat a fermentovat různé sacharidy, jde o sacharózu, glukózu, fruktózu, galaktózu, manózu, maltózu a také maltotriózu přibližně v tomto pořadí nebo prioritně (Stewart et al., 2013). Dle Krogerus et al.

(2017) mají různé kmeny ležáckých kvasinek různé využití sacharidů, například *Saccharomyces cerevisiae* umí využívat maltózu i maltotriózu zatímco *Saccharomyces eubayanus* pravděpodobně využívá pouze maltózu. I další kmeny a podskupiny mají rozdílné využití cukrů, které může být způsobeno hybridizací mezi kmeny, a tudíž můžou mít jednotlivé kmeny různé geny pro využití maltotriózy (Krogerus et al., 2017).

3.2.4.1 Stanovení parametrů kvasinek

Využití čistých specifických kmenů kvasinek je základem pivovarského průmyslu, z důvodu minimalizace rizika mikrobiální kontaminace, je také zárukou stabilního kvasného procesu, a tedy i výsledné kvality piva (Pham et al., 2011). Obecně jsou požadavky na přijatelný kmen charakterizovány jako zajišťující dostatečnou kvalitu hotového piva, musí být schopné metabolizovat látky z mladiny a je nutné, aby kvasinky byly schopné snášet dané podmínky (osmotická a ethanolová tolerance) (Stewart et al., 2013). Dalšími požadavky je schopnost odstranění kvasinek z fermentované mladiny pomocí flokulace, odstředěním nebo filtrací a je nutné, aby měly pozitivní vliv na chuť piva (Stewart et al., 2013). Kvalita kultivačních kvasinek je dána mikrobiologickým stavem, zda jsou bez kontaminantů, dále rozlišením kultury (fingerprinting), nebo hodnocení viability a vitality (Lodolo et al., 2008).

Prvním ukazatelem důležitým pro pivovar je mikrobiologický stav kvasinkových kultur, protože může dojít k narušení kvality výsledného piva i potížím během výroby (Pham et al., 2011). Proto je zjišťována přítomnost divokých kvasinek vyskytujících se během pivovarského procesu, jedná se o všechny jiné kvasinky mimo vybraný kmen kvasinek (Pham et al., 2011). Nicméně v dnešní době jsou v některých pivovarech využívány i divoké kmeny kvasinek pro jejich specifický přínos finálnímu produktu (Gibson et al., 2020). Divoké kvasinky mohou být jiného rodu než *Saccharomyces*, jiného druhu kvasinek *Saccharomyces*, nebo dokonce jiného výrobního kmenu, než je využit v určitém kvasném procesu (Pham et al., 2011). Zajištění kvasnicových kultur bez divokých kvasinek je velmi důležité, z důvodu možné přítomnosti takzvaných zabíjáčkových kvasinek, které jsou schopné zcela nahradit pivovarské kvasinky díky produkci toxinů (killer-faktory, zymociny), jež usmrtí citlivější kmeny pivovarských kvasinek, nebo způsobí technologické problémy, díky vysoké úrovni zákalu (Pham et al., 2011; Basařová et al. 2021). Divoké kvasničné buňky nejsou zpravidla identifikovány druhově při mikrobiologické kontrole v pivovaru, spíše je snaha detekovat a oddělit pivovarské a divoké kvasinky (Pham et al., 2011). Metody využívané pro detekci divokých kvasinek jsou založené na morfologických znacích a fyziologických schopnostech, proto jsou diferencovány pomocí kultivace na různých selektivních médiích obvykle při 37 °C např. lysin, medium s aktidionem, medium s krystalovou violetí, médium CLEN a další (Pham et al., 2011).

Rozlišení kvasinkové kultury se v minulosti stanovovalo pomocí biochemických metod založených na DNA nicméně metody neposkytovaly dostatečné rozlišení mezi kvasinkovými rody, také se identifikovaly kultury dle fenotypu a pomocí molekulárních testů, avšak obojí bylo náročné jak časově, tak i finančně (Anderson et al., 2019). Pro snadnější provedení může být použita MALDI-TOF-MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za

účasti matrice s průletovým analyzátořem), která je založena na generování proteinových fingerprints („otisků“) (Anderson et al., 2019). Následně se proteinové fingerprints porovnávají s referenčními spektry z databáze, kde jsou zaneseny spektra běžných pivovarských kvasinek, díky tomuto porovnání je možné zařadit kvasinky pro svrchní a spodní kvašení, nebo také rozlišit kmeny, které můžou způsobit kažení piva (Anderson et al., 2019).

Viabilita je často považovaná za podíl živých buněk a vitalita za fyziologický stav kvasinkové kultury (Košin et al., 2007). Vitalita a viabilita (počet živých buněk) je charakterizována jako schopnost buněk rozmnožovat se a růst, nebo jako schopnost rychle zahájit metabolismus po přechodu do prostředí bohatého na živiny z prostředí, kde je obsah živin nízký (Lodolo et al., 2008). Testy pro zjišťování viability jsou založené na barvení methylenovou modří nebo methylenovou violetí s pozorováním pod mikroskopem ve viditelné oblasti, nebo pomocí fluorescenčních metod, kde se využívá například fluorescenční barvivo hořečnatá sůl 1- anilino- 8- naftalensulfonová kyselina (MgANS) (Lodolo et al., 2008). Při barvení methylenovou modří jsou živé buňky neobarveny, zatímco mrtvé buňky se obarví, je to z důvodu nepoškozené membrány živých buněk, které mají schopnost zadržet nebo redukovat molekuly barviv kdežto membrány mrtvých buněk jsou poškozeny a tuto schopnost ztratily (Kwolek-Mirek & Zadrąg-Tecza, 2014; Basařová et al. 2021). Účinnost barvení methylenovou modří byla zpochybněna, a proto se začalo používat barvení methylenovou violetí pro lepší reprodukovatelnost, přesnější výsledky, lepší determinaci a třídění živých a neživých kvasinek (Basařová et al. 2021). U fluorescenčního barvení jsou využívány dva principy, buď je využita enzymová aktivita kvasnic k rozštěpení barviva, čímž je uvolněno fluoreskující záření, nebo je barvivo navázáno na buněčné struktury, a poté pozorováno přes fluorescenční mikroskop nebo průtokový cytometr (Basařová et al. 2021). K první skupině patří fluorescenční barviva jako diacetát fluoresceinu a karboxyfluoresceinu, k druhé skupině se řadí anilinová modř, akridinová oranž, bromkresolový purpur, calcofluor, 1-anilino-8-naftalensulfonová kyselina, jež jsou doporučovány EBC (Košin et al., 2007; Basařová et al. 2021). Automatizované systémy využívají průtokový cytometr, který dokáže rychle spočítat kvasničné buňky za průchodu detektorem, kam je nasměřován laserový paprsek, jež napomáhá detekovat buněčné složky pomocí fluorescenčních sond, avšak tyto systémy jsou finančně i pracovně náročné (Lodolo et al., 2008; Saldi et al., 2014). V pivovarech jsou rozšířené spíše tyto metody než kultivační, protože je podstatná nenáročnost provedení a rychle získané výsledky, což obecně platí pro většinu analytických metod využívaných v pivovarských provozech (Košin et al., 2007).

Metody uvedené výše informují pouze o živých a mrtvých buňkách, ale ne o poškozených buňkách, které nemusí být schopné dělit se, proto jsou zkoumány fyziologické schopnosti buněk neboli vitalita (Kwolek-Mirek & Zadrąg-Tecza, 2014). Vitalita je zjistitelná mnoha metodami, které se dělí do tří kategorií (Kwolek-Mirek & Zadrąg-Tecza, 2014). V první kategorii se jedná o stanovení buněčného obsahu ATP na základě reakce s luciferinem, ve druhé kategorii jde o stanovení mitochondriálního membránového potenciálu díky barvení rhodaminem a ve třetí se stanovuje aktivita různých enzymů (Kwolek-Mirek & Zadrąg-Tecza, 2014). Vedle toho se také může stanovat obsah komponent

uvnitř buňky, např. glykogen, trehalóza, steroly, nenasycené a nasycené mastné kyseliny (Košin et al., 2007).

3.2.5 Laboratorní stanovení kvality piva

Na konečné kvalitě piva mají podíl všechny pivovarské suroviny a možné přidané látky, proto je kladen takový důraz na jejich kvalitu. Analýza kvality piva je tedy rozdělena do tří částí, a to na senzorickou, mikrobiologickou a fyzikálně-chemickou analýzu (Kunze, 2010). Pivo se vyznačuje nižším obsahem alkoholu (3,5-5 %) krom některých druhů piv belgických (Trappist, Barley wine aj.), dále nízkým pH (4,3-4,7), nízkým obsahem kyslíku, ale vyšším obsahem oxidu uhličitého nebo obsahem hořkých chmelových kyselin (Kim et al., 2015).

3.2.5.1 Stanovení parametrů hotového piva

Jakostní znaky piva se dělí na vizuální, senzorické a kvalitativní (Lukinac et al., 2019). Jako první si spotřebitel všímá vizuální stránky, proto je vhodné brát v potaz i vzhled produktu, jakou má pивní pěna trvanlivost, jaká je barva piva nebo čirost (Lukinac et al., 2019). Analýzy pro stanovení kvality piva používané po celém světě jsou metody Institutu pivovarnictví a lihovarnictví (IBD), Americké společnosti pivovarských chemiků (ASBC), European Brewery Convention (EBC) a Středoevropské komise pro analýzu pivovarnictví (MEBAK) (Lukinac et al., 2019). Mezi hlavní kvalitativní parametry zkoumané v hotovém pivu patří obsah alkoholu, pH, barva, zákal, hořkost v jednotkách IBU, obsah kyslíku a oxidu uhličitého a stabilita pěny, metody jsou prováděné dle EBC. Dalším zjišťovaným parametrem je extrakt skutečný a zdánlivý. Sensorickou analýzou se posuzují vůně či přítomnost nežádoucích pachů a aroma (Lukinac et al., 2019).

Senzorická analýza piva

Za senzorické vlastnosti piva jsou zodpovědné suroviny a také způsob vaření piva, slad je hlavní složkou tvořící chuť a barvu piva, krom toho pivo obsahuje dalších 800 aromatických látek tvořících celkovou chuť (Andrés-Iglesias et al., 2015). Vedle analytických instrumentálních metod jsou neinstrumentální metody nezastupitelné, protože vedle rychlosti stanovení a nenáročnosti především finanční je možné určit celkový vjem i jednotlivé chuťové parametry piva, které jsou pro konzumenta podstatné a instrumentální metody je nedokážou přesně rozklíčovat. Sensorická analýza u piva je využívána k posouzení chutí a vůní jako celku, dále je úkolem posuzování, zda hotový produkt vyhovuje očekávanému charakteru piva a je celkově vyvážený. V pivovarech se senzorická analýza používá především ke kontrole značky, jestli má stále svoji standartní chuť a zda je u piva přítomná cizí chuť nebo vůně, díky čemuž je možné nalézt příčinu vady piva. U senzorické analýzy piva se postupuje postupně, nejdříve je hodnocen vzhled (barva, čirost a pěna) i když se již upouští od tohoto posuzování degustátory, protože analytické přístroje to vyhodnotí přesněji a nedochází k ovlivnění degustátorů. Poté se přechází k posuzování vůně a aromatu, kdy si degustátor přičichne z větší dálky následně pak od okraje sklenice, a nakonec vloží nos nad hladinu piva do sklenice, protože různé vady se mohou projevat z větší vzdálenosti a některé naopak z menší. Následující krok je posuzování pocitu v ústech, kde je hodnocen říz, plnost piva a trpkost, s tím

souvisí následně chuť piva, kde je určovaná především hořkost, kyselost a sladkost. Až po posouzení těchto základních parametrů je určena vyváženost a celkový dojem daného vzorku (Olšovská et al., 2017).

- Stanovení hořkosti v hotovém pivu

Toto stanovení navazuje na stanovení hořkých látek ve chmelu, hořkost se posuzuje instrumentální ale i senzorickou analýzou. Pivní hořkost může být daná nejen hořkými kyselinami, ale také aminokyselinami ze sladu (L-tyrosin, L-tryptofan a L-leucin), dipeptidy a cyklickými diketopiperaziny (Liguori et al., 2020). Mezinárodní jednotka hořkosti (IBU) vyjadřuje množství hořkosti, která je očekávatelná v pivu a zároveň poskytuje přibližnou hodnotu Iso- α -kyselin obsažených v pivu v mg hořkých kyselin na jeden litr (Oladokun et al., 2017). Mezi instrumentální analýzy patří HPLC nebo spektrofotometrie, díky HPLC lze detekovat pouze Iso- α -kyseliny, kdežto spektrofotometrie detekuje vedle hořkých kyselin také polyfenoly a chmelové silice (Oladokun et al., 2017). Ale pro posouzení hořkosti piva je velmi důležitá i senzorická analýza, protože pomocí ní je možné určit charakter a kvalitu hořkosti nebo hořkost v průběhu času (Oladokun et al., 2017). Používaná senzorická analýza pro určení hořkosti se skládá z kvalitativní popisné analýzy (QDA), profilování svobodné volby (FCP) nebo CATA (check-all-that-apply) určující charakter hořkosti a pro hořkost v průběhu času jsou využívány techniky jako časová intenzita (TI) a časová dominance pocitu (TDS) (Oladokun et al., 2017).

Fyzikálně-chemické požadavky

Pro analýzu fyzikálně-chemických ukazatelů piva se využívají v pivovarech přístroje, které dokážou změřit několik parametrů najednou, jedná se o extrakt, alkohol, energetickou hodnotu, zákal, pH, obsah kyslíku a oxidu uhličitého (Olšovská et al., 2015). Tyto přístroje jsou převážně určené pro analýzu piva a sladiny ale nemají příliš dobré využití pro meziprodukty a suroviny (Olšovská et al., 2015). Dle Olšovské et al. (2015) byl cíl vyvinout FT-NIR spektroskopickou metodu pro rychlé stanovení několika parametrů najednou. V předchozích studiích byly uvedeny i další parametry stanovené různými variantami NIR (obsah vody, celkový obsah bílkovin a lipidů, Kolbachovo číslo aj.) (Olšovská et al., 2015). Nicméně v pivovarské praxi jsou v dnešní době využívány analyzátory (SCABA, Anton Paar, SKALAR), které jsou schopné z malého obsahu vzorku určit obsah alkoholu, hustotu, hodnotu pH, obsah oxidu uhličitého a kyslíku, extrakt zdánlivý a skutečný, barvu nebo také hořkost piva (SKALAR), nutno dodat, že je potřeba více přístrojů, které jsou propojeny (Basařová et al., 2021).

- Obsah alkoholu a hustota piva

Pro stanovení alkoholu a hustoty jsou využívány referenční metody např. destilační metoda nebo pyknometrické stanovení (Olšovská et al., 2015). Stanovení hustoty úzce souvisí se stanovením alkoholu v pivu, protože pro změření hustoty je potřeba nejprve destilace vzorku z důvodu, že tabulky pro přepočítání hustoty na obsah alkoholu jsou založené na směsi alkohol-voda (Lachenmeier et al., 2010). Nicméně destilační metoda má nevýhody v tom, že je časově náročná a není plně automatizovaná (Castritius et al., 2010). Obsah

alkoholu v pivu je možné stanovit mnoha metodami, jednou z nich je pomocí přístroje SCABA (Servochem automatic beer analyzer), kdy je pivo rozděleno do dvou proudů, kdy jeden pokračuje do hustoměru Paar-U-tube a druhý proud je vstříkovan do kolony a alkohol je odstraněn protiproudem vzduchu, který prochází přes alkoholový senzor (Sohrabvandi et al., 2011). Díky kalibraci referenčním vzorkem vyhodnocovací přístroj určí procento alkoholu (Sohrabvandi et al., 2011). Dále je možné analyzovat obsah alkoholu pomocí infračervené nebo blízké červené spektroskopie (NIR), jde o nedestruktivní metodu, kdy v pivu je možné stanovit jak obsah alkoholu, tak extrakt (viz Obrázek č. 3) (Castritius et al., 2010). Ideální použití NIR je v kombinaci s refraktometrií, která je založena na ohybu světelného paprsku při přechodu z jednoho prostředí do druhého (Castritius et al., 2010). Výhodou by bylo použití jednoho většího zařízení s jednou průtokovou kvyetou a malým objemem analyzovaného vzorku (Castritius et al., 2010).

Obrázek č. 3 Systém pro analýzu piva Anton Paar Alcolyzer

(Dostupné z: <https://www.anton-paar.com/cz-cs/produkty/detaily/alcolyzer-analytický-systém/>)



- **Hodnota pH**

Hodnota pH piva je měřena pH metrem se skleněnou elektrodou, přičemž standardní hodnoty jsou od 4,3-4,7, pokud jsou hodnoty mimo tento interval, může to být ukazatel nějaké vady (Kosař et al., 2000). Hodnota pH je velmi ovlivněna oxidem uhličitým, který hodnotu snižuje, což může mít vliv na pěnivost piva (Neugrodda et al., 2015).

- **Obsah CO₂ a O₂**

Oxid uhličitý je vedlejší produkt kvašení, který také dotváří konečný dojem z piva, protože je základem pro říz piva a jeho pěnivost (Basařová et al., 2021). Stanovení oxidu uhličitého je možné pomocí chemických i fyzikálních metod. Do chemických patří přímá titrace, kdy CO₂ zreaguje s hydroxidem a je převeden na uhličitán (vápenatý nebo barnatý) (Basařová et al., 2021). Nepřímá titrace probíhá také reakcí s hydroxidem, kdy je následně

uvolněn oxid uhličitý minerální kyselinou a je zachycen hydroxidem barnatým, následně je retitrován (Basařová et al., 2021). Do chemických metod patří také kolorimetrie, kdy je oxid uhličitý difundován membránou a jímán do roztoku s indikátorem (Basařová et al., 2021). Fyzikální metody zahrnují spektroskopii v infračervené oblasti, nebo měření tepelné vodivosti plynu, který je uvolněn z uhličitánu vzniklého reakcí piva s hydroxidem díky přidávku kyseliny (Basařová et al., 2021). V pivu se také stanovuje kyslík, který je přítomný v plynné i kapalně formě, proto se stanovuje celkový obsah kyslíku (Basařová et al., 2021). Metody pro stanovení obsahu kyslíku jsou dnes výhradně elektrochemické založené na voltametričtém principu, kdy je kyslík rozpuštěný v pivu oddělován membránou a redukován na platinové nebo zlaté katodě, přičemž difuzní proud je úměrný obsahu kyslíku v pivu (Basařová et al., 2021). Na Obrázku č. 4 je přístroj CboxOC od firmy Anton Paar, založené na patentové metodě vícenásobné objemové expanze.

Obrázek č. 4 Přístroj Anton Paar CboxQC-přenosný měřič CO₂ a O₂

(Dostupné z: <https://www.anton-paar.com/cz-cs/produkty/detaily/cboxqc/>)



- Extrakt zdánlivý a skutečný

Extrakt je popisován jako koncentrace piva vyjádřená v procentech, což je extrakt z původní mladiny před zakvašením (Kosař et al., 2000). Extrakt se dělí na zdánlivý a skutečný, zdánlivý extrakt je měřen sacharometricky v pivu bez oxidu uhličitého, zatímco skutečný extrakt je možné stanovit sacharometricky po oddestilování alkoholu a přidáním destilované vody (Kosař et al., 2000). Oba extrakty se uvádí v hmotnostních procentech (Kosař et al., 2000). Rozdíl mezi extraktem zdánlivým a skutečným je ten, že zdánlivý vyjadřuje extraktivnost piva bez oxidu uhličitého a je závislý na obsahu alkoholu a extraktu, zatímco skutečný extrakt je nejnižší dosažitelná extraktivnost piva díky kvašení (Kosař et al., 2000).

- Barva

Nejen při senzorické analýze je posuzování barvy mezi prvními znaky, stejně tak je to i u spotřebitelů. V minulosti se hojně využívaly barevné kotouče pro porovnání barvy, nicméně to byla metoda subjektivní s možnými většími odchylkami (Koren et al., 2020). Nicméně poté byly vyvinuty metody od ASBC a EBC, jednou z nich je Standardní referenční metoda (SRM) od ASBC (Koren et al., 2020). Tyto metody jsou založené na měření vzorku při vlnové délce 430 nm a na základě absorbance vzorku jsou následně rozlišovány piva (Koren et al., 2020). U metody dle EBC je využíván k měření absorbance UV-VIS spektrofotometr (viz Obrázek č. 5) (Koren et al., 2020). Avšak v dnešní době jsou tyto metody problematické, protože byly navrženy pro tradiční styly piva, ale dnes je mnoho pivních stylů a pivních nápojů (ochucené nealkoholické pivo, radler aj.) a tyto metody mohou poskytovat nesprávný výsledek u těchto produktů (Koren et al., 2020). Barva je odlišná u různých druhů piv, kdy světlá piva mají 8-12 jednotek EBC, polotmavá piva 20-40 EBC a tmavá 60-120 EBC (Kosař et al., 2000).

Obrázek č. 5 UV-VIS spektrofotometr

(Dostupné z: <https://cz.vwr.com/store/product/10577061/spektrofotometr-uv-vis-uv-6300pc>)



- Zákal

Zákal je jedním z nejdůležitějších kvalitativních ukazatelů, a ne vždy je známkou kontaminace mikroorganismy či jiným problémem (Kahle et al., 2021). Ale je to jeden ze znaků, kterého si spotřebitel hned všimne a díky tomu může nabýt nesprávný dojem, co se týče kvality piva (Kahle et al., 2021). Nicméně u různých nefiltrovaných, nebo pšeničných piv zákal není na škodu, spíše naopak a je to dáno nepoužitím filtrace převážně v menších pivovarech (Kahle et al., 2021). Zákal v pivu může vznikat v průběhu skladování, přestože po stočení zákal nebyl přítomný, nicméně jeho přítomnost ukazuje na změny v koloidním systému (Dienstbier et al., 2010). Zákal vzniká shlukem původně rozpuštěných molekul v pivu, které se shlukují ve větší celky a způsobují rozptyl světla (Dienstbier et al., 2010). Zákaly lze dělit na biologické a nebiologické, díky dnešním úpravám piva jako pasterace či

filtrace je výrazně nižší riziko tvorby biologických zákalů (Dienstbier et al., 2010). Nicméně tvorbě nebiologických zákalů se nedá zcela zabránit, tudíž je nutná stabilizace piva (Dienstbier et al., 2010). V dnešní době jsou standardizované metody na měření zákalu, tyto metody se rozdělují na optické, mikroskopické a enzymatické, mimo tyto tři je také analýza velikosti částic (Kahle et al., 2021). Nicméně v pivovarské praxi se nejčastěji využívají zákalometry (turbidimetry), kde se měří světlo rozptýlené ve vzorku pod určitým úhlem a intenzita tohoto světla je porovnávána s intenzitou u příslušného zákalového standardu (viz Obrázek č. 6) (Dienstbier et al., 2010). Standardem je suspenze formazinu (N,N'-dimethylenhydrazin), který představuje bílou suspenzi ve vodném roztoku (Dienstbier et al., 2010).

Obrázek č. 6 Zákalometr LabScat od firmy Sigrisť
(Dostupné z: https://www.technoprocur.cz/sigrisť-labscat_z140/)



- Koloidní stabilita piva

Se zákalem souvisí pojem koloidní stabilita. Jedná se o časový interval od stočení piva až po dobu, kdy je koloidní systém piva narušený a vzniká zákal, nebo dle jiné definice jde o dobu od stočení po dosažení celkového zákalu 2,5 j. EBC při 0 °C (Dienstbier et al., 2010). V letech minulých bylo vyvinuto mnoho fyzikálně-chemických metod pro určení koloidní stability, nicméně žádná není úplně univerzální a spolehlivá (Dienstbier et al., 2010). Využívá se šest metod, které obsahují více analýz, jde o šokovací testy, precipitační testy, kvantitativní analýzu koloidů piva, analýza obsahu zákalotvorných látek a imunochemické metody (Dienstbier et al., 2010). Cílem šokovacích testů je pozorování permanentního nebo chladového zákalu, když je vzorek piva vystavován střídavě 40-60 °C a 0 °C, přístroj pro šokovací testy (viz Obrázek č. 7)

(Dienstbier et al., 2010). Precipitační testy se provádí tak, že ke vzorku piva jsou přidávány různá srážecí činidla (síran amonný, síran hořečnatý, kyselina trichloroctová) nebo i jiné látky, které zajišťují vyloučení zákalotvorných látek (bílkovinné a polyfenolové komplexy) a následně je měřen zákal (Dienstbier et al., 2010). Třetí metodou je alkoholový chladový test, kdy je přidáván do vzorku alkohol v menším množství a následně probíhá zchlazení na teploty pod 0 °C, tím je podporován vznik zákalu a následně se porovnají výsledky měření bez alkoholu a s přídavkem alkoholu (Dienstbier et al., 2010). Čtvrtou metodou je kvantitativní analýza koloidů piva, která je možná provést několika způsoby, např. průtokovou cytometrií s možným použitím fluorescenčních barviv (Dienstbier et al., 2010). Analýza obsahu zákalotvorných látek se také provádí pomocí HPLC, a nakonec imunochemické metody se využívají pro rozlišení pěnnotvorných a zákalotvorných proteinů (Dienstbier et al., 2010).

Obrázek č. 7 Šokovací termostát 1-CUBE pro stanovení koloidní stability piva, nebo pro temperaci vzorků

(Dostupné z:

<https://www.1cube.com/produkty?categoryId=18472&id=854862&action=itemDetail&oid=6544091&nid=11556>



- Pěnovost

Pěnovost piva také patří mezi znaky, kterých si konzument hned všimne, protože pěna k pivu neodmyslitelně patří, je proto posuzována výška, struktura, barva pěny a dále také rychlost opadnutí pěny či ulpívání na sklenici (Brož & Šavel, 2006). Vedle těchto znaků je posuzována hustota pěny, nebo její stabilita, přičemž stabilita pěny je nejdůležitější vlastností (Brož & Šavel, 2006; Neugrodda et al., 2015). Metody pro stanovení kvality pěny lze rozdělit do dvou skupin. V první skupině jde o vytváření pěny pomocí přirozeného nalévání piva, nicméně výsledky mohou být značně nekonzistentní (Neugrodda et al., 2015). Ve druhé skupině metod jsou nevýhody v tom, že je tvořena příliš vlhká pěna nebo je mísená s pivem, má atypickou hustotu a další vlastnosti

(Neugrodda et al., 2015). Přístroje na měření stability pěny lze rozdělit na vodivostní měřiče, optické měřiče nebo také přístroje pro měření ulpívání pěny (Brož & Šavel, 2006). Mezi vodivostní měřiče se řadí především přístroj NIBEM, měřič pěny SITA nebo víceúčelový měřič pěny 1-CUBE (Brož & Šavel, 2006). Optických přístrojů na měření pěnivosti je mnoho, např. fotoelektrický přístroj s horním nebo dolním zdrojem světla, Galesův analyzátor pěnivosti či automatický analyzátor pěny Carlsberg (Brož & Šavel, 2006). Pro měření ulpívání pěny se využívá NIBEM clinc meter (viz Obrázek č. 8), nebo optický měřič ulpívání pěny (Brož & Šavel, 2006). V praxi je často využíván právě NIBEM, kde je stabilita pěny měřena tak, že je pivo napěněno průchodem tryskou a následně je měřen čas poklesu hladiny povrchu pěny o 10, 20 a 30 mm (Brož & Šavel, 2006). Pokud je stabilita pěny nad 300 sekund, lze to považovat za dobrý výsledek, pod 220 sekund je nižší stabilita pěny (Neugrodda et al., 2015).

Obrázek č. 8 Přístroj od firmy Haffmans-tester stability pěny NIBEM-TPH
(Dostupné z: <https://foodandbeverage.pentair.com/en/products/application-foam-stability-testing>)



Mikrobiologické požadavky

Mikrobiologická kontrola během celého pivovarského procesu je nezbytná, protože zkažení piva díky nepříznivým bakteriím je problém nejen kvalitativní kvůli znehodnocení výsledného výrobku, ale také z hlediska ekonomického (Kim et al., 2015). Proto je důležité najít zdroj potenciálně škodlivých mikroorganismů, které se dostávají do mladiny nebo do piva a najít opatření zabráňující jejich rozmnožování, a tudíž i v důsledku kažení piva (Kunze, 2010). Nicméně ne všechny mikroorganismy jsou škodlivé, proto se dělí na tři skupiny. První z nich jsou neškodné doprovodné mikroorganismy, druhé jsou potenciálně škodlivé mikroorganismy a třetí skupinou jsou mikroorganismy zodpovědné za zkažení piva (Kunze, 2010). Mezi bakterie, které se mohou vyskytnout v pivu patří octové bakterie (rody *Acetobacter*,

Gluconobacter), bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus*), bakterie vyskytující se v mladině (*Enterobacteriaceae*- *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Klebsiella* aj.), dále pak například rody *Megasphaera*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* či *Pseudomonas* (Basařová et al., 2021). Indikátory hygienické čistoty jsou koliformní bakterie pocházející z mladiny, *Escherichia coli* nebo bakterie mléčného kvašení podporující kažení piva (Kim et al., 2015). Můžeme rozdělovat mikrobiální kontaminanty na primární vyskytující se v kvasnicích a nefiltrované mladině (kvasné a ležácké sklepy) a sekundární vyskytující se v dalších úsecích (Basařová et al., 2021). K primárním kontaminantům se řadí druhy *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus brevisimilis*, *Lactobacillus frigidus* a *Pediococcus damnosus*, k sekundárním většinou druhy *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus coryniformis*, *Pediococcus inopinatus*, *Megasphaera* a *Pectinatus* (Kosař et al., 2000). Pro určení mikroorganismů jsou využívány specifické pevné, ale i tekuté půdy, kdy jsou zaočkovány příslušnými vzorky meziproductů a piva (Basařová et al., 2021). Očkování probíhá tak, že do speciálních nálevek je nalit vzorek a následně je odsáván čerpadlem, na dně nálevky je membránový filtr, který je následně vložen do specifické petriho misky s pevnou půdou, nebo do kyvety s tekutou půdou (Basařová et al., 2021). Je důležité zdůraznit, že pro každý rod a druh bakterií nebo kvasinek jsou důležité odlišné teplotní podmínky pro růst, nebo také potřeba odlišných živin (Basařová et al., 2021). Pro obecný průkaz kontaminujících kvasinek a bakterií se využívají půdy WLN a WLD, cizí kvasinky jsou stanovovány na půdě se síranem měďnatým nebo na agaru s lysinem (Basařová et al., 2021). Dále se používají pro detekci bakterií mléčného kvašení NBB, NBA, NBC nebo MRS-agar s možným přídavkem 2-fenylethanolu (Basařová et al., 2021). Existují také rychlometydy, které se dělí na fyzikální, mikroskopické, molekulárně-genetické, imunochemické metody a měření ATP (Kosař et al., 2000). Nejčastěji se využívá v praxi počítání mikrokolonií, bioluminiscence nebo PCR techniky (Kosař et al., 2000). Bioluminiscenční metoda stanovení ATP se využívá v pivovarech pro rychlé zjištění organických látek jako je ATP ve vzorcích nebo na různých površích, kde díky enzymatické reakci ATP produkuje světlo (Bokulich et al., 2012). Přítomnost ATP je indikátorem znečištění nebo přítomnosti mikroorganismů (Basařová et al., 2021). Dělalí se stěry z povrchů a vzorků prováděné stěrovými tyčinkami, které jsou následně umístěny do smývacího roztoku, a poté jsou tyčinky umístěny do fluorimetru s fotonásobičem, kde je určen počet světelných impulzů (Basařová et al., 2021). Nicméně díky této metodě není možná identifikace přítomných mikroorganismů, proto se spíše využívá bioluminiscenční metoda pro kontrolu sanitace (Bokulich et al., 2012).

4 Závěr

Bakalářská práce je zaměřena na popis jakostních parametrů, chemického složení a jejich laboratorního stanovení. Součástí popisu standardních metod využívaných při kontrole kvality jsou také uvedené moderní metody. Stanovované parametry jsou mechanické, chemické nebo fyzikální. Vedle toho jsou podstatné i senzorické a mikrobiologické parametry, jež mohou výrazně ovlivnit konečnou kvalitu.

Moderní metody u surovin vedle standardizovaných metod, jsou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem pro stanovení iontů ve vodě (ICP-MS). Pro stanovení mikroorganismů je možné využít hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpcí a ionizací za přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF-MS).

U stanovení sladu převládá často HPLC, nebo blízká infračervená spektroskopie (NIR), díky níž je možné stanovit více látek najednou, jde o sacharidy, bílkoviny aj. Navíc bílkoviny ve sladu spolu s aminokyselinami a peptidy je možné stanovit kapilární elektroforézou.

Pro stanovení těkavých látek ve chmelu byla vyvinuta metoda mikrovlnná, ultrazvuková, superkritická a subkritická fluidní extrakce se šetrnějšími rozpouštědly jež izoluje těkavé látky ve chmelu, přičemž je snaha o regeneraci těkavých látek pro opětovné využití. U analýzy chmelových silic je novinka ve využití hmotnostní spektrofotometrie s plynovou chromatografií v kombinaci s Headspace-trap. Nebo alternativní ultrafialová spektroskopie, díky níž je možné provést kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení silic chmelu.

Kmen kvasinek je možné stanovit pomocí MALDI-TOF-MS jež je založeno na generování proteinových fingerprints („otisků“) a následně porovnání a referenčními spektry.

Hotové pivo je nejčastěji analyzováno pomocí výše uvedených metod, jež jsou hojně rozšířené v pivovarské praxi, z důvodu efektivity práce a ušetření času. Nicméně je novinka rozšíření blízké infračervené spektroskopie, protože díky ní je možné efektivně stanovit většinu parametrů v hotovém pivu.

Tyto metody jsou nejmodernější v rámci posuzování kvality surovin. V práci jsou dále uvedeny i ostatní metody, jež jsou vyzkoušené a využívány v praxi. Tudiž byl splněn stanovený cíl práce a v budoucnu by bylo možné rozšířit práci o zaměření na jednotlivé metody a laboratorní měření kvalitativních parametrů u surovin a hotového piva.

5 Seznam literatury

- Aberl A, Coelhan M. 2012. Determination of volatile compounds in different hop Varieties by headspace-trap GC/MS-in comparison with conventional hop essential oil analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60** (11): 2785–2792.
- Anderson H E, Santos I C, Hildenbrand Z L, Schug K A. 2019. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*. **1085**: 1–20.
- Andrés-Iglesias C, Montero O, Sancho D, Blanco CA. 2015. New trends in beer flavour compound analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **95** (8): 1571-1576.
- Basařová G, Šavel J, Basař P, Basařová P, Brož A. 2021. *Pivovarství teorie a praxe výroby piva*. Havlíček Brain Team, Praha.
- Basařová G, Šavel J, Basař P, Lejsek T. 2010. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- Blšáková L, Gregor T, Mešt'ánek M, Hřivna L, Kumbár V. 2022. The use of unconventional malts in beer production and their effect on the wort viscosity. *Foods* (e11131) DOI: 10.3390/foods11010031.
- Bogdan P, Kordialik-Bogacka E. 2017. Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology*. **65**: 1–9.
- Bokulich N A, Bamforth C W, Mills D A. 2012. A review of molecular methods for microbial community profiling of beer and wine. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **70** (3): 150–162.
- Bravi E, Benedetti P, Marconi O, Perretti G. 2014. Determination of free fatty acids in beer wort. *Food Chemistry*. **151**: 374–378.
- Brendel R, Schwolow S, Rohn S, Weller P. 2020. Gas-phase volatilomic approaches for quality control of brewing hops based on simultaneous GC-MS-IMS and machine learning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **412**: 7085–7097.
- Brendel S, Hofmann T, Granvogl M. 2019. Characterization of key aroma compounds in pellets of different hop varieties (*humulus lupulus* L.) by means of the sensomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **67** (43):12044-12053.
- Brglez M E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects (e21791). DOI: 10.3390/molecules21070901.
- Brož A, Šavel J. 2006. Measurement of beer foaming power. *Kvasný Průmysl*. **52**: 314–318.

- Buiatti S. 2009. Beer Composition and Properties. Pages 213-225 in Preedy RV, editor. Beer in Health and Disease Prevention. Academic Press, London.
- Canonico L, Comitini F, Ciani M. 2014. Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. **120** (3): 262-267.
- Carvalho D O, Guido LF. 2022. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chemistry* (e131093) DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.131093.
- Castritius S, Kron A, Schäfer T, Rädle M, Harms D. 2010. Determination of alcohol and extract concentration in beer samples using a combined method of near-infrared (NIR) spectroscopy and refractometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58** (24): 12634–12641.
- Celní správa České republiky. 2021. Statistická data z oblasti výroby, dopravy a dovozu. Praha. Available from https://www.celnisprava.cz/cz/dane/statistiky/Pivo_produkce_doprava/Produkce_2021.pdf (accessed February 2022).
- České noviny. 2021. Výroba piva loni klesla o 6,9 %, lidé ho vypili nejméně od 60. let. Česká tisková kancelář. Praha. Available from <https://www.ceskenoviny.cz/zpravy/vyroba-piva-loni-klesla-o-6-9-lide-ho-vypili-nejmene-od-60-let/2024848> (accessed April 2021).
- Český svaz pivovarů a sladoven. 2021. Spotřeba piva v Česku je nejnižší za posledních 60 let. Praha. Available from <http://ceske-pivo.cz/tz2021/spotreba-piva-v-cesku-je-nejnizi-za-poslednich-60-let> (accessed April 2021).
- Dienstbier M, Janková L, Sladký P, Dostálek P. 2010. Metody předpovědi koloidní stability piva. *Chemické Listy*. **104**: 86-92.
- Eumann M. 2006. Water in brewing. Pages 183-207 in Bamforth WC, editor. *Brewing: New Technologies*. Woodhead Publishing.
- Eumann M, Schildbach, S. 2012. 125th anniversary review: Water sources and treatment in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. **118**: 12-21.
- Fox GP. 2009. Chemical composition in barley grains and malt quality. *Advanced Topics in Science and Technology in China*. Pages 63-98 in Zhang G, Li C, editors. *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gibson B, Dahabieh M, Krogerus K, Jouhten P, Magalhães F, Pereira R, Siewers V, Vidgren V. 2020. Adaptive laboratory evolution of ale and lager yeasts for improved brewing efficiency and beer. *The Annual Review of Food Science and Technology*. **11** (1): 23-44.
- Gibson B, Geertman J-M A, Hittinger C T, Krogerus K, Libkind D, Louis E J, Magalhães F, Magalhães M, Sampaio J P. 2017. New yeasts-new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research* **17** (4) DOI: 10.1093/femsyr/fox038.

- Hahn C D, Lafontaine S R, Pereira C B, Shellhammer T H. 2018. Evaluation of nonvolatile chemistry affecting sensory bitterness intensity of highly hopped beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **66** (13): 3505–3513.
- Hartman I, Prokeš J, Helánová A, Hartmann J. 2010. Vztah mezi obsahem škrobu v ječmeni a extraktem sladu. *Kvasný průmysl*. **56** (11-12): 423–427.
- Hartman I, Svobodová I, Spáčilová V, Míša P. 2017. Response of malting barley varieties to growing under the “low – input“ and ecological regime. Part I – Yield and agronomic characteristics. *Obilnářské listy*. **25** (3-4): 59-62.
- Hrnčíč M K, Španinger E, Košir I J, Knez Ž, Bren U. 2019. Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients*. MDPI AG 21(7):901 (e112257) DOI: 10.3390/nu11020257
- Chládek L. 2007. *Pivovarnictví*. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Chládek L. 2019. Dynafill Kronen v pivovaru Bischofshof. *Potravinářská Revue*. 63–64.
- Jaskula B, Goiris K, De Rouck G, Aerts G, De Cooman L. 2007. Enhanced Quantitative Extraction and HPLC determination of hop and beer bitter acids. *The institute of Brewing & Distilling*. **113**(4): 381-390.
- Jaskula-Goiris B, Goiris K, Stryn E, Van Opstaele F, De Rouck G, Aerts G, De Cooman L. 2014. The use of hop polyphenols during brewing to improve flavor quality and stability of pilsner beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **72** (3): 175–183.
- Kahle E M, Zarnkow M, Jacob F. 2021. Beer Turbidity Part 1: A review of factors and solutions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **79** (2): 99–114.
- Krofta K. 2008. Hodnocení kvality chmele. Pages 6-52 in Buchtová P, editor. *Metodika hodnocení kvality chmele*. Chmelařský institut s.r.o., Žatec.
- Kim S A, Jeon S H, Kim N H, Kim H W, Lee N Y, Cho T J, Jung Y M, Lee S H, Hwang I G, Rhee M S. 2015. Changes in the microbial composition of microbrewed beer during the process in the actual manufacturing line. *Journal of Food Protection*. **78** (12): 2233–2239.
- Koren D, Vecseri H B, Kun-Farkas G, Urbin A, Nyitrai A, Sipos L. 2020. How to objectively determine the color of beer? *Journal of Food Science and Technology*. **57** (3): 1183-1189.
- Kosař K, Procházka S a kolektiv autorů. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Výzkumný Ústav Pivovarský a Sladařský a.s., Praha.
- Košin P, Šavel J, Kolouchová I, Brož A. 2007. Viabilita a vitalita kvasnic v provozním kvašení. *Kvasný Průmysl*. **53** (2): 30-34.
- Krogerus K, Magalhães F, Vidgren V, Gibson B. 2017. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **101**: 65-78

- Kucharczyk K, Żyła K, Tuszyński T. 2020. Simultaneous optimization of acetaldehyde and dms concentrations for better sensory quality of beer fermented on an industrial scale. *Foods* (e981043). DOI: 10.3390/foods9081043.
- Kunze W. 2010. *Technology Brewing & Malting*. VLB, Berlin.
- Kupetz M, Aumer J, Harms D, Zarnkow M, Sacher B, Becker T. 2017. High-throughput β -glucan analyses and their relationship with beer filterability. *Eur Food Res Technol.* **243**: 341–351.
- Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research.* **14** (7): 1068–1079.
- Lachenmeier D W, Godelmann R, Steiner M, Ansay B, Weigel J, Krieg G. 2010. Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. *Chemistry Central Journal* 4:5 DOI:10.1186/1752 -153X-4-5.
- Lamberti L, Grillo G, Gallina L, Carnaroglio D, Chemat F, Cravotto G. 2021. Microwave-assisted hydrodistillation of hop (*humulus lupulus* l.) Terpenes: a pilot-scale study. *Foods*. MDPI AG. (e10112726). DOI: 10.3390/foods10112726.
- Liguori L, De Francesco G, Orilio P, Perretti G, Albanese D. 2020. Influence of malt composition on the quality of a top fermented beer. *Journal of food science and technology.* **58** (6): 2295-2303.
- Lodolo E J, Kock J L F, Axcell B C, Brooks M. 2008. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research.* **8** (7): 1018-1036.
- Lukinac J, Mastanjević K, Mastanjević K, Nakov G, Jukić M. 2019. Computer vision method in beer quality evaluation—a review. *Beverages.* MDPI AG (e5238). DOI: 10.3390/beverages5020038.
- Mikyška A, Jurková M, Horák T, Slabý M. 2022. Study of the influence of hop polyphenols on the sensory stability of lager beer. *European Food Research and Technology.* **248** (2): 533–542.
- Musa M O, Aljuhaimi F, Uslu N. 2018. Effect of malt process steps on bioactive properties and fatty acid composition of barley, green malt and malt grains. *Journal of Food Science and Technology.* 55(1): 226-232.
- Nance M R, Setzer W N. 2011. Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing. *Journal of Brewing and Distilling.* **2** (2): 16–22.
- Ndife J, Nwokedi C U, Ugwuona F U. 2019. Optimization of malting and saccharification in the production of malt beverage from maize. *Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment.* **15** (1): 134-141.
- Neugrodda C, Gastl M, Becker T. 2015. Comparison of Foam Analysis Methods and the Impact of Beer Components on Foam Stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists,* **73** (2): 170-178.

- Oladokun O, James S, Cowley T, Dehrmann F, Smart K, Hort J, Cook D. 2017. Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma. *Food Chemistry*. **230**: 215–224.
- Olajire A A. 2020. The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production* (e102817) DOI: 10.1016/j.jclepro.2012.03.003.
- Olšovská J, Čejka P, Čulík J, Štěřba K, Tenkl L. 2015. Rapid and simultaneous analysis of qualitative parameters of beer by FT-NIR spectroscopy. *Kvasný průmysl*. 61(7-8): 212-220.
- Olšovská J, Štěřba K, Slabý M, Frantík F. 2017. *Senzorická analýza piva*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a.s., Praha.
- Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra A-S, Hatziloukas E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*. **6** (1): 1–31.
- Perretti G, Floridi S, Turchetti B, Marconi O, Fantozzi P. 2011. Quality control of malt: Turbidity problems of standard worts given by the presence of microbial cells. *Journal of the Institute of Brewing*. **117** (2): 212–216.
- Pham T, Wimalasena T, Box W G, Koivuranta K, Storgårds E, Smart K A, Gibson B R. 2011. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery ‘wild’ yeast contaminants. *Journal of the Institute of Brewing*. **117** (4): 556-568.
- Piddocke M P, Kreisz S, Peter Heldt-Hansen H, Fog Nielsen K, Olsson L. 2009. Physiological characterization of brewer’s yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Appl Microbiol Biotechnol*. **84**: 453-464.
- Punčochářová L, Pořízka J, Diviš P, Štursa V. 2019. Study of the influence of brewing water on selected analytes in beer. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. **13** (1): 507–514.
- Rettberg N, Biendl M, Garbe L A. 2018. Hop aroma and hoppy beer flavor: Chemical backgrounds and analytical tools—A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **76** (1): 1-20.
- Roberts T R. 2016. Hops. Pages in 47-75 in Bamforth C, editor. *Brewing materials and processes: A practical approach to beer excellence*. Academic Press, Cambridge.
- Saldi S, Driscoll D, Kuksin D, Chan L L Y. 2014. Image-based cytometric analysis of fluorescent viability and vitality staining methods for ale and lager fermentation yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **72** (4): 253–260.
- Sohrabvandi S, Mortazavian A M, Rezaei K. 2011. Advanced analytical methods for the analysis of chemical and microbiological properties of beer. *Journal of Food and Drug Analysis*. **2**: 202-222.
- Stewart G G, Hill A E, Russell I. 2013. 25 th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*. **119** (4): 202-220.

- Szwed L P, Tomaszewska-Ciosk E, Błazewicz J. 2014. Simplified mashing efficiency. Novel method for optimization of food industry wort production with the use of adjuncts. *Polish Journal of Chemical Technology*. **16** (3): 36–39.
- Tanaka Y, Yanagida A, Komeya S, Kawana M, Honma D, Tagashira M, Kanda T, Shibusawa Y. 2014. Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **62** (10): 2198–2206.
- Tronina T, Popłonski J, Bartmanska A. 2020. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. *Molecules*. MDPI AG (e25184201) DOI: 10.3390/molecules25184201.
- Werkneh A A, Beyene D H, Osunkunle A A. 2019. Recent advances in brewery wastewater treatment; approaches for water reuse and energy recovery: a review. *Environmental Sustainability*. **2**: 199-209.
- Yang B, Schwarz P, Horsley R. 1998. Factors involved in the formation of two precursors of dimethylsulfide during malting. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **56** (3): 85-92.

Normy

ČSN ISO 6059 (757384). 1996. Jakost vod. Stanovení sumy vápníku a hořčíku. Odměrná metoda s EDTA. Český normalizační institut. Praha.

ČSN ISO 9964-2 (75 7378). 1996. Jakost vod. Stanovení sodíku a draslíku. Část 2: Stanovení draslíku metodou atomové absorpční spektrometrie. Český normalizační institut. Praha.

ČSN EN ISO 15586 (75 7381). 2004. Jakost vod – Stanovení stopových prvků atomovou absorpční spektrometrií s grafitovou kyvetou. Český normalizační institut. Praha.

ČSN ISO 8288 (757382). 1995. Jakost vod. Stanovení kobaltu, niklu, mědi, zinku, kadmia a olova. Metody plamenové atomové absorpční spektrometrie. Český normalizační institut. Praha.

ČSN ISO 7980 (757383). 1995. Jakost vod. Stanovení vápníku a hořčíku. Metoda atomové absorpční spektrometrie. Český normalizační institut. Praha.

ČSN EN ISO 11885 (757387). 2009. Jakost vod – Stanovení vybraných prvků optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Český normalizační institut. Praha (Brusel).

ČSN EN ISO 17294-2 (757388). 2017. Kvalita vod – Použití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) - Část 2: Stanovení vybraných prvků včetně izotopů uranu. Český normalizační institut. Praha (Brusel).

ČSN EN ISO 10304-1 (757391). 2009. Jakost vod – Stanovení rozpuštěných aniontů metodou kapalinové chromatografie iontů – Část 1: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů a síranů. Český normalizační institut. Praha (Brusel).

ČSN EN ISO 10304-3 (757391). 1998. Jakost vod – Stanovení rozpuštěných aniontů metodou kapalinové chromatografie iontů – Část 3: Stanovení chromanů, jodidů, siřičitanů, thiokyanatanů a thiosíranů. Český normalizační institut. Praha (Brusel).

ČSN EN ISO 7971-2 (461013). 2019. Obiloviny – Stanovení objemové hmotnosti zvané "hektolitrová váha" - Část 2: Metoda sledovatelnosti pro měřicí přístroje k ověření přístroje podle mezinárodního standardu. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Praha.

ČSN EN ISO 712 (461014). 2010. Obiloviny a výrobky z obilovin – Stanovení vlhkosti – referenční metoda. Český normalizační institut. Praha.

ČSN 46 1011-18 (461011). 2003. Zkoušení obilovin, luštěnin a olejnin – Část 18: Zkoušení obilovin – Stanovení obsahu dusíkatých látek. Český normalizační institut. Praha.

ČSN 46 2520-4 (462520). 1995. Zkoušení chmele. Část 4: Cizí příměsi. Český normalizační institut. Praha.

ČSN 46 2520-5 (462520). 1995. Zkoušení chmele. Část 5: Chmelové příměsi. Český normalizační institut. Praha.

ČSN 46 2520-10 (462520). 1995. Zkoušení chmele. Část 10: Pecky. Český normalizační institut. Praha.

ČSN 46 2520-6 (462520). 1995. Zkoušení chmele. Část 6: Rozplevení hlávek. Český normalizační institut. Praha.

ČSN 46 2520-3 (462520). 1991. Zkoušení chmele. Stanovení vlhkosti. Český normalizační institut. Praha.