



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POSOUZENÍ VLIVU FILTRACE A PASTERIZACE NA OBSAH VYBRANÝCH VITAMINŮ V PIVU

INFLUENCE OF THE FILTRATION AND PASTERURIZATION ON CONTENT OF SELECTED VITAMINS IN
BEER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Adéla Šimíčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1227/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Adéla Šimíčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Posouzení vlivu filtrace a pasterizace na obsah vybraných vitaminů v pivu

Zadání diplomové práce:

1. zpracování literární rešerše na dané téma
2. vývoj a optimalizace HPLC metody pro stanovení vitaminů B skupiny v pivu
3. analýza vzorků piv ošetřených různými postfermentačními technologiemi
4. zpracování naměřených výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Adéla Šimíčková
student(ka)

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá posouzením vlivu filtrace a pasterizace na obsah vybraných vitaminů v pivu. Konkrétně se jedná o vitamin B₂, B₃, B₆, B₉ a B₁₂. Pro stanovení uvedených vitaminů byla použita separační metoda HPLC s detekcí DAD, která byla nejprve optimalizována a následně validována. Data, která byla získána analýzou 28 vzorků pív, byla vyhodnocena pomocí analýzy rozptylu. Tato metoda poskytla parametry P, F a F_{krit}, jež jsou důležité pro posouzení statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými skupinami pív. Na základě těchto parametrů byl pozorován významný vliv filtrace u vitaminu B₂ a B₃. Filtrace snížila koncentraci vitaminu B₂, zatímco množství vitaminu B₃ vzrostlo. Významný vliv pasterizace nebyl pozorován.

ABSTRACT

This master thesis focuses on the influence of the filtration and the pasteurization on the content of the selected vitamins in beer. Specifically, the vitamin B₂, B₃, B₆, B₉ and B₁₂. The high performance liquid chromatography with diode array detector was used as a separation method for the vitamin content analysis. First this method was optimized and then validated. The data obtained by analyzing 28 beer samples were evaluated using a statistical method – the analysis of variance. This method provided parameters P, F and F_{crit} which are important for the assessment of the statistically significant differences between the individual groups of beer. Based on these parameters, a significant effect of the filtration was observed for the vitamin B₂ and B₃. The filtration has reduced the amount of the vitamin B₂ while it increased the concentration of the vitamin B₃. The pasteurization had no significant effect on the vitamin content.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pivo, technologie piva, filtrace, pasterizace, HPLC, vitaminy skupiny B

KEYWORDS

Beer, beer technology, filtration, pasteurization, HPLC, B-group vitamins

ŠIMÍČKOVÁ, A. *Posouzení vlivu filtrace a pasterizace na obsah vybraných vitamínů v pivu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 56 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, povzbuzení a cenné rady v průběhu řešení této práce. Děkuji také PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za ochotu a poskytnuté rady. V neposlední řadě patří mé velké díky celé mé rodině za podporu jak finanční, tak psychickou.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Historie vaření piva	8
2.2	Suroviny pro výrobu piva.....	8
2.2.1	Voda	8
2.2.2	Ječmen.....	9
2.2.3	Slad.....	11
2.2.4	Chmel	11
2.3	Technologie výroby piva	12
2.3.1	Příprava sladu.....	12
2.3.2	Výroba piva	14
2.3.3	Postfermentační úpravy.....	17
2.4	Vitaminy skupiny B v pivu.....	19
2.4.1	Vitamin B ₁ – Thiamin.....	19
2.4.2	Vitamin B ₂ – riboflavin	20
2.4.3	Vitamin B ₃ – Niacin	22
2.4.4	Vitamin B ₅ – kyselina pantotenová	23
2.4.5	Vitamin B ₆ – pyridoxin	25
2.4.6	Vitamin B ₉ – kyselina listová.....	27
2.4.7	Vitamin B ₁₂ – kobalamin	28
2.5	Analytické metody pro analýzu vitaminů B v pivu	30
2.5.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	30
2.6	Statistická metoda pro analýzu dat	31
2.6.1	Analýza rozptylu	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Popis materiálu k analýze.....	32
3.2	Laboratorní vybavení.....	33
3.2.1	Použité přístroje.....	33
3.2.2	Použité chemikálie	34
3.2.3	Laboratorní pomůcky	34
3.3	Příprava vzorků pro HPLC analýzu vitaminů B v pivech	34
3.4	Příprava kalibračních roztoků pro HPLC analýzu.....	35

3.5	HPLC metoda pro stanovení vitaminů skupiny B	35
3.6	Validace HPLC metody	36
3.7	Statistická analýza dat	38
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	39
4.1	Výsledky analýz jednotlivých vzorků pív	39
4.2	Posouzení vlivu postfermentačních technologií na obsah vitaminů skupiny B v pivu	41
4.2.1	Vliv postfermentačních technologií na obsah vitaminu B ₂ v pivu.....	41
4.2.2	Vliv postfermentačních technologií na obsah vitaminu B ₃ v pivu.....	42
4.2.3	Vliv postfermentačních technologií na obsah vitaminu B ₉ v pivu.....	44
4.2.4	Vliv postfermentačních technologií na obsah vitaminu B ₁₂ v pivu	45
4.3	Vliv obsahu jednotlivých vitaminů skupiny B na nutriční hodnotu piva	46
5	ZÁVĚR.....	48
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	50
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

1 ÚVOD

V České republice se pivo těší velké oblibě, o čemž vypovídá prvenství v konzumaci tohoto nápoje na našem území. Pivo je lehce alkoholický nápoj, který vzniká s pomocí pivovarských kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*), nejčastěji z ječného sladu, vody a chmele. Vysoká kvalita českých odrůd ječmene a chmele podmiňuje nezaměnitelné vlastnosti našich piv. Pivovarnictví má u nás již dlouholetou tradici, proto není divu, že piva „českého typu“ jsou žádaná a velmi oblíbená také v zahraničí. Jsou charakteristické svou výraznou hořkostí, silným řízem a plností, zlatavou barvou a kompaktní bohatou pěnou.

Pivo je také ceněné pro svou nutriční vyváženost, jelikož obsahuje sacharidy, dusíkaté látky, lipidy, polyfenolické a heterocyklické látky, glycerol, barviva a v neposlední řadě vitaminy. V rámci této práce jsou nejpodstatnější vitaminy B-komplexu, což je souhrnné označení pro vitaminy skupiny B. B-komplex tvoří konkrétně vitamin B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (kyselina nikotinová a její amid), B₅ (kyselina pantotenová), B₆ (pyridoxin), B₇ (biotin), B₉ (kyselina listová) a vitamin B₁₂ (kobalamin). Jedná se o esenciální látky, které společně zajišťují správnou funkci metabolismu a vyznačují se výbornou rozpustností ve vodě. Pivo, pokud je konzumováno střídavě a nepřevažuje negativní vliv alkoholu, pomáhá předcházet celé řadě onemocnění. Hlavními zdroji těchto vitaminů jsou kvasnice, celozrnné obiloviny, maso, luštěniny, sýry a ořechy.

V této diplomové práci bylo cílem analyzovat množství vybraných vitaminů B ve třech, různě technologicky upravených, skupinách piv. Jednalo se o piva pasterizovaná, filtrovaná (dále skupina PF), piva nepasterizovaná, filtrovaná (dále skupina NPF) a piva nepasterizovaná, nefiltrovaná (NPNF). I přes mnohaletou historii velkých pivovarů, se v poslední době zvyšuje počet minipivovarů, které se zaměřují na výrobu tzv. „živých piv“. Tato piva postrádají postfermentační úpravy jako filtraci a pasterizaci. Nabízí se otázka, zda postfermentační úpravy snižují obsah vitaminů v pivu a ovlivňují tak nutriční hodnotu piva nebo je jejich vliv nevýznamný. K zodpovězení této otázky byla využita optimalizovaná a následně validovaná technika HPLC. Vysoce účinná kapalinová chromatografie je moderní separační technika, kterou lze analyzovat látky polární a nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Experimentálně získaná data byla zpracována statistickou metodou analýzou rozptylu, což usnadnilo posouzení rozdílných koncentrací vitaminů mezi jednotlivými skupinami piv. Výsledky byly diskutovány a porovnány s odbornými studiemi jiných autorů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na výrobu piva, postfermentační úpravy piva a v neposlední řadě na charakteristiku jednotlivých vitaminů v pivu. Taktéž je uvedena charakteristika metody, která byla následně využita v experimentální části.

2.1 Historie vaření piva

Počátek vaření piva zasahuje hluboko do historie lidstva. Pivo nebo pivu podobný nápoj vařili již staří Sumerové zhruba před pěti až šesti tisíci lety před naším letopočtem. První zmínky o pěstování chmele, výrobě sladu a samotného piva v Čechách pochází z 11. a 12. století. Na území České republiky má pivovarnictví dlouholetou tradici a české pivo je pro svou kvalitu dodnes celosvětově uznávané [1]. Proto dnes z hlediska celkové produkce piva zaujímá Česká republika ve světě 17. místo. Jedná se o slabě alkoholický nápoj, který se vyrábí kvašením cukernatého chmeleného roztoku, přičemž zdrojem cukru, potřebného během fermentačního procesu, jsou škrobnaté suroviny. Nejčastěji využívaným zdrojem škrobu u nás je sladový ječmen. Na základě velmi dobré dostupnosti chmelu a ječmene, exportuje Česká republika nejen pivo, ale také chmel a slad.

2.2 Suroviny pro výrobu piva

Mezi čtyři základní suroviny pro výrobu piva patří voda, ječmen, ze kterého se vyrábí slad, chmel a pivovarské kvasinky (obrázek 1). Pouze z kvalitních surovin může vzniknout kvalitní pivo, proto je důležité, aby byly tyto základní suroviny, včetně nezbytných pivovarských kvasinek blíže představeny.



Obrázek 1: Základní suroviny pro výrobu piva [2]

2.2.1 Voda

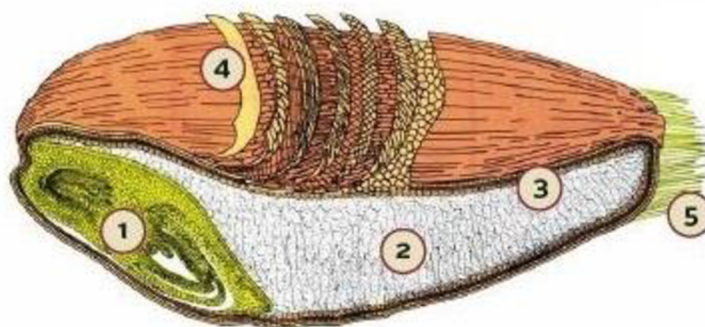
Voda je zásadní surovina potřebná pro výrobu piva, jelikož tvoří 92 % finálního produktu. Velký důraz je tedy kladen na složení používané vody a jsou vyžadovány její stálé, v průběhu roku se neměící, fyzikální, chemické a mikrobiologické vlastnosti. Na základě toho, v jaké fázi technologického procesu je voda využita, rozlišujeme tři druhy vod: varní, mycí a sterilační, provozní. Varní voda musí splňovat požadavky na vodu pitnou, především z hlediska zdravotní a hygienické nezávadnosti. Mycí a sterilační voda slouží pro výplachy

a sterilaci. Pro zvýšení baktericidního účinku je tato voda obohacována chlorem, čímž je zbavena veškerých mikroorganismů a chemických kontaminantů. Použití provozní vody závisí na požadavcích jednotlivých operací a zařízení, kde byla voda aplikována. Pivovary a sladovny patří v potravinářském průmyslu k největším spotřebitelům vody, proto je její dostupnost naprosto zásadní. Obecně vzato pochází voda dostupná pro pivovary buďto z povrchových zdrojů, tedy řek, jezer a přehrad, nebo se jedná o spodní vody pocházející z různých studní či vrtů. I v těchto případech musí být nároky kladené na vlastnosti pitné vody splněny. Povrchové vody obsahují v porovnání s vodami spodními větší množství kontaminantů. Příčinou je současný nárůst znečištění životního prostředí, v jehož důsledku se stává úprava povrchových vod technologicky náročnější. Pro posouzení, zda je voda vhodná ke konkrétním technologickým aplikacím, byl v praxi zaveden pojem „tvrdost vody“. Tento pojem označuje množství rozpuštěných solí ve vodě, přičemž největší podíl představují soli vápníku a hořčíku. Uhličitanová tvrdost vody zahrnuje obsah hydrogenuhličitanů vápníku a hořčíku, které v průběhu chmelovaru odštěpují oxid uhličitý za vzniku nestálých uhličitánů. Delší doba varu pak způsobí jejich úplné vyloučení z roztoku. Neuhličitanová tvrdost vody je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi kyseliny sírové, chlorovodíkové a dusičné, jejichž stabilita není ovlivněna varem. Složení varní vody, především zastoupení iontů, je významné z hlediska procesu výroby piva. Během rmutování a chmelovaru dochází k interakci látek obsažených v mladině s kationty (Ca, Mg, Mn, Fe, Na, K) nebo anionty vody (HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- , NO_2^-) [3]. Neopomenutelnou součástí varní vody jsou také rozpuštěné plyny – oxid uhličitý, kyslík, chlor a sulfan.

2.2.2 Ječmen

Další zásadní surovinou pro výrobu piva je sladovnický ječmen, z kterého se pomocí technologických úprav, máčením a klíčením obilky ječmene, získává slad. Slad je tedy označení pro naklíčené a usušené obilné zrna používané jako výchozí surovina při vaření piva. Ječmen (rod *Hordeum*) se řadí do říše rostlin, oddělení semenných (*Spermatophyta*), pododdělení krytosemenných (*Angiospermae*), třídy jednoděložných (*Monocotyledonae*) a čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) [4]. Z hlediska způsobu růstu lze ječmen rozdělit na planě rostoucí a kulturní. Mezi kulturní se řadí ječmen setý (*Hordeum vulgare*), který je hospodářsky nejvýznamnější. Kulturní ječmen je jednoletá jarní či ozimá obilnina, u níž dle uspořádání klasu rozlišujeme skupinu dvouřadých a víceřadých ječmenů. Do skupiny dvouřadých patří ječmen, který slouží pro sladovnické i krmné účely a na základě délky klasového větve rozeznáváme ječmen níčí, vzpřímený a paví. Pro výrobu pivovarského sladu se v Evropě osvědčily ječmeny dvouřadé níčí (*Hordeum distichum*, var. *nutans*).

Rostlina ječmene se skládá z kořenové soustavy, stébla, listů a květů. V rámci sladařského průmyslu nás zajímá využití ječného zrna, obilky. Vnější vrstvu obilky tvoří obalové části (pluchy a plušky), poté zárodek (klíček či embryo), který ve fázi klíčení rozhoduje o aktivaci enzymů v celém zrně, a v neposlední řadě endosperm, který zaujímá největší část obilky (obrázek 2). Tzv. aleuronová vrstva představuje svrchní vrstvu endospermu, která je bohatá na bílkoviny, tuk a zčásti na škrobová zrna. Škroby - zásobní sacharidy, se nacházejí ve vnitřním endospermu [4].



Obrázek 2: Obilka – 1) kliček, 2) endosperm, 3) aleuronová vrstva, 4) obalové vrstvy, 5) chlupy (trichomy) [5]

V závislosti na poměru škrobu a dusíkatých látek v endospermu, lze posuzovat jeho charakter, tzv. moučnatost nebo sklovitost. Během růstové fáze ječmene jarního dochází ke snížení množství biogenních prvků v půdě. Konkrétně se jedná o dusík, fosfor, draslík a hořčík. Vegetační doba ječmene jarního trvá v našich klimatických podmínkách průměrně 100–120 dní [4]. Pro výnos a kvalitu zrna je rozhodující konečná fáze, tedy období tvorby a zrání zrna. Veškeré vlastnosti sklizeného zrna však závisí na půdních a klimatických podmínkách, hnojení, ošetřování a skladování. U sladovnického ječmene je posuzován nejen výnos, odolnost, náročnost, ale zejména chemické složení a vhodnost pro výrobu sladu.

Z hlediska chemického složení se sleduje především obsah vody, škrobu, extrahovatelných látek a bílkovin. Ječmen obsahuje 80–88 % sušiny a 12–20 % vody. U kvalitních odrůd sladovnických ječmenů zaujímá škrob 62–65 % sušiny. Ječný škrob je v podobě granulí lokalizován v endospermu. Každá tato granule je obalená mikroskopickými vrstvami bílkovin, lipoproteinů a lipidů. Neškrobové polysacharidy, hlavně celulóza, hemicelulóza, pentosany a lignin tvoří malý podíl ječného zrna. Celulóza tvoří hlavní stavební složku obalových pluch, zatímco hemicelulózy zajišťují pevnost buněčných stěn. Hemicelulózy v endospermu obsahují 75 % β -glukanů a 25 % pentosanů, přičemž v obalové vrstvě je složení opačné. Pro své pozitivní účinky na lidský organismus jsou β -glukany v potravinářství žádané, avšak v pivovarnictví jejich vysoký obsah komplikuje zpracování sladu, a to sníženou dostupností škrobových zrn enzymům, zvýšením viskozity sladiny a snížením koloidní stability piva. Zvýšení viskozity sladiny může znesnadnit filtraci, přispět k tvorbě zákalů nebo sraženin, což negativně ovlivní stabilitu piva. Bílkoviny, jejichž obsah je optimálně v rozsahu 10,5–11,5 % se vyskytují ve formě albuminů, globulinů, hordeinů a glutelinů, a to převážně v aleuronové vrstvě. V kličku jsou pak přítomny nebílkovinné dusíkaté složky. Z technologického hlediska jsou důležitými složkami sladovnického ječmene enzymy, přítomné jak v latentní, tak aktivní formě. Pro sladařský průmysl jsou nejdůležitější hydrolytické enzymy – amylasy, proteasy a fosfatasy [3].

Nutriční hodnota ječmene spočívá vedle obsahu některých antioxidantů, minerálních látek, neškrobových polysacharidů a ligninu v přítomnosti vitamínů skupiny B. Vitamíny B₁, B₂, B₃ a B₅ jsou spolu s vlákninou lokalizovány v obalové vrstvě ječného zrna [6]. Tyto ve vodě rozpustné vitamíny jsou v ječném zrně (61,33 g) obsaženy v následujícím množství: vitamin B₁ – 0,40 mg, B₂ – 0,17 mg, B₃ – 2,82 mg (NE – 4,95 mg), B₅ – 0,17 mg, B₆ – 0,20 mg a B₉ – 11,65 µg [7].

2.2.3 Slad

Slad, jakožto velmi podstatná surovina pro výrobu piva, se nejčastěji vyrábí z ječmene, který je ceněn pro svou snadnou klíčivost, zpracovatelnost sensorické vlastnosti. Pro výrobu piva upřednostňujeme slady z jarního ječmene. Důležitým kritériem jakosti sladu je kvalita a čistota pěstované odrůdy, která vstupuje do výrobního procesu, jelikož hlavní podíl extraktivních látek pochází ze sladu. Následnými technologickými postupy se zvyšuje odolnost piva proti nebiologickým zákalům, spolu se stabilitou konečného produktu. Mezi faktory ovlivňující chemické složení sladu patří vlhkost, která nesmí dosáhnout více než 6 %, obsah extraktu, jenž ovlivňuje průběh kvašení, obsah škrobu ve škrobových granulích, jejichž obsah tvoří až 98 % čistého škrobu, dusíkaté látky, neškrobové polysacharidy, lipidy, polyfenoly a další, ve sladu obsažené látky [3]. Nejrozšířenějšími druhy jsou světlé slady plzeňského typu, z kterých se vyrábí světlé piva a tmavé slady mnichovského typu pro výrobu tmavých piv. K obohacení vlastností základních typů sladů, existují některé speciální typy, jako např. karamelový, čokoládový nebo vídeňský slad.

2.2.4 Chmel

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus L.*) se stal dosud nenahraditelnou surovinou při výrobě piva, kterému dodává typickou hořkost a aroma. Na základě těchto vlastností se pivo odlišuje od jiných alkoholických i nealkoholických nápojů. Mezi nejdůležitější složky chmele patří chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly, přičemž nejintenzivnější hořkost přináší zejména produkty izomerace α -hořkých kyselin. Hlavními částmi chmelové rostliny jsou kořenová soustava, réva s pazochy, listy a květenství, z nichž se v průběhu vegetace vyvíjí chmelové hlávky (obrázek 3). Pro pivovarské účely jsou pěstovány samičí rostliny, v jejichž květenství se nachází výše zmiňované sensoricky cenné látky. Obecně se jedná o mnohaletou rostlinu, pro jejíž růst jsou ideální podmínky v oblasti mírného pásma severní polokoule [3].



Obrázek 3: Chmelové hlávky [8]

Chemické složení chmelu se může lišit na základě odlišné odrůdy, či místa pěstování, avšak obecně se udává 10,0 % vody, 15,0 % pryskyřic, 4,0 % polyfenolových látek, 0,5 % silic, 3,0 % vosků a lipidů, 15,0 % dusíkatých látek, 44,5 % sacharidických látek a 8,0 % minerálních látek [3]. Vitamíny skupiny B jsou obsaženy pouze ve výhoncích chmele, což znamená, že nijak neovlivňují množství vitamínů přítomných v pivu.

Sběr chmelu, neboli chmelových hlávek probíhá na rozhraní měsíce srpna a září. Při nežádoucím opylení může být součástí chmelové hlávky semeno, jehož přítomnost je z hlediska kvality pivovarského chmelu nežádoucí. Ihned po sčesání je nutné chmel usušit, což je nejjednodušší konzervační úprava pro jeho skladování. Obsah vody v čerstvém chmelu, který dosahuje 70–80 %, je třeba snížit ideálně až na 10 % [3]. Za těchto podmínek si chmel zachovává původní barvu, lesk a vůni. Dalšími procesy, které mohou výrazně ovlivnit vlastnosti této pivovarské suroviny, jsou balení a skladování. Vzhledem k náročnosti chmelu na světlo, vláhu a teplotu se skladuje v temných místnostech, přibližně při 0 °C, v balotech umístěných na dřevěných či kovových paletách pro zamezení styku s vodou. V neposlední řadě je nutné omezit přístup vzdušného kyslíku, v jehož důsledku dochází k oxidačním změnám pryskyřic a silic, což dává pivu nepříjemnou hořkost a vůni.

2.3 Technologie výroby piva

Technologii výroby piva lze rozdělit do dvou částí: příprava sladu a výroba piva. Každá z těchto částí se skládá z několika dalších kroků. Příprava sladu zahrnuje čištění a třídění sladu, máčení, klíčení a hvozďení ječmene. Výroba piva sestává z výroby mladiny, hlavního kvašení, dokvašování a zrání. Mezi postfermentační úpravy patří filtrace a pasterizace, po kterých následuje stáčení a plnění piva do transportních obalů.

2.3.1 Příprava sladu

Slad, jak už bylo dříve zmíněno, je základní surovinou pro výrobu piva. Nejčastěji je získáván technologickými úpravami ječmene, s cílem aktivovat enzymy, které jsou nutné pro přeměnu škrobu na jednoduché cukry a získat tak vhodné sensorické vlastnosti sladu. Celý postup výroby sladu se skládá z jednotlivých operací, které budou následně popsány.

Příjem, čištění a třídění ječmene

Ječmen je přijímán z valníků, nákladních automobilů nebo vagónů do příjmového koše, odkud je pomocí elevátorů, šnekových dopravníků či dopravních pásů transportován k přečištění, čištění a následnému uložení do sil. Přijímaný ječmen obsahuje množství nečistot, které se odstraňují ve dvou krocích, a to předčištěním a čištěním. Předčištění je realizováno ještě před umístěním ječmene do přijímacích zásobníků. V tomto kroku dochází k odstranění prachu, lehkých a kovových částí. Následně je předčištěný ječmen dopraven na čističku, kde je zbaven nejprve hrubých nečistot, dále pak cizích příměsí a nakonec pluch, slámy a písku. Půlky ječných zrn a kulatá zrna plevelů jsou odstraněna na tzv. triéru, což válec s vyraženými důlky, které mají menší průměr než zrna ječmene.

Třídění vyčištěného ječmene probíhá na základě velikosti zrn. Tento krok má z technologického hlediska velký význam, jelikož napomáhá docílení jednotného máčení, klíčení a získání dokonale homogenního sladu. Vyčištěný a vytríděný ječmen je vhodné

upravenou surovinou, která je připravena k uskladnění v silech nebo sýpkách. Při skladování ječmene je důležité dbát na teplotu a vlhkost prostředí. Tyto dva faktory výrazně ovlivňují procesy, které se odehrávají při skladování v zrně, jakožto živém organismu. Nežádoucím podmínkám lze předejít aktivním větráním, kterým se zvyšuje doba skladovatelnosti až na dvojnásobek [4].

Máčení ječmene

Podstatou máčení vytříděných ječných zrn je zvýšení obsahu vody při teplotě 14–18 °C, čímž se zahájí enzymatické reakce a následné klíčení zrna [9]. Tento proces trvá 2 dny, přičemž nejrychleji je voda absorbována v prvních 4-8 hodinách. Výrazný vliv má teplota vody, jelikož se s její rostoucí hodnotou zvyšuje také rychlost absorpce. Během máčení je nutné zrno provzdušňovat, stejně jako obměňovat máčecí vodu. V opačném případě by vznikající oxid uhličitý mohl nepříznivě ovlivnit aerobní dýchání zrna nebo dokonce zastavit proces klíčení. Cílem máčení je dosažení optimálního stupně domočení, který se pro jednotlivé typy sladů liší. Máčení je užitečné také díky odstranění prachu, umytí zrna a vyloužení některých nežádoucích látek [10, 11].

Klíčení ječmene

Cílem sladařského klíčení je dosažení požadovaného stupně rozluštění zrna, společně s aktivací a syntézou několika technologicky významných enzymů. Mezi enzymy, které v zrně způsobují řadu změn, patří cytolytické, proteolytické a amylolytické enzymy. Výslednou kvalitu sladu ovlivňuje teplota klíčení, která se pohybuje v rozmezí 17–25 °C, společně s relativní vlhkostí vzduchu, jejíž hodnota by měla být udržována na 85–95 %. Jak již bylo zmíněno, je nutné zajistit intenzivní větrání, bez něhož by mohlo dojít k úplnému zastavení tohoto procesu. Během klíčení dochází ke vzniku zárodků kořínků a listů, k čemuž je zapotřebí obrovské množství energie a zásobních látek, které jsou čerpány z endospermu zrna. Klíčením aktivované cytasmy způsobují měknutí zrna resp. jeho cytolytické rozluštění, a to v důsledku předchozího narušení endospermu, který je bohatý na škrob a makromolekuly bílkovin. Škroby obsažené v endospermu jsou štěpeny působením amylas na maltosu a glukosu, které jsou dále prodýchávány za tvorby energie potřebné k životním funkcím zrna. Tyto nízkomolekulární látky později ovlivňují sensorické vlastnosti finálního produktu. Klíčení ječmene probíhá klasicky na humnech, tedy na hladkých podlahách v prostorných místnostech. Celý proces trvá zhruba 5 dní a koncovým produktem je zelený slad [9, 10].

Hvozdění ječmene

Pro další zpracování zeleného sladu, je nutné snížit obsah vody v zrně, a to z více než 40 % na méně než 5 %, s cílem zachování enzymatického potenciálu (vytvořeného během klíčení), avšak zastavení vegetačních pochodů a změn. Sušením a hvozděním sladu navíc vznikají barevné a chuťové látky, jež určují charakter sladu. Jedná se zejména o melanoidiny, které vznikají při vyšších teplotách jako produkty reakce aminokyselin s redukujícími sacharidy, tzv. Maillardovy reakce. Tyto sensoricky cenné látky vznikají při procesu hvozdění. Zprvu probíhá sušení při teplotách v rozmezí 20–60 °C za dostatečného přísunu vzduchu a následně hvozdění, které je klasifikováno do třech fází – růstové, enzymové a chemické. V závislosti na typu sladu jsou teploty hvozdění v rozmezí 60–80 °C pro slad světlý a 60–105 °C pro slad

tmavý. V růstové fázi (do 40 °C) probíhají všechny vegetační pochody, enzymová fáze (do 60 °C) pozastavuje vegetační pochody, se zachováním enzymatické aktivity a v poslední, tedy chemické fázi (nad 60 °C) vznikají již zmíněné aromatické a barevné látky [4, 10].

Odkličování a skladování sladu

Po hvozdění je slad dopravován k odkličovače, kde je mechanicky zbaven kořínků a klíčků, tzv. sladového květu. Odkličovaný slad je dále chlazen a následně uložen do sladových sil, kde se před vlastním zpracováním nechává 4–6 týdnů odležet [4].

2.3.2 Výroba piva

Výroba piva sestává z několika výrobních kroků: výroby mladiny, hlavního kvašení, dokvašování a zrání piva (obrázek 4). Poté přicházejí na řadu závěrečné úpravy, filtrace a pasterizace, zakončené finálním plněním příslušných nádob.

Příprava mladiny

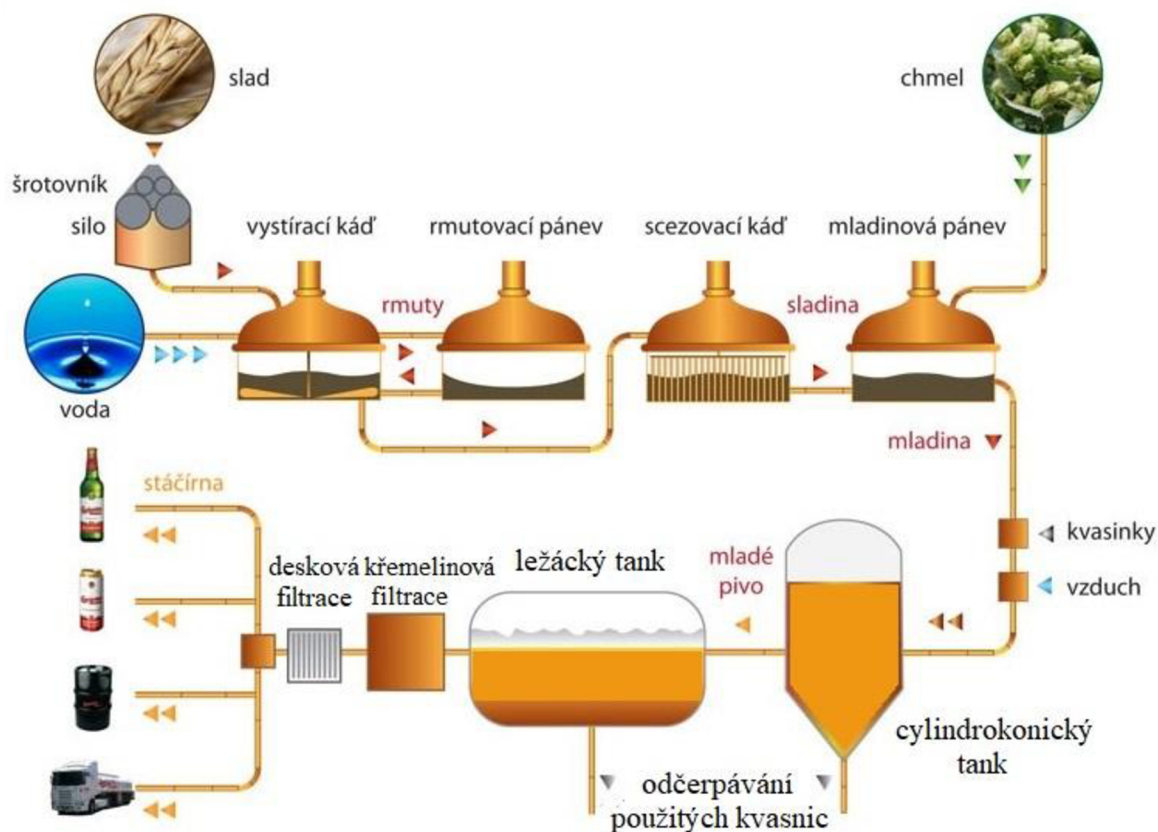
Připravený slad je společně s vodou a chmelem, popř. chmelovými přípravky použit pro výrobu mladiny. Tento proces se odehrává ve varně pivovaru a zahrnuje několik kroků: šrotování sladu, vystírání, rmutování, scezování sladiny, vyslazování sladového mláta, chmelovar a konečné úpravy mladiny [2].

Šrotování sladu

Šrotování, nebo-li mletí sladu je prováděno ve šrotovnicích, což představuje mechanické rozdrčení zrna na jemnější a hrubší části, za současného zachování pluch. Tyto obalové části zrn slouží jako filtrační vrstva při scezování. Během šrotování je zpřístupněn endosperm zrna, včetně obsažených extraktivních látek, což urychluje jejich rozpouštění a endosperm je tak připraven pro následné fyzikálně-chemické a enzymové reakce [2, 6, 7].

Vystírání sladu

Všechny následující procesy probíhají již ve varně. Na šrotování sladu navazuje vystírání, jehož cílem je smíchání sladového šrotu s nálevem varní vody ve vystíracích nádobách. Důležitým parametrem při vystírání je teplota vody, která ovlivňuje rychlost průběhu nadcházejících rmutovacích postupů. Dle teploty rozlišujeme studené vystírání s teplotou vody pod 20 °C, teplá vystírka poskytuje vodu s teplotou 35–38 °C a při horkém vystírání dosahuje voda teploty 50–62 °C [3]. Pokud do hlavního nálevu, tedy množství vody potřebného k vystření, přidáme horkou vodu, říkáme, že byla provedena zapárka.



Obrázek 4: Schéma výroby piva [12]

Rmutování sladu

Pro rmutování je charakteristické rozštěpení a převedení optimální části extraktu sladu do roztoku, a to v množství, které je potřebné k zajištění kvality mladiny a piva obecně. Za nejpodstatnější proces rmutování považujeme štěpení škrobu pomocí amylolytických enzymů za vzniku zkvasitelných sacharidů. Mezi další sladové enzymy patří proteolytické, kyselinotvorné a oxidačně-redukční enzymy. Z technologického hlediska existuje několik významných teplot rmutování. Je to kyselinotvorná teplota (35–38 °C), která podporuje rozpuštění látek extraktu a jejich následné zpřístupnění sladovým enzymům, dále peptonizační teplota (45–50 °C), jež je získána zápačkou při vystírání. Vzhledem k tomu, že při těchto teplotách dochází k proteolýze, štěpení fosforečnanů a β -glukanů, dochází k nepřímému podpoření amylolyzy v následujících fázích rmutování. Při nižší cukrotvorné teplotě (60–65 °C) se projevuje aktivita β -amylasy a dochází k nárůstu redukujících cukrů, zatímco vyšší cukrotvorná teplota (70–75 °C) je optimální pro působení α -amylasy. Ve chvíli, kdy nastane teplotní rozmezí 76–78 °C je tzv. odrmutovací teplotou ukončen proces rmutování [3, 4].

Scezování sladin

Další operací pro přípravu mladiny je scezování. Jedná se o časově velmi náročný proces, při kterém dochází nejprve k oddělení roztoku s obsahem sladových extraktivních látek, tzv. předku (sladiny) od mláta, což představuje zbytek sladového šrotu. Sladina se od mláta odděluje ve speciálních scezovacích kádích, a to přirozenou filtrací, kde plní pluchy

funkci jemného filtru. V následujícím kroku je mláto louhováno pomocí horké vody o teplotě 75 až 78 °C, s cílem uvolnění extraktu, který zůstal zachycen na pluchách [3]. V tomto případě mluvíme o vyslazování. Získaná sladina by měla být ideálně čirá, s maximálním podílem extraktu [13].

Chmelovar

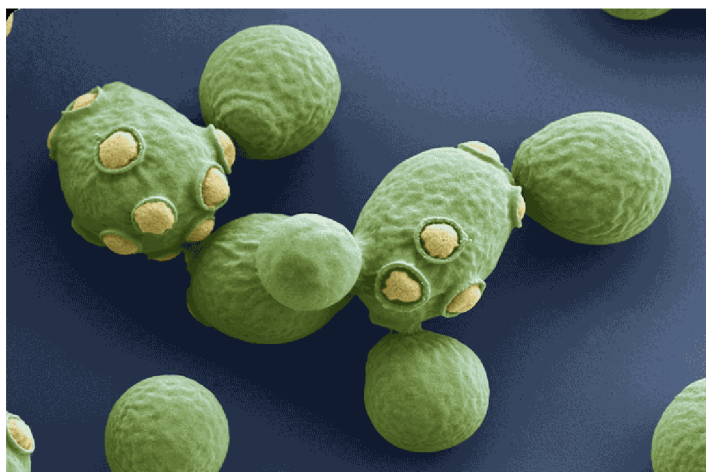
Chmelovar, tedy vaření sladiny s chmelem, zahrnuje řadu fyzikálních, chemických a biochemických reakcí, jejichž výsledným produktem je mladina. K tomu, abychom dosáhli požadovaného složení mladiny, je potřeba sladinu s chmelem vařit po dobu 90–100 min, kdy dochází k odpaření přebytečného množství vody, inaktivaci enzymů, sterilaci mladiny, koagulaci výšemolekulárních dusíkatých látek a oxidačně-redukčním reakcím, včetně uvolnění a reakce α -hořkých kyselin chmele do roztoku za vzniku iso- α -hořkých kyselin, které jsou nositeli intenzivní hořkosti. Dochází také k uvolnění polyfenolů, dusíkatých látek, lipidů a dusičnanů, stejně tak k Maillardově reakci, při které vznikají sensoricky cenné látky, a k zvýšení acidity, tedy snížení pH. Z hlediska chemického složení obsahuje mladina velké množství sacharidů (glukosu, maltosu, maltotriosu, dextriny, malé podíly β -glukanů a pentosanů), dále dusíkaté látky, chmelové a minerální látky, polyfenoly a v neposlední řadě vitamíny. Množství jednotlivých vitaminů skupiny B obsažených v mladině uvádějí např. [14, 15, 16]. Pro vitamin B₁ je uvedeno množství 0,28–0,75 mg/l, B₂ je obsažen v množství 0,33 až 0,90 mg/l, pro vitamin B₃ byla stanovena hodnota 8–18 mg/l a koncentrace vitamínu B₅ je 0,48–0,98 mg/l. Množství 0,59–1,05 mg/l je uvedeno pro vitamin B₆ a pro vitamin B₉ 0,10 až 0,13 mg/l. Vitamin B₁₂ byl zaznamenán pouze ve stopových množstvích.

Připravená mladina musí projít několika úpravami, mezi které patří separace hrubých kalů ve vířivých kádích, poté chlazení mladiny, separace jemných kalů a na závěr provzdušnění mladiny.

Hlavní kvašení mladiny a dokvašování piva

Po provzdušnění a zchlazení mladiny na zákvasnou teplotu, která se dle typu kvašení pohybuje v rozmezí 5–18 °C [10], je možné přidat pivovarské kvasinky, čímž se zahájí fermentace mladiny. Proces fermentace probíhá ve dvou stupních. Nejprve dochází k pomnožení kvasinek, a to v takové koncentraci, která zajistí zkvašení významného podílu využitelných látek mladiny. Během hlavního kvašení jsou cukry obsažené v mladině fermentovány pomocí enzymů kvasinek za vzniku ethanolu, oxidu uhličitého a vedlejších produktů, jako např. esterů, alkoholů či mastných kyselin, které ovlivňují charakteristické vlastnosti piva. Vzniká také oxid siřičitý, který působí jako antioxidant [17, 18, 19].

Podle použitých kmenů kvasinek rozlišujeme spodní (*Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*) a svrchní kvašení (*Saccharomyces cerevisiae*) [1]. Kvašení pomocí svrchních pivovarských kvasinek probíhá při teplotách 15–23 °C a je uplatňováno zejména při výrobě pšeničných piv [20]. Po ukončení tohoto typu kvašení jsou kvasinky vyneseny vzniklým oxidem uhličitým na hladinu a vytváří tzv. deku (hustou pěnu). Naproti tomu spodní pivovarské kvasinky (obrázek 5) jsou vhodné pro výrobu piv plzeňského typu, s teplotou kvašení v rozmezí 6–12 °C a po ukončení kvašení sedimentují na dno kvasných nádob [21].



Obrázek 5: Buňka Saccharomyces cerevisiae [22]

Dokvašování a zrání mladého piva se uvádí jako druhý stupeň fermentace, který se provádí v ležáckém sklepě, kde při teplotách 1–3 °C pivo velmi pozvolna dokvašuje, číří se, zraje a sytí se pod tlakem oxidu uhličitého vznikajícího v uzavřeném ležáckém tanku. Tento proces je velice důležitý, jelikož se vytváří vazba oxid uhličitého na bílkovinné složky piva, což mu dodává jeho charakteristický říz. Doba ležení je závislá na druhu vyráběného piva, u běžných piv bývá 3 týdny, avšak pro speciální exportní piva může trvat až několik měsíců. Současné moderní technologie umožňují, aby kvašení a dokvašování probíhalo v jedné nádobě – cylindrokónickém velkoobjemovém tanku. To klade vysoké nároky na hygienu, sanitaci a dodržování technologického postupu, avšak z ekonomického hlediska je využití CK tanků velmi výhodné [23].

2.3.3 Postfermentační úpravy

Postfermentační úpravy, filtrace a pasterizace, předchází finálnímu stáčení a plnění piva do transportních obalů. Tyto technologické operace slouží k zajištění stability a trvanlivosti výrobku.

Filtrace

Filtrace zaujímá ve výrobě piva významné postavení. Pomocí filtrace se z dokvašeného piva odstraní zákalotvorné látky a zbylé kvasničné buňky, čímž se docílí požadované čirosti a zvýšení biologické a koloidní trvanlivosti. Pro splnění požadavků spotřebitele je nutné dbát právě na stabilitu a čirost piva, přičemž nesmí dojít ke snížení pěnivosti ani zvýšení obsahu kyslíku a kovových iontů v pivu, které by mohlo podpořit nežádoucí oxidační reakce při skladování [3].

Obecně je filtrace jedním ze základních procesů, které se hojně využívají ve většině potravinářských technologiích. Podstatou této separační metody je oddělení pevných dispergovaných částic z kapalně nebo plynně suspenze. Klíčovou roli zde hraje vhodná filtrační přepážka, která slouží k zachycení částic a následnému vytvoření „filtračního koláče“. Na základě rozdílných tlaků před a za přepážkou prochází kapalný podíl póry filtračního koláče, čímž docílíme zisku filtrátu. V pivovarnictví se jako filtrační materiál používá zejména křemelina a perlit. Pivo však filtrujeme pomocí křemeliny, zatímco perlity

jsou využívány k filtraci sladiny. Oxid křemičitý a schránky sladkovodních rozsivek jsou hlavními složkami křemeliny. Významným fyzikálním kritériem křemelin je permeabilita, která závisí na její jemnosti. Platí, že čím jemnější křemelinu použijeme, tím ostřejší filtrace dosáhneme. Mezi významná kritéria patří také porozita. Perlit, nebo-li vulkanické sklo, je z chemického hlediska křemičitan hlinitý, který v malém množství obsahuje příměsi Fe_2O_3 , Al_2O_3 , $\text{CaO}+\text{MgO}$ nebo $\text{Na}_2\text{O}+\text{K}_2\text{O}$. Při nižších hodnotách pH, uvolňují perlity železo a vápník, proto se jejich použití uplatňuje pouze pro sladinu, jejíž pH se pohybuje v rozmezí 5,4–5,5 [4, 24].

Pasterizace piva

Cílem tohoto tepelného zákroku je zajištění biologické stability piva. Dochází k tepelné inaktivaci přítomných mikroorganismů, které negativně ovlivňují kvalitu piva. Pasterizaci vynalezl v roce 1865 Louis Pasteur, který již ve své studii upozorňoval na možné poškození organoleptických vlastností. Tento poznatek dokazuje, že už tenkrát byla „pasterizační chuť“ považována za nevýhodu jinak velmi úspěšného procesu. Účinnost pasterizace závisí jak na mikrobiologické čistotě piva, tak na fyzikálně-chemických vlastnostech média. Mezi vlastnosti ovlivňující růst mikroorganismů patří množství ethanolu a oxidu uhličitého v médiu, pH a mnoho dalších. Při ošetření kyselých kapalin se volí nižší teploty než u neutrálních či zásaditých, proto u piva používáme teploty 60–62 °C po dobu 10–20 minut [25, 26]. Záhřevem na vyšší teploty však dosáhneme delší trvanlivosti, chuťové a koloidní stability piva.

V pivovarském průmyslu se používá tunelová a průtoková pasterizace. Při tunelové pasterizaci vstupují láhve do tunelového pasteru, kde dochází k prohřívání obalu a od něj samotného piva. V tunelovém pasteru existují sprchové zóny, které se liší teplotou. Těmito zónami prochází láhve na pásech nebo posuvných roštech. Náchylnost skla při změnách teplot je důvodem postupného ohřevu a chlazení láhví s pivem. Při ohřívání na pasterizační teplotu přidáváme 3 °C za minutu a při ochlazování snižujeme teploty každou minutu o 2 °C [3]. Působení pasterizační teploty trvá 20 minut, avšak průchod lahví pasterem téměř 1 hodinu.

Průtoková pasterizace značí krátkodobé zahřátí tenkého filmu piva v několika sekcích deskového výměníku. Tento způsob pasterizace využívá teplotu 68–70 °C, a to po dobu 30 až 40 sekund [3]. Poté je aplikováno okamžité ochlazení. Průtokový paster se dělí dle funkce do třech sekcí. Čerpadlem je pivo hnáno do regenerační sekce, kde je předehříváno horkým pivem, které sotva opustilo teplotní výdržník. Pasterizační teploty pivo dosáhne v ohřívací sekci, kterou si udržuje během průchodu výdržníkem. Při opětovném průchodu regenerační sekci, je část tepla předána právě vstupujícímu pivu. Dochlazování probíhá v chladičí sekci. Důležitou funkci zastává vyrovnávací tank, který slouží ke kompenzaci změn průtoku piva, nebo umožňuje cirkulaci piva při přerušení jeho odběru.

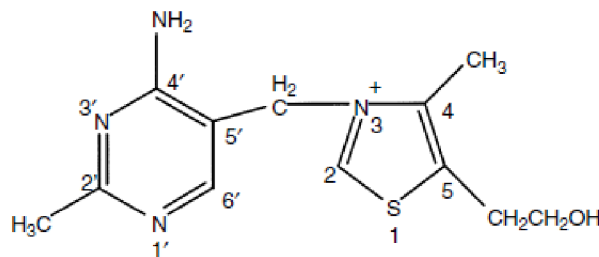
2.4 Vitaminy skupiny B v pivu

Vitaminy skupiny B zahrnují množství, ve vodě rozpustných sloučenin, které mají různou chemickou strukturu a biologickou roli. Člověk není schopen tyto sloučeniny syntetizovat, jsou tedy esenciální. Vitaminy skupiny B řadíme mezi netěkavé složky piva, které do piva vstupují z ječného sladu, přičemž největší nárůst jejich obsahu probíhá během klíčení ječmene. Stanovení vitaminů v různých vzorcích je poněkud obtížné v důsledku chemické nestability a složitosti matric, ve kterých se obvykle nacházejí [27, 28, 29].

2.4.1 Vitamin B₁ – Thiamin

Struktura a biologická funkce

Thiamin, známý jako vitamin B₁, je charakterizován pyrimidinovým kruhem vázaným methylenovým můstkem k 3-N atomu na substituovaném thiazolu (obrázek 6). Tento vitamin se vyskytuje ve formě volné báze nebo jako monofosfát (TMP), pyrofosfát (TPP) a trifosfát (TTP).



Obrázek 6: Struktura thiaminu ve formě volné báze [30]

Thiamin pyrofosfát, jakožto fyziologicky aktivní forma thiaminu, hraje zásadní roli v metabolismu sacharidů. Jako koenzym je součástí třech hlavních komplexů: komplexu pyruvát dehydrogenasy tvořeného třemi enzymy a katalyzující oxidativní dekarboxylaci pyruvátu za vzniku acetyl CoA. Komplexu α -ketoglutarát dehydrogenasy, který je strukturně podobný pyruvát komplexu a katalyzuje oxidativní dekarboxylaci α -ketoglutarátu. Transketolasa, v kombinaci s transaldolasou, zajišťuje důležité propojení pentosofosfátového cyklu a glykolýzy. U dalších, výše zmíněných forem thiaminu nebyla dosud identifikována žádná významná role [31, 32].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

Thiamin je jeden z nejméně stabilních, ve vodě rozpustných vitaminů. Maximální stability dosahuje v roztocích s pH 2–4, z čehož vyplývá, že největší ztráty při tepelném zpracování nastanou v neutrálním až bazickém prostředí. Stabilita vitaminu B₁ tedy závisí na rozsahu ohřevu a na charakteru potravinové matrice. Dwivedi a Arnold zjistili, že hlavní příčinou tepelné degradace je štěpení methylenového můstku za vzniku pyrimidinu a thiazolu. Reakce je ovlivněna přítomností kovových komplexů, zářením a thiaminásami [30].

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Potřebné množství thiaminu úzce souvisí s příjmem sacharidů, na jejichž metabolismu se thiamin podílí. Doporučená denní dávka (DDD) závisí také na věku, tudíž pro děti do 8 let je doporučeno množství 0,6 mg/den, pro ženy 1,1 mg/den, kojící ženy 1,4 mg/den a pro muže 1,2 mg/den [33]. Thiamin se v lidském organismu téměř neukládá, nadbytek je vylučován močí, a proto je denní příjem tohoto vitamínu velmi podstatný. Mezi symptomy mírného nedostatku u dospělých patří špatný spánek, nevolnost a podrážděnost při ztrátě hmotnosti. Pokud je příjem vitamínu přerušeno, dochází během 21 dní k těžkému deficitu, což může způsobit onemocnění označované beri-beri a Wernicke–Korsakoff syndrom [30, 34, 35].

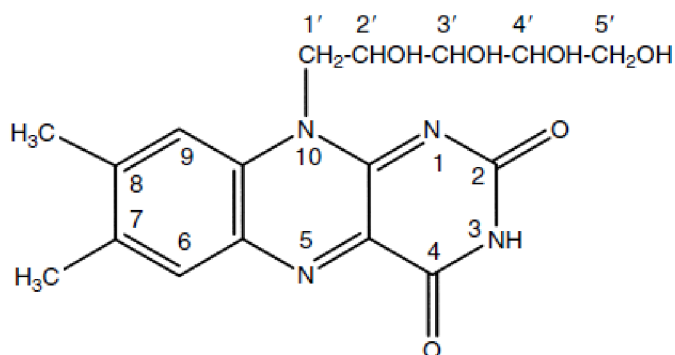
Zdroje, dostupnost

Thiamin je široce rozšířen v přírodních zdrojích, avšak v malém množství. Jako dobrý zdroj vitamínu B₁ jsou považovány především potraviny bohaté na sacharidy. Čtyři hlavní zdroje a jejich relativní přínos k celkovému příjmu jsou celozrnné obiloviny a produkty z nich (50 %), zelenina (20 %), maso (10 %) a mléčné produkty (10 %). Velké množství bylo nalezeno také v sušených pivovarských kvasnicích, které jsou schopné tento vitamín syntetizovat. V pivu se koncentrace thiaminu pohybuje v rozmezí 0,002–0,14 mg/l [36]. Obsah thiaminu je redukován tepelným ošetřením potravin, například chléb má o 20–30 % méně thiaminu než jeho suroviny a pasterizace snižuje obsah thiaminu v mléce až o 20 %. Vzhledem k rozpustnosti thiaminu ve vodě, dochází ke ztrátě významného množství např. při vaření zeleniny [34, 35].

2.4.2 Vitamin B₂ – riboflavin

Struktura a biologická funkce

Riboflavin, neboli vitamin B₂, je 7,8-dimethyl-10-(1'-D-ribityl)isoalloxazin, kde isoalloxazinový kruh je obecně známý jako flavinový kruh, jelikož tvoří základ struktury flavinů včetně riboflavinu. Flavínový kruh je methylován v poloze 7, 8 a substituován v poloze 10 postranním řetězcem D-ribitylu (obrázek 7). Riboflavin existuje jako volná látka, ale ve většině biologických materiálů jej najdeme ve formě koenzymů - flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninindinukleotid (FAD).



Obrázek 7: *Struktura riboflavínu ve volné formě [30]*

Tyto koenzymové formy riboflavinu jsou obecně asociovány s enzymovými komplexy a jako biologicky aktivní látky se účastní, v podobě katalyzátorů, redoxních reakcí v četných metabolických drahách a také při produkci energie. Většina flavoproteinových enzymů se podílí na komplexních respiračních procesech vyskytujících se v mitochondriích živých buněk [30, 34].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

V čistém stavu je slabě rozpustný ve vodě, a to v poměru 10-13 mg riboflavinu na 100 ml vody při teplotě 25 °C. Pokud je vitamin B₂ chráněn před světlem, je stabilní jak při ohřevu, tak při oxidaci, proto lze říci, že většina operací při zpracování potravin má malý vliv na jeho obsah. Jelikož stabilita vůči tepelné degradaci roste s rostoucím obsahem kyselin, maximální hodnoty dosahuje při pH 2–5 [30]. Vazba C-N spojující postranní řetězec D-ribitylu a isoalloxazinový kruh je odolná vůči kyselé hydrolyze, zatímco FMN a FAD jednoduše konvertují na riboflavin při pH nižším než 5. Na základě této skutečnosti je kyselá hydrolyza prvním krokem při kvantifikaci celkového riboflavinu, a naopak při kvantifikaci koenzymových forem je nutné se tomuto kroku vyvarovat [37].

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Zásoby vitamínu B₂ v těle jsou poměrně nízké, protože stejně jako u vitamínu B₁ je přebytek odváděn močí z těla ven. Biologická dostupnost souvisí s rozdíly stravitelnosti potravin živočišného a rostlinného původu, přičemž stravitelnost u živočišných produktů je mnohem vyšší. Doporučená denní dávka pro děti do 8 let je 0,6 mg, pro ženy 1,1 mg, pro kojící ženy 1,4 mg a pro muže 1,3 mg [33]. Příznaky nedostatku riboflavinu, známého také jako ariboflavinóza, zahrnují kožní onemocnění, onemocnění štítné žlázy, zánět tenkého střeva, depresivní nálady, reprodukční problémy, ztrátu vlasů a v neposlední řadě diabetes mellitus. Lidé s nedostatkem riboflavinu mají obvykle nedostatek jiných živin, proto některé z výše uvedených příznaků mohou odrážet další jiné nedostatky. Závažný nedostatek riboflavinu může poškodit metabolismus jiných živin, zejména ostatních vitaminů B, a to prostřednictvím snížených hladin flavinových koenzymů [30, 34].

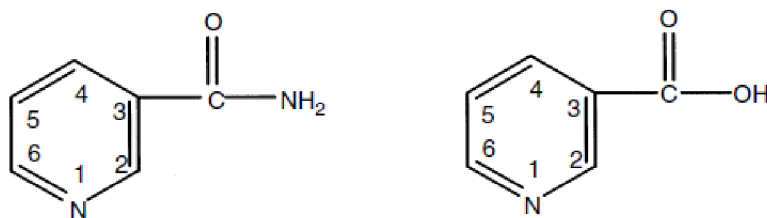
Zdroje a dostupnost

Za vhodný zdroj vitamínu B₂ je považována většina živočišných produktů. Potravin, které jsou obzvláště bohaté na riboflavin, zahrnují vejce, maso z orgánů (ledviny, játra), libové maso a mléko. V pivu se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,07–1,3 mg/l [36]. Z přírodních zdrojů je to zelená zelenina. I když hlavní formou ve vejcích a mléku je volný riboflavin, ve většině potravin se vyskytuje jako FAD. Vzhledem k tomu, že je riboflavin rozpustný ve vodě, může vaření způsobit velké ztráty, a to vyluhováním riboflavinu do varného média. Ztrátu vitamínu lze redukovat změnou způsobu přípravy potravin, například na páře nebo v mikrovlnné troubě a během skladování je důležité předejít expozici světla [30, 38].

2.4.3 Vitamin B₃ – Niacin

Struktura a biologická funkce

Niacin, známý jako vitamin B₃, též PP (z angl. *Pellagra Preventive factor*), je společný název pro kyselinu nikotinovou a nikotinamid (obrázek 8). Systematicky tyto sloučeniny nazýváme kyselina pyridin-3-karboxylová a pyridin-3-karboxamid [30].



Obrázek 8: *Struktura nikotinamidu a kyseliny nikotinové (zleva) [30]*

Kyselinové a amidové formy jsou snadno interkonvertibilní, přičemž kyselina nikotinová konvertuje na amid při tvorbě NAD a NADP. Niacin působí ve formě koenzymů NAD a NADP v mnoha biologických redoxních reakcích. NAD se účastní intracelulárního dýchání a jako koenzym dehydrogenáz oxiduje substráty glycerinaldehyd 3-fosfát, laktát, alkohol, 3-hydroxybutyrát, pyruvát a α -ketoglutarát. NADP hraje důležitou roli při redukčních biosyntézách mezi něž patří syntéza mastných kyselin nebo steroidů. V podobě koenzymu se podílí na oxidaci glukosa 6-fosfátu na ribosa-5-fosfát v pentosofosfátovém cyklu [30, 39].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

Niacin je nejstabilnější ve vodě rozpustný vitamin, proto jeho biologická aktivita není ovlivněna teplem, světlem, oxidací ani kyselým nebo alkalickým prostředím. Díky jeho stabilitě lze k extrakci z biologických materiálů použít kyselou či alkalickou hydrolyzu, čímž se uvolní niacin z koenzymových struktur. Primární cestou ke ztrátě niacinu, z hlediska zpracování potravin, je vyluhování. Prodanov et. al. [40] zaznamenal až 46% ztrátu niacinu z čočky, a to během namáčení a vaření. Operace mléčného zpracování neovlivňují obsah niacinu ani jeho biologickou aktivitu.

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Stejně jako předchozí dva vitaminy, tak i niacin musíme denně doplňovat příjmem potravy, avšak lidský organismus je schopen niacin vytvářet z esenciální aminokyseliny tryptofan. Denní potřeba niacinu je tedy dána obsahem aminokyseliny tryptofan ve stravě a účinností konverze tryptofanu na niacin. Z množství 60 mg Trp v těle vznikne 1 mg niacinu, což je tzv. konverzní faktor a označuje se jako ekvivalent niacinu (NE) [33]. Tento konverzní faktor je používán k popisu přínosu všech forem niacinu přijatých ze stravy, které jsou tělu k dispozici. U zdravých jedinců je méně než 2 % tryptofanu přijatého ze stravy převedeno na NAD. Syntéza NAD z tryptofanu je tedy poměrně neefektivní, jelikož závisí na enzymech, které vyžadují vitamin B₆ a riboflavin. V každém případě je Trp nezbytný jako prekurzor pro NAD. Doporučená denní dávka niacinu byla pro děti do 8 let ustanovena na hodnotu 8 mg (NE), pro ženy 14 mg (NE), kojící ženy 17 mg (NE) a pro muže 16 mg (NE) [33]. Tato doporučená denní dávka slouží jako základ pro prevenci nedostatku. Nejčastějším onemocněním, které

vzniká avitaminózou niacinu je pelagra, jejíž příznaky se projevují na kůži a zasahují trávicí nebo nervový systém. Na kůži, v oblastech vystavených slunečnímu záření se vytváří šupinatá, tmavě pigmentovaná vyrážka. Příznaky související s trávicím systémem zahrnují zánět úst a jazyka, zvracení, bolest břicha a průjem. Mezi neurologické symptomy patří bolest hlavy, únava, deprese a ztráta paměti [30].

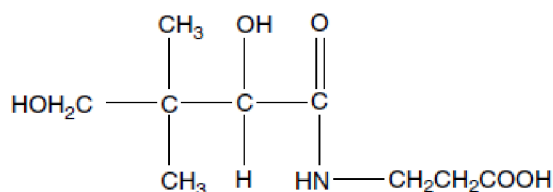
Zdroje a dostupnost

Niacin je k nalezení v mnoha potravinách, avšak největší zastoupení má v pivovarských kvasnicích, mase, cereáliích a dobrým zdrojem jsou také luštěniny. Dále je tento vitamin obsažen v mléce, zelené zelenině listové, kávě, čaji a nechybí ani v pivu, kde se jeho koncentrace pohybuje v rozmezí 3–20 mg/l [36]. Biologická dostupnost niacinu je v nefortifikovaných potravinách často nízká, jelikož se může významný podíl vyskytovat ve vázané formě, která není pro člověka absorbovatelná. Pro přesné stanovení příjmu niacinu je důležité, že extrakční metody, které využívají kyselou hydrolyzu, nehydrolyzují většinu vázaných forem, které se nacházejí v obilovinách. Takové metody nepřeceňují dostupný niacin. Naopak extrakce alkalickou hydrolyzou uvolní kyselinu nikotinovou z makromolekul, a proto lze změřit celkový obsah niacinu. Tímto je však přirozeně dostupné množství vitaminu z potravy nadhodnocováno [33].

2.4.4 Vitamin B₅ – kyselina pantotenová

Struktura a biologická funkce

Kyselina pantotenová, často také vitamin B₅, vznikla spojením aminokyseliny β-alaninu a kyseliny pantoové, čemuž odpovídá i systematicky název N-(2,4-dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)β-alanin (obrázek 9). Vzhledem k chiralitě hydroxylového atomu uhlíku ve struktuře kyseliny pantoové je vitamin opticky aktivní a výsledkem syntézy je racemická směs. Pouze D-enantiomery jsou biologicky aktivní a přítomné v přírodě [30].



Obrázek 9: Struktura kyseliny pantothenové [30]

Kyselina pantotenová slouží jako prekurzor pro biosyntézu koenzymu A (CoA), což je základní koenzym v různých, životně důležitých biochemických reakcích. Koenzym A reaguje s acylovými skupinami, což vede ke vzniku thioesterových derivátů, jako je acetyl-CoA, sukcinyl-CoA, malonyl-CoA a 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) -CoA. Koenzym A a jeho acylové deriváty jsou nutné pro reakce, které generují energii z rozkladných procesů tuků, sacharidů a bílkovin přijatých ze stravy. Kromě toho je CoA ve formě acetyl-CoA a sukcinyl-CoA zapojen do citrátového cyklu, při syntéze esenciálních tuků, cholesterolu, steroidních hormonů, vitaminů A a D, neurotransmiteru acetylcholinu a také při β-oxidaci mastných kyselin. Deriváty koenzymu A jsou nutné pro syntézu hormonu melatoninu a pro

složku hemoglobinu - hemu. Dále metabolismus řady léků v játrech vyžaduje koenzym A [33].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

Kyselina pantotenová je ve vodě rozpustný, termolabilní vitamin. V roztoku je nejstabilnější při pH 4–5. Pro fortifikaci potravin a farmaceutické využití je častou volbou sůl pantotenát vápenatý, a to díky vyšší stabilitě v okolních podmínkách, především v blízkosti neutrality. Kyselina pantotenová hydrolyzuje v kyselém i zásaditém prostředí na kyselinu pantoovou a β -alanin. Vzhledem k její rozpustnosti 1 g na 1 ml vody, mohou velké ztráty nastat například loužením do varné vody při přípravě zeleniny a tepelným zpracováním [41]. Na rozdíl od mnoha vitaminů je kyselina pantotenová stabilní vůči oxidativním degradacím a působení světla [30].

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Jelikož kyselina pantotenová patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě, znamená to, že si tělo netvoří zásoby, a proto musí být potřebné množství denně doplňováno. K dispozici je jen málo dostupných informací o příjmu vitaminu B₅ ze stravy, proto byly stanoveny hodnoty, které jsou považovány za adekvátní k prevenci nedostatku. Doporučená denní dávka pro děti do 8 let je tedy 3 mg, pro ženy 5 mg, kojící ženy 7 mg a pro muže 5 mg. [33] Vzhledem k vysoké dostupnosti kyseliny pantotenové v potravě je její nedostatek velmi vzácný a byl diagnostikován pouze u těžce podvyživených jedinců. Zmíněná hojnost v přírodě poukazuje na její strukturální roli v CoA. Mezi obecné příznaky, které byly vyzorovány během studií na lidech, patří podrážděnost a neklid, únava, apatie, nevolnost, poruchy spánku, zvracení a neurologické příznaky [30].

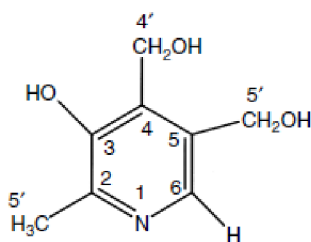
Zdroje a dostupnost

Kyselina pantotenová je obsažena prakticky ve všech potravinách, obvykle jako součást koenzymu A. Při požití se ve stravě přítomný CoA hydrolyzuje před intestinální absorpcí na kyselinu pantotenovou. Nejbohatšími zdroji jsou droždí, vnitřnosti, vaječné žloutky, mléčné výrobky, luštěniny, brokolice a avokádo. Celá zrna obilnin jsou také dobrým zdrojem vitaminu B₅, ale zpracování a rafinace zrna může způsobit ztrátu 35 až 75 % [30], což platí i pro zmrazení a konzervování. Relativně malé množství je přítomno v čerstvé a vařené zelenině, ovoci, mase, mléce, ořechách a zpracovaných obilovinách, což úzce souvisí s výrobou piva, kde tento vitamin najdeme v koncentracích 0,5–2,7 mg/l [36]. Zmíněné potraviny jsou však konzumovány v takové míře, že představují významný zdroj kyseliny pantotenové.

2.4.5 Vitamin B₆ – pyridoxin

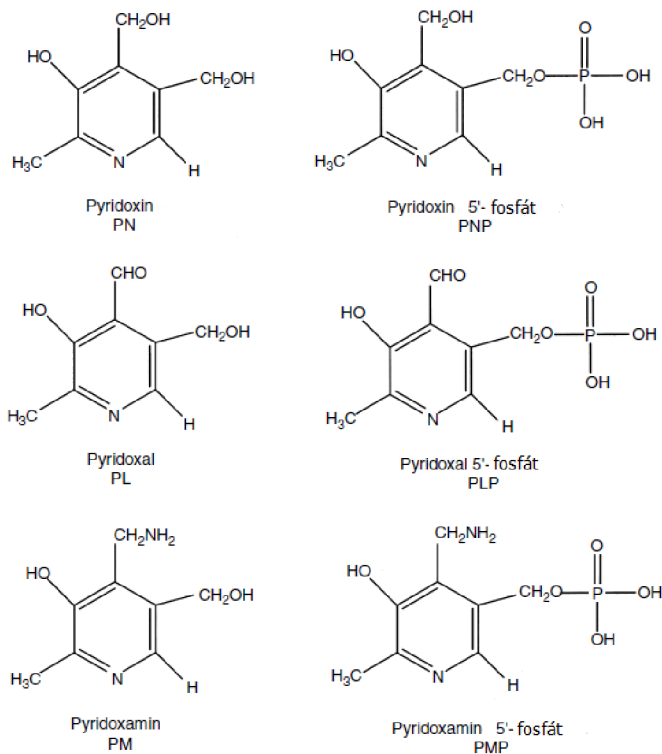
Struktura a biologická funkce

Pyridoxin, známý také jako vitamin B₆, je společné označení pro tři pyridinové deriváty – pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin, které mají biologickou aktivitu pyridoxinu. Pyridoxin, 2-methyl-3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)pyridin, substituovaný v poloze 4 hydroxymethylovou skupinou (obrázek 10), je obecně označován jako pyridoxol, avšak preferovaným názvem je pyridoxin (PN). Jiné formy vitamínu B₆ distribuované v přírodě zahrnují pyridoxal (PL) a pyridoxamin (PM) s aldehydem (-CHO) a aminomethylem (-CH₂NH₂) substituovaným v poloze 4 pyridinového kruhu [30].



Obrázek 10: *Struktura pyridoxinu [30]*

Pyridoxal kinasa fosforyluje PN, PL a PM na 5'-fosfáty (PNP, PLP a PMP). Metabolicky aktivní formou je PLP. PNP a PMP jsou oxidovány na PLP prostřednictvím PM (PN) 5'-fosfát oxidasy. PN, PL a PM jsou považovány za biologicky aktivní ekvivalenty, jelikož jsou metabolicky interkonvertibilní [42].



Obrázek 11: *Struktury šesti metabolicky významných forem pyridoxinu [30]*

PLP je významná sloučenina potřebná k funkci více než 100 enzymů, které katalyzují základní chemické reakce v lidském těle. Mnoho biochemických reakcí katalyzovaných PLP dependentními enzymy je součástí základních biologických procesů, jako je biosyntéza hemoglobinu a aminokyselin, stejně jako metabolismus mastných kyselin. PLP je důležitý také jako koenzym pro glykogen fosforylasu, enzym, který katalyzuje uvolňování glukosy ze zásobního glykogenu. V podobě koenzymu vystupuje i v reakcích, které generují glukosu z aminokyselin, což je proces nazývaný glukoneogeneze [43].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

Stabilitu různých forem vitamínu B₆ může ovlivnit působení světla nebo pH prostředí. Všechny formy jsou v kyselých roztocích poměrně stabilní, pokud jsou chráněny před světlem. V opačném případě dochází k degradaci i při kyselých hodnotách pH. Platí také, že čím více je pH alkalické, tím méně je vitamin stabilní. Laboratorní světelné podmínky nebo vystavení potravin světlu během skladování, uvádění na trh, nebo přípravy může významně ovlivnit retenci vitamínu B₆. Nejvíce škodlivé vlnové délky pochází z oblasti blízkého UV záření, proto je používání žlutého nebo zlatého fluorescenčního světla nezbytné pro analytickou laboratoř. Zpracování a podmínky vaření způsobují různé ztráty vitamínu. Degradace teplem vzrůstá s rostoucím pH, kdy PN je více tepelně stabilní než PL a PM. Během tepelného zpracování potravin nastává interkonverze forem vitamínu B₆, čímž se může jejich relativní koncentrace dramaticky změnit. Zpracováním potravin lze výrazně ovlivnit biologickou dostupnost [30].

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Vitamin B₆ je kromě příjmu z potravy doplňován také střevní mikroflórou, která se podílí na jeho syntéze. Denní doporučená dávka pro děti do 8 let je 0,6 mg, pro ženy 1,3 mg, kojící ženy 2,0 mg a pro muže také 1,3 mg [33]. Vzhledem k tomu, že vitamin hraje důležitou roli především v metabolických drahách aminokyselin, závisí jeho celková potřeba na množství přijatých bílkovin potravou. Čím vyšší je konzumace bílkovin, tím vyšší jsou nároky na přívod pyridoxinu (0,04 mg/g bílkovin ve stravě [33]). Nedostatek vitamínu B₆ obvykle souvisí s deficitem dalších nutrientů. Mezi obecné příznaky nedostatku pyridoxinu patří slabost, nespavost, nervové poruchy, zvýšená chuť k jídlu, deprese a různé dermatologické poruchy. Genetické vady týkající se enzymů, jejichž součástí je vitamin B₆, způsobují příznaky, které napodobují nedostatek, i když nejsou stravou ovlivněny [44].

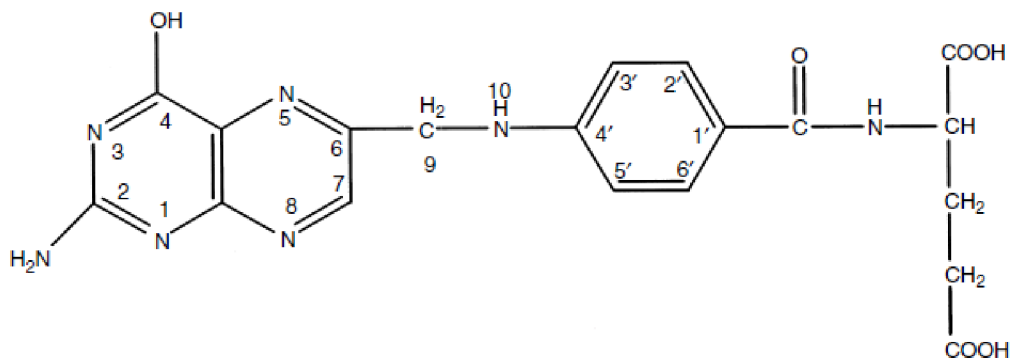
Zdroje a dostupnost

Vitamin B₆ je zastoupen v široké škále potravin, avšak k základním zdrojům pyridoxinu patří kvasnice, ryby, drůbež, luštěniny, cereálie, ořechy, brambory a banány. V pivu se Obecně je známo, že živočišné produkty obsahují mnohem více biologicky dostupných forem vitamínu B₆ v porovnání s rostlinnými potravinovými zdroji. V rostlinách může PN existovat v poměrně významném množství jako β-glukosid, což je jedinečná forma PN, biologicky špatně dostupná pro člověka i zvířata [30].

2.4.6 Vitamin B₉ – kyselina listová

Struktura a biologická funkce

Kyselina listová, též vitamin B₉ nebo pteroylglutamová kyselina, nese systematický název N-(2-amino-4-hydroxy-6-pteridylmetyl)-p-aminobenzoylglutamová kyselina. Molekulu této kyseliny tvoří pteridinový kruh a kyselina paraaminobenzoová, na jejíž karboxylovou skupinu je navázána molekula kyseliny glutamové (obrázek 12).



Obrázek 12: *Struktura kyseliny listové [30]*

Kyselina listová se v přírodě vyskytuje pouze ve formě solí – folátů. Termín – folát – se vztahuje jak na přírodní foláty obsažené v potravinách, tak na kyselinu listovou, syntetickou formu používanou v doplňcích stravy a obohacených potravinách. Přirozeně se vyskytují foláty existují v mnoha chemických formách a v lidském těle jsou metabolicky aktivní, zatímco kyselina listová nemá žádnou biologickou aktivitu, pokud není převedena na foláty. Folát hraje významnou roli jako prekurzor v metabolismu nukleových kyselin a některých aminokyselin, stejně jako v methylačních reakcích [33, 39].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

Je termolabilní a citlivá na světlo. Pokud je kyselina listová chráněna před světlem v prostředí s pH 5–12, je při teplotě 100 °C stabilní [30]. Ultrafialové záření štěpí tuto kyselinu na kyselinu p-aminobenzoyl-L-glutamovou a 6-formylpterin. Oxidativní štěpení vazby C₉ – N₁₀ způsobuje u folátů ztrátu biologické aktivity. Ke ztrátám folátů dochází při zpracování a skladování potravin, avšak ztráty jsou variabilní vzhledem k různorodosti potravinových matric a v nich obsažených forem folátů, dostupnosti kyslíku, chemickému prostředí a rozsahu ohřevu. Vyluhování způsobuje velké ztráty folátů, proto konzervační kapalina může obsahovat významnou část folátů původně přítomných v surovém produktu. Vliv může mít i přítomnost redukčních činidel např. kyselina askorbová, která zvyšuje retenci folátů během tepelného zpracování.

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Přestože je vitamin B₉ slabě rozpustný ve vodě, je potřeba jej denně přijímat. Denní doporučená dávka pro děti do 8 let byla stanovena na 200 µg, pro muže a ženy 400 µg, kojící ženy 500 µg a pro muže také 400 µg [33]. V případě plánovaného těhotenství, je doporučováno zvýšit příjem kyseliny listové už 2–3 měsíce před plánovaným otěhotněním, v opačném případě zajistit zvýšený příjem co nejdříve, jelikož těhotenství je období, kdy je

nutné vyhovět požadavku na rychlou replikaci buněk a růst plodové, placentární a mateřské tkáně. Nedostatek folátu je nejčastěji způsoben nedostatečným příjmem potravy, vysokou konzumací alkoholu a častým kouřením. Odlišení od nedostatku vitamínu B₁₂ je velmi obtížné, neboť v obou případech se deficit projeví sníženou tvorbou funkčních červených krvinek [30, 39].

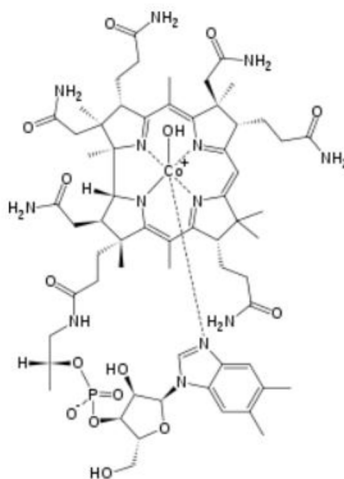
Zdroj a dostupnost

Existuje několik možností, jak zvýšit příjem kyseliny listové, a to konzumací potravin bohatých na foláty s ohledem na správné skladování a postupy přípravy. K relativně dobrým zdrojům kyseliny listové patří především listová zelenina, luštěniny, maso, vnitřnosti a vejce. Další možností je suplementace kyselinou listovou v podobě fortifikovaných potravin nebo pomocí doplňků stravy. Vzhledem k vyšší biologické dostupnosti syntetické kyseliny listové v doplňcích a obohacených potravinách, ve srovnání s přírodními potravinovými foláty, byla zavedena jednotka - Dietary Folate Equivalent (DFE). 1 mikrogram potravinového folátu poskytuje 1 μg DFE, zatímco 1 μg kyseliny listové užívané s jídlem nebo jako obohacené potraviny poskytuje 1,7 μg DFE, což potvrzuje lepší biologickou dostupnost listové kyseliny. K prevenci nedostatku vitamínu B₉ může posloužit také střídavá konzumace piva, kde se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,03–0,10 mg/l [33, 36].

2.4.7 Vitamin B12 – kobalamin

Struktura a biologická funkce

Kobalamin, známý také jako vitamin B₁₂, je obecný název pro skupinu sloučenin obsahujících kobalt (korinoidy), které mají zvláštní strukturu obsahující cukr ribózu, fosfát a bázi, 5,6,-dimethylbenzimidazol, připojenou ke korinovému kruhu (obrázek 13). Vitamin B₁₂ může být přeměněn na jeden ze dvou koenzymů kobalaminu – methylkobalamin nebo adenosylkobalamin, které jsou aktivní v lidském metabolismu.



Obrázek 13: *Struktura kobalaminu [45]*

V těle člověka tak hraje důležitou roli jako kofaktor dvou enzymů, a to methioninsyntasy a methylmalonyl-CoA-mutasy. Tyto enzymové komplexy se účastní významných metabolických reakcí, přičemž methioninsyntasa vyžaduje methylkobalamin pro přenos methylů z methyltetrahydrofolátu na homocystein za vzniku metioninu a tetrahydrofolátu (THF). Methylmalonyl-CoA-mutasa vyžaduje adenosylkobalamin pro konverzi methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA v izomerizační reakci. Porucha první výše zmíněné reakce vede k hromadění homocysteinu, načež porucha druhé reakce k hromadění kyseliny methylmalonové a jejímu zvýšenému vylučování močí [39].

Chemické a fyzikální vlastnosti – stabilita

Kyanokobalamin je nejstabilnější formou, která je světlem štěpena za vzniku hydroxykobalaminu. Optimální stabilita byla zjištěna při pH 4–4,5 [30]. Extrémní alkalické nebo kyselé hodnoty pH prostředí, UV nebo silné viditelné záření a oxidační činidla inaktivují vitamin. Vitamin B₁₂ je u většiny potravinářských postupů stabilní, ale vzhledem k jeho dobré rozpustnosti ve vodě (12,5 g/l při 25 °C) [41], může během vaření dojít k vyluhování nebo při čištění masa k vymytí. Nicméně bylo zjištěno, že při rozkladu kyseliny askorbové vznikají látky, které způsobují snížení stability tohoto vitaminu. Chemicky se jedná o nejsložitější vitamin, který je dosud znám.

Denní dávka, vliv na člověka, nutriční význam

Lidské tělo potřebuje jen velmi malé množství této látky, v řádu mikrogramů, přesto se často setkáváme s jeho deficitem. Doporučená denní dávka pro děti do 8 let je 1,2 µg, pro ženy 2,4 µg, kojící ženy 2,8 µg a pro muže opět 2,4 µg [33]. Mezi hlavní funkce tohoto vitaminu patří asistence při reakcích, které napomáhají přenosu nervového vzruchu, dále účast při přeměně aminokyseliny metioninu na cystein a v neposlední řadě se účastní procesu krvetvorby. Proto v případě nedostatku dochází k rozvoji neurodegradativní poruchy, hromadění toxického meziproductu – homocysteinu, a rozvíjí se chudokrevnost. K nejrizikovějším skupinám, které mohou trpět deficitem tohoto vitaminu jsou vegetariáni a vegani.

Zdroje a dostupnost

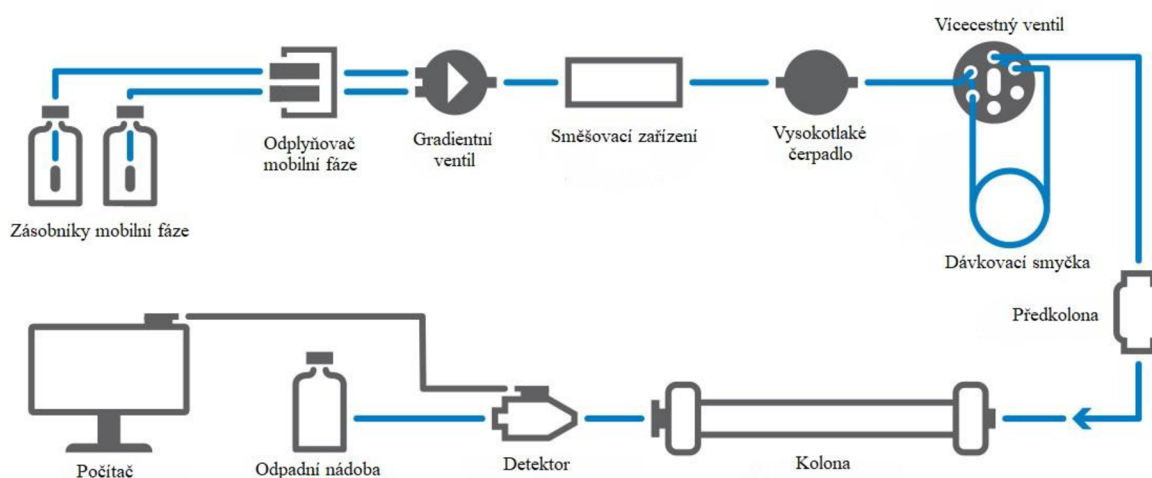
Vitamin B₁₂ je přítomen v potravinách živočišného původu, kterými jsou především játra, vejce (žloutek), maso, drůbež, ryby (včetně měkkýšů) a mléčné výrobky. Vitamin je syntetizován bakteriemi, pro živočichy je esenciální [46, 47]. Kobalamin je produkován i bakteriální mikroflórou tlustého střeva v lidském těle, ale vzhledem k tomu, že proces vstřebávání probíhá v poslední části tenkého střeva a střevní bakterie sídlí až v tlustém střevě, je člověk odkázán na příjem tohoto vitaminu potravou [48, 49]. U živočichů je syntetizovaný kobalamin ukládán ve svalovině a vnitřnostech, v případě živočišných produktů přestupuje do vajec i mléka. Pro dostatečný přísun kobaltu je důležitý jeho obsah v krmivech pro zvířata. Mezi další zdroje můžeme zařadit fortifikované potraviny, nebo také pivo, které poskytuje tento vitamin v množství 0,09-0,14 mg/l [36].

2.5 Analytické metody pro analýzu vitaminů B v pivu

Pro účely stanovení vitaminů skupiny B v pivu se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která bude v této kapitole stručně popsána.

2.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická metoda, která se standardně používá k separaci a identifikaci vitaminů skupiny B v pivu. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) patří mezi chromatografické metody, které využívají distribuci látek směsi mezi dvě fáze – stacionární a mobilní. Stacionární, tedy nepohyblivou fází bývá sorbent, který je buďto uložený v koloně nebo upravený jako tenká vrstva. Druhá fáze je pohyblivá, tzv. mobilní. Pro účinnou separaci je nutné použít sorbent s malými částicemi, které kladou postupující kapalině značný odpor. Proto přívod mobilní fáze probíhá za vysokých tlaků. Během separace dochází k interakci složek vzorků s mobilní fází, dále mobilní fáze se stacionární fází a také k sorpci složek na stacionární fází. Na základě rozdílných interakcí analytů se stacionární fází, probíhá jejich eluce různou rychlostí. Platí, že čím vyšší je afinita složky ke stacionární fází, tím vyšší je doba jejího setrvání v koloně. V těchto systémech je eluce, resp. retence jednotlivých složek směsi významně ovlivňována také změnou vlastností mobilní fáze. Metoda vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Uplatnění získala při separaci termicky labilních, špatně těkavých a netěkavých látek, což obecně zahrnuje potravinářský průmysl, oblast klinické biochemie a ekologie [50, 51, 52].



Obrázek 14: Schéma kapalinového chromatografu [53]

Na obrázku 14 je znázorněno schéma HPLC, kde hlavní komponenty systému představují zásobníky mobilní fáze, vysokotlaká čerpadla, dávkovací zařízení, kolona, termostat a detektor. *Zásobníky mobilní fáze* zajišťují dostatečné množství rozpouštědel, která jsou potřebná pro přenos vzorku systémem. Mobilní fáze je ze zásobníků vedena přes vakuový prostor, kde dochází k jejímu odplynění, jelikož polopropustná trubice zadrží molekuly mobilní fáze, zatímco molekuly plynu proniknou. Tím se plyn rozpuštěný v kapalině odstraní. Po odplynění je mobilní fáze poháněna *čerpadlem*, které zajistí její konstantní a kontinuální tok celým systémem. Jako nejpoužívanější čerpadla se uvádí pístová a membránová. Pístová čerpadla se dělí na pulzní, jejichž výtlak trvá několik sekund

a bezpulzní, u nichž může trvat i několik hodin. Membránové čerpadlo je vždy pulzní. K zavedení analytické směsi do proudu mobilní fáze slouží *dávkovací zařízení*. Pro ruční dávkování vzorku se používá obtoková dávkovací smyčka s vícecestným ventilem, která má dvě polohy. Ve chvíli, kdy dochází k plnění dávkovací smyčky, není tato smyčka součástí okruhu, kterým protéká mobilní fáze. Po naplnění smyčky a otočení ventilu se smyčka zařadí do průtoku mobilní fáze a vzorek je tak unášen na kolonu. Tímto způsobem lze aplikovat pouze přesný objem vzorku, avšak dnes je většina moderních dávkovačů ovládána automaticky, což umožňuje dávkovat různé objemy. Nepostradatelnou součástí HPLC systému je *kolona*, kde na základě styku mobilní a stacionární fáze probíhá vlastní separace. Pro kapalinovou chromatografii je typické použití náplňových kolon, které jsou vyráběny z nerezů, popřípadě ze skla. Sorbent může být buď polární (oxid hlinitý, silikagel) nebo nepolární, mezi něž řadíme polyamidy, polystyreny, uhlí a silikagel s oktylovým (C8) či oktadecylovým (C18) uhlíkatých řetězcem. Důležitým parametrem, kterým lze ovlivnit separaci je teplota. K zajištění konstantní teploty slouží *termostat kolony*, jenž lze použít také pro zásobník mobilní fáze nebo autosampler. Na závěr jsou zóny, charakteristické pro jednotlivé analyty, snímány *detekčním zařízením*. Výstupem je chromatogram, který znázorňuje závislost intenzity signálu na čase v podobě chromatografických pík [50, 52, 53, 54].

2.6 Statistická metoda pro analýzu dat

Pro vyhodnocení většího množství experimentálních dat a přehlednější zpracování slouží analýza rozptylu (ANOVA). Zmíněná statistická metoda je popsána v této kapitole.

2.6.1 Analýza rozptylu

Analýza rozptylu (ANOVA - Analysis of variance) je statistická metoda, která umožňuje vícenásobné porovnávání středních hodnot. Principem této metody je zhodnocení vztahů mezi rozptyly jednotlivých souborů, které jsou předmětem zkoumání. Cílem analýzy rozptylu je posoudit vliv konkrétních faktorů (kategoriálně nezávislých proměnných) na závisle proměnnou kvantitativního typu. Slouží k rozdělení celkové variability na dvě složky: mezivýběrovou a vnitrovýběrovou variabilitu. Za mezivýběrovou variabilitu je považován rozdíl průměrů jednotlivých skupin od průměru celkového a obvykle se její vznik připisuje studovanému faktoru, zatímco vnitrovýběrová variabilita, rozptyl mezi hodnotami ve stejné skupině od skupinového průměru, je způsobena náhodnými vlivy. Poměrem těchto složek variability získáme testovací kritérium F , na jehož základě lze určit vztahy mezi pozorovanými rozptyly. Jelikož předpokládáme, že vliv náhodného kolísání měřených hodnot působí stejnou měrou v obou případech, je možné potenciální rozdíl v rozptylech připsat na vrub studovaného faktoru. Pokud $F > F_{\text{krit}}$ (F_{krit} – tabulková hodnota), pak je nulová hypotéza (H_0) o shodě středních hodnot sledovaných skupin zamítnuta. Dále tedy platí alternativní hypotéza H_a , že alespoň jedna střední hodnota je statisticky odlišná od ostatních. Pokud rozdíl mezi pozorovanými skupinami není statisticky významný, lze míru jejich odlišnosti posuzovat pomocí Tukeyho testu na stupnici 0–1, kde číslo 1 vyjadřuje naprostou shodu středních hodnot daných skupin [55, 56, 57].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Popis materiálu k analýze

Pro experimentální účely byly zajištěny vybrané vzorky pív, které jsou klasifikovány do tří skupin. Jednalo se o piva pasterizovaná i filtrovaná (PF), piva nepasterizovaná, ale filtrovaná (NPF) a piva třetí skupiny byla nepasterizovaná a zároveň nefiltrovaná (NPNF). Volba vzorků vycházela z předchozí studie [58], která se věnovala rovněž vlivu pasterizace a filtrace, avšak se zaměřením na rozdílné parametry v pivu. Seznam vzorků pív je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků

PF	1	Budějovický Budvar	Budějovický Budvar, n.p.
PF	2	Bakalář	Tradiční pivovar v Rakovníku, a.s.
PF	3	Olivětínský Opat	Pivovar Broumov, s.r.o.
PF	4	Bohemia Regent	Bohemia Regent, a.s. (Třeboň)
PF	5	Pardál Echt	Budějovický Budvar, n.p.
PF	6	Gambrinus, Plná 12	Plzeňský Prazdroj, a.s.
PF	7	Radegast, Ryze hořká 12	Plzeňský Prazdroj, a.s.
PF	8	Kanec	Zámecký pivovar Břeclav s.r.o.
PF	9	Herold	Pivovar Herold Březnice a.s.
PF	10	Samson	Pivovar Samson, a.s.
NPF	11	Záviš	Měšťanský pivovar v Poličce, a.s.
NPF	12	Krakonoš	Krakonoš s.r.o (Trutnov)
NPF	13	Svijany – Svijanský Rytíř	Pivovar Svijany, a.s.
NPF	14	Chodovar Prezident Premium	Chodovar spol. s.r.o. (Chodová Planá)
NPF	15	Hubertus Premium	Pivovar Hubertus, a.s. (Kácov)
NPF	16	Chotěboř Prémium	Pivovar Chotěboř s.r.o.
NPF	17	Starobrno – Drak	Starobrněnský pivovar, Heineken Česká Republika, a.s.
NPF	18	Bernard	Pivovar Bernard a.s. (Humpolec)
NPF	19	Klášteř	Pivovar Klášteř, a.s.
NPF	20	Poutník Prémium	Pivovar Poutník (Pelhřimov)

NPNF	23	Xaver ležák tmavý	Pivovar Xaver, Blučina
NPNF	24	Jarošovský ležák	Jarošovský pivovar a.s. (Uherské Hradiště – Jarošov)
NPNF	25	Sedlák	1. Selský pivovárek s.r.o. (Kroměříž)
NFNP	26	Beskydský ležák	Beskydský pivovárek s.r.o. (Ostravice)
NFNP	27	Svatovar	První soukromý pivovar společenský s.r.o.
NFNP	28	Kocour ležák	Pivovar Kocour Varnsdorf s.r.o.
NFNP	29	Slavkovský vídeňský ležák	Slavkovský pivovar s.r.o. (Slavkov u Brna)
NFNP	30	Slavkovská 12	Slavkovský pivovar s.r.o. (Slavkov u Brna)

3.2 Laboratorní vybavení

3.2.1 Použité přístroje

- ✓ Analytické laboratorní váhy AND HA-202M (A&D Company, JAP)
- ✓ Jednotka pro přípravu ultračisté deionizované vody ELGA PureLab Classic UV (Veolia Water Systems Ltd., UK)
- ✓ Sušárna s přirozenou cirkulací vzduchu, DRY-Line® (VWR International s. r .o., CZ)
- ✓ Ultrazvuková čistička Ultrasonic Compact cleaner PS03000A Powersonic, objem 2,5 l (NOTUS - Powersonic s.r.o., SK)
- ✓ Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA)



Obrázek 15: HPLC Agilent 1260 Infinity

3.2.2 Použité chemikálie

Acetonitril (J.T. Baker), kyselina mravenčí (čistota 98 %, Lach-Ner, s.r.o.), mravenčan amonný (čistota $\geq 99,995$ %, SIGMA - ALDRICH) a standardy vitaminů skupiny B (viz tabulka 2)

Tabulka 2: Seznam použitých standardů pro HPLC stanovení vitaminů skupiny B

Název	Mr (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu
Riboflavin	376,36	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	USA
Kyselina nikotinová	123,11	$\geq 99,5$ %	SIGMA ALDRICH	Švýcarsko
Pyridoxin hydrochlorid	169,18	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	Německo
Kyselina listová	441,40	≥ 97 %	SIGMA ALDRICH	Čína
Kyanokobalamin	1 355,37	$\geq 99,2$ %	SIGMA ALDRICH	USA

3.2.3 Laboratorní pomůcky

- ✓ Běžné laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, nálevky)
- ✓ Plastové zkumavky (10 ml)
- ✓ Plastový stojan na zkumavky
- ✓ Plastové násypky
- ✓ Skleněné vialky, septa
- ✓ Porcelánové lodičky na vážení, špachtle
- ✓ Hliníková fólie
- ✓ Mikropipety, špičky
- ✓ Injekční stříkačky – objem 20 ml
- ✓ Stříkačkové filtry - Syringe Filters, Nylon, 25mm, 0,45 μ m, pink (LABICOM s.r.o.)

3.3 Příprava vzorků pro HPLC analýzu vitaminů B v pivech

Pro analýzu na HPLC bylo třeba nejprve jednotlivé vzorky piv přefiltrovat. K filtraci byly použity injekční stříkačky a stříkačkové filtry o průměru 0,45 μ m. Vzhledem k tomu, že reálné vzorky piv obsahují velké množství rozpuštěného oxidu uhličitého, bylo nutné jej před vlastní analýzou odstranit. Proto byl stojan s plastovými zkumavkami a přefiltrovanými vzorky vložen do ultrazvukové lázně. Hliníková fólie byla použita pro zamezení přístupu světla k připravovaným vzorkům, aby nedocházelo k degradaci vitaminů. Teplota vodní lázně byla kontrolována a voda ve vodní lázni po určitých časových intervalech obměňována, abychom zamezili tepelné degradaci. Takto upravené vzorky piv byly převedeny do vialek a následně umístěny do autosampleru kapalinového chromatografu.

3.4 Příprava kalibračních roztoků pro HPLC analýzu

Do odměrných baněk o objemu 25 a 100 ml byly připraveny zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 g/l, 50 mg/l a 115 mg/l. Pro účely kalibračního měření byly z těchto zásobních roztoků připraveny směsné roztoky, kde koncentrace 0,5; 1; 5; 10; 20 a 40 mg/l byly určeny pro stanovení bodů kalibrační křivky.

3.5 HPLC metoda pro stanovení vitaminů skupiny B

Ze skupiny vitaminů B byly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-VIS detektorem stanoveny vitaminy B₂, B₃, B₆, B₉ a B₁₂. Analýza byla provedena pomocí zařízení HPLC Agilent 1260 Infinity. Tato analytická metoda s optimalizovanými parametry (viz tabulka 3) byla aplikována na reálné vzorky.

Tabulka 3: Parametry pro HPLC analýzu vitaminů skupiny B

Název a typ přístroje	HPLC Agilent 1260 Infinity
Objem nástřiku	4 µl
Rychlost průtoku MF	0,5 ml/min
Složení MF	100 % mravenčan amonný + kyselina mravenčí (0,1%) 0 % acetonitril + kyselina mravenčí (0,1%)
Teplota	40 °C
Kolona	Kinetex® 2,6 µm, Polar C18, 150x3,0 mm
Detektor	DAD UV-VIS
Detekce	200-480 nm
Doba analýzy	27 min

Separace jednotlivých vitaminů proběhla na základě gradientové eluce, jejíž průběh je zaznamenán v tabulce 4.

Tabulka 4: Gradientová eluce

Čas [min]	Mravenčan amonný [%]	Acetonitril [%]
0,0	100	0
2,0	100	0
12,0	40	60
14,0	40	60
15,0	40	60
15,1	100	0
22,0	100	0

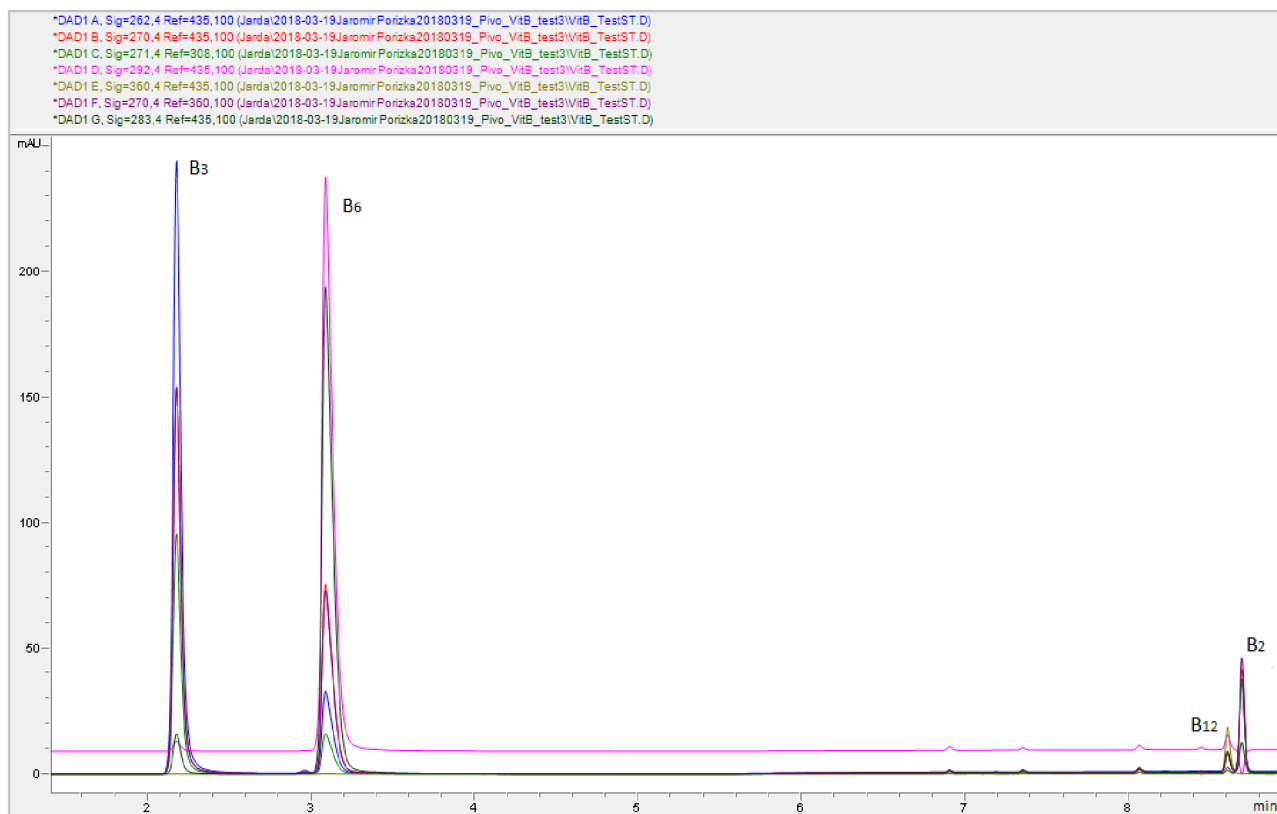
Metoda pro stanovení vitaminů skupiny B byla podrobena optimalizaci a následné validaci. Cílem optimalizace bylo dosažení co nejlepšího rozlišení pro jednotlivé píky analyzovaných vitaminových standardů. Separace byla následně ověřována jak na standardech, tak na samotných obohacených vzorcích piva. Retenční časy a absorpční maxima, které byly stanoveny pro vybrané vitaminy, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Vitaminy skupiny B stanovené v pivu pomocí HPLC

Vitamin	Retenční čas (min)	Vlnová délka DAD (nm)	Retenční vlnová délka (nm)
B ₂	8,649	271	308
B ₃	2,135	262	435
B ₆	3,081	292	435
B ₉	7,936	283	435
B ₁₂	8,533	360	435

3.6 Validace HPLC metody

Na základě analýzy čistých standardů došlo k separaci a následné identifikaci jednotlivých vitaminů (obrázek 16). K potvrzení identity vitaminů byla porovnána naměřená spektra s knihovnou spekter, a to v rozsahu vlnových délek od 200–480 nm, s krokem po 2 nm.



Obrázek 16: Chromatogram směsných standardů vitaminu B₂, B₃, B₆ a B₁₂

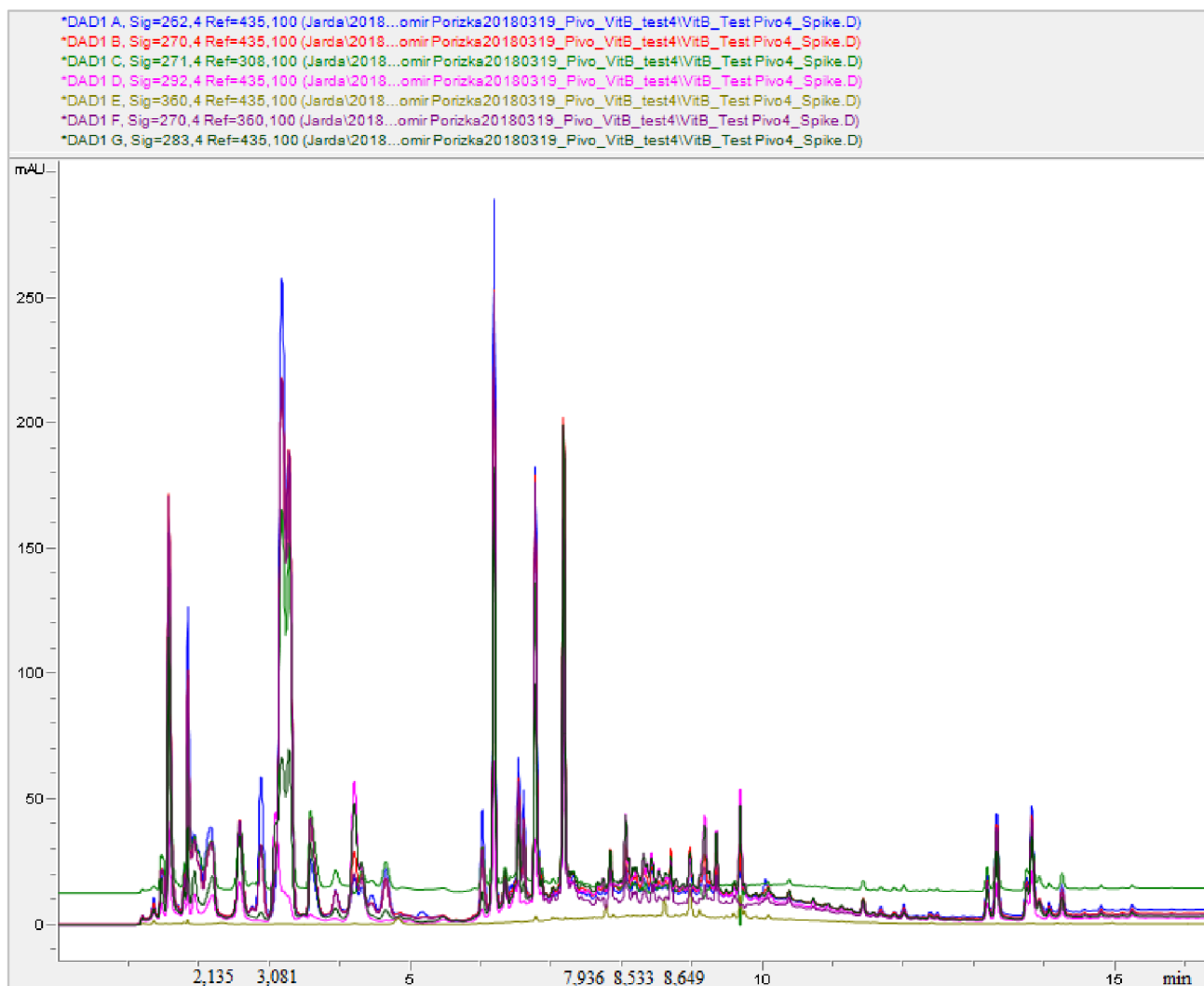
Pro vyhodnocení experimentálních dat byl využit chromatografický software Agilent Chemstation (Agilent, USA). V rámci validace metody byly pro kalibrační měření zvoleny koncentrace 0,5; 1; 5; 10; 20; 40 mg/l. Pomocí lineární regrese došlo k vyhodnocení linearit kalibračních závislostí s korelačním koeficientem $r^2 > 0,999$.

Tabulka 6: Validacionní parametry HPLC metody

Vitamin	Kalibrační rozsah [mg/l]	r^2	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
B₂	0,5-40	0,9998	0,040	0,12
B₃	0,5-40	0,9998	0,066	0,20
B₆	0,5-40	0,9998	0,060	0,18
B₉	0,5-40	0,9997	0,003	0,01
B₁₂	0,5-40	0,9998	0,070	0,21

Pozn. LOQ – limit kvantifikace, LOD – limit detekce; $LOD = LOQ/3$

Limity kvantifikace (LOQ), které jsou uvedeny v tabulce 6, byly stanoveny dle metody MDL (method detection limit) a následně vynásobeny faktorem 3. Jejich hodnoty se pohybují v rozmezí 0,01–0,21 mg/l, přičemž nejnižší hodnota LOQ byla vypočtena pro vitamin B₉ a nejvyšší odpovídá LOQ vitaminu B₁₂. Fluktuace základní linie byla stanovena na základě opakovaného (n = 7) měření reálného vzorku piva obohaceného 5 mg/l jednotlivých standardů (obrázek 17). Kontrola opakovatelnosti metody byla provedena opakovanými nástríky (n = 10). Relativní směrodatná odchylka 10 měření byla pod 1 %. Na závěr byly analyzovány vzorky piv obohacené čistými standardy o koncentraci 5 mg/l, čímž byla ověřena výtěžnost metody, která se pohybovala v rozmezí 95–104 %.



Obrázek 17: Chromatogram pro reálný vzorek piva obohacený standardy vitamínů

3.7 Statistická analýza dat

Použitá statistická metoda – analýza rozptylu – umožňuje určit, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami piv (PF, NPF, NPNF). Pracuje se dvěma hypotézami – nulovou a alternativní, které zní: „Vliv pasterizace a filtrace na obsah jednotlivých vitamínů v pivu je buď statisticky významný (H_a) nebo statisticky nevýznamný (H_0). Rozhodování o platnosti nulové hypotézy usnadňuje P a F hodnota. V našem případě byl interval spolehlivosti nastaven na 95 %, proto za podmínek $P < 0,05$ (5 %) a $F > F_{krit}$, kde $F_{krit} = 3,56$, byla nulová hypotéza zamítnuta. U každé ze tří skupin piv byl testován vždy jeden parametr (koncentrace konkrétního vitamínu), proto v tomto případě vystačila jednofaktorová analýza rozptylu. Cílem bylo zjistit, zda je příčinou rozdílů mezi skupinami koncentrace daného vitamínu nebo jen náhodné chyby. Vztahy mezi analyzovanými skupinami piv jsou graficky znázorněny pomocí krabicových grafů (obrázek 19–22), k jejichž vyhotovení bylo zapotřebí softwaru EXCEL (Microsoft, USA) a XLstat (Addinsoft, Francie).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Kapitola Výsledky a diskuse je rozdělena do několika podkapitol. První podkapitola se zabývá přímou prezentací samotných výsledků a v podkapitolách 4.2.1–4.2.4 jsou výsledky diskutovány pro jednotlivé vitaminy v rámci vlivu postfermentačních technologií na jejich obsah v pivu.

4.1 Výsledky analýz jednotlivých vzorků piv

V této podkapitole jsou shrnuty veškeré výsledky, které byly získány analýzou 28 vzorků piv. Naměřená data jsou členěna do tří skupin (viz tabulka 7–9), kde stanovené koncentrace vybraných vitaminů jsou uvedeny pro konkrétní vzorky, včetně průměrných hodnot pro celou skupinu. Na základě extrémně nízké koncentrace vitamínu B₃ ve vzorcích 4, 6, 12 a 16, nebyly tyto vzorky, společně s analyty pod mezí detekce, brány v potaz při statistickém vyhodnocení dat.

Tabulka 7: Koncentrace vybraných vitaminů ve vzorcích piv skupiny PF, LOD jsou limity detekce

Vitamin		B ₂	B ₃	B ₆	B ₉	B ₁₂
Skupina	Číslo vzorku	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
PF	1	0,679	12,212	<LOD	0,043	0,331
	2	0,944	22,608	<LOD	0,049	0,272
	3	0,685	17,186	<LOD	<LOD	0,341
	4	0,814	4,012	<LOD	0,047	0,393
	5	0,803	16,775	<LOD	0,091	0,277
	6	0,844	8,330	<LOD	0,124	0,335
	7	0,791	22,743	<LOD	0,103	0,343
	8	0,958	20,133	<LOD	<LOD	0,442
	9	0,827	12,874	<LOD	<LOD	0,306
	10	0,688	14,967	<LOD	0,047	0,405
	průměr	0,797	17,437	<LOD	0,067	0,340

Tabulka 8: Koncentrace vybraných vitamínů ve vzorcích pív skupiny NPF

Vitamin		B ₂	B ₃	B ₆	B ₉	B ₁₂
Skupina	Číslo vzorku	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
NPF	11	0,708	11,475	<LOD	<LOD	0,282
	12	0,880	5,461	<LOD	<LOD	0,414
	13	0,847	17,724	<LOD	<LOD	0,350
	14	0,780	17,452	<LOD	<LOD	0,445
	15	0,931	22,672	<LOD	<LOD	0,380
	16	0,831	5,718	<LOD	<LOD	0,463
	17	0,882	27,769	<LOD	<LOD	0,386
	18	0,951	14,737	<LOD	<LOD	0,333
	19	0,832	26,573	<LOD	<LOD	0,516
	20	0,767	11,226	<LOD	<LOD	0,283
	průměr	0,837	18,703	<LOD	<LOD	0,372

Tabulka 9: Koncentrace vybraných vitamínů ve vzorcích pív skupiny NPNF

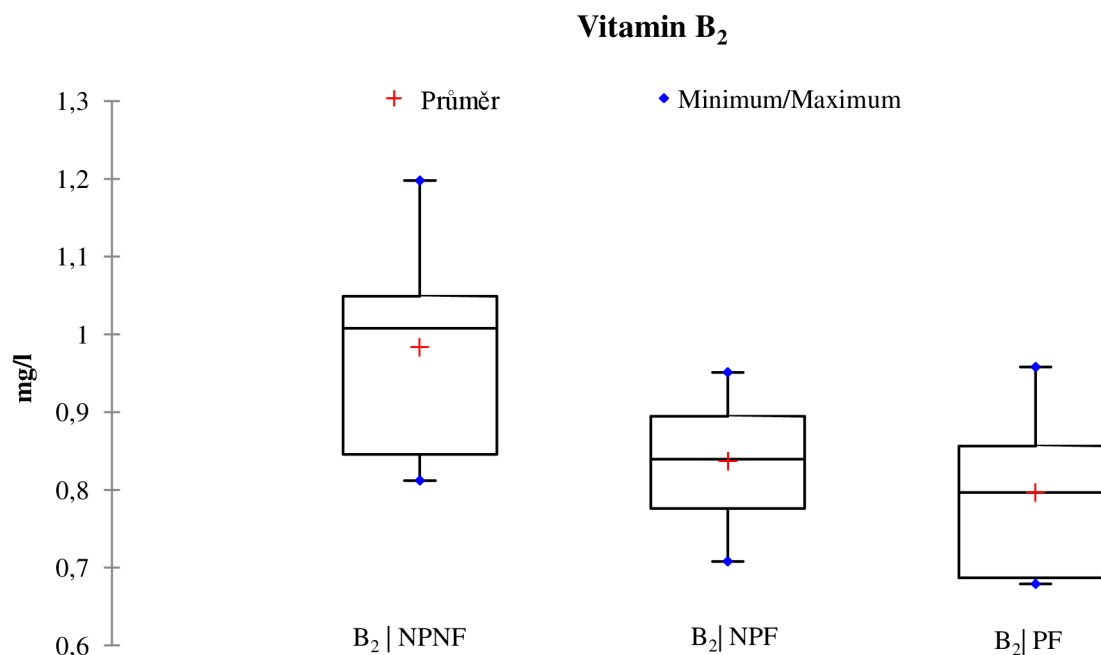
Vitamin		B ₂	B ₃	B ₆	B ₉	B ₁₂
Skupina	Číslo vzorku	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
NPNF	23	1,198	2,743	<LOD	<LOD	0,353
	24	1,003	12,010	<LOD	0,063	0,268
	25	0,845	12,858	<LOD	0,075	0,307
	26	0,846	9,364	<LOD	0,057	0,335
	27	0,812	11,192	<LOD	<LOD	0,442
	28	1,023	10,281	<LOD	<LOD	0,337
	29	1,128	12,839	<LOD	<LOD	0,479
	30	1,012	10,393	<LOD	<LOD	0,431
		průměr	0,983	10,210	<LOD	0,065

4.2 Posouzení vlivu postfermentačních technologií na obsah vitaminů skupiny B v pivu

Cílem této diplomové práce bylo posouzení vlivu pasterizace a filtrace na obsah vybraných vitaminů v pivu. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami piv byly posuzovány pomocí analýzy rozptylu. Na základě parametrů získaných analýzou rozptylu je možné pozorovat statisticky významné rozdíly mezi skupinami piv, avšak pouze u vitaminu B₂ a B₃. U zbylých dvou, tedy vitaminů B₉ a B₁₂, je hodnota $P > 0,05$ a $F < 3,56$, což potvrzuje nulovou hypotézu, a proto se nejedná o statisticky významný rozdíl. V následujících podkapitolách budou separátně popisovány vlivy postfermentačních úprav na jednotlivé vitaminy.

4.2.1 Vliv postfermentačních technologií na obsah vitaminu B₂ v pivu

Na základě výsledků analýzy rozptylu (v rámci vitaminu B₂ byl parametr P 0,009 a F hodnota 5,926; $F_{\text{krit}} = 3,56$) byl stanoven statisticky významný rozdíl mezi filtrovanými pivy (NPF, PF) a skupinou NPNF piv. Průměrná koncentrace vitaminu B₂ pro skupinu NPNF činí 0,983 mg/l, pro NPF piva bylo vypočteno množství 0,837 mg/l a v pivech pasterizovaných, filtrovaných je obsah riboflavinu 0,797 mg/l.



Obrázek 18: Krabicový graf pro vitamin B₂

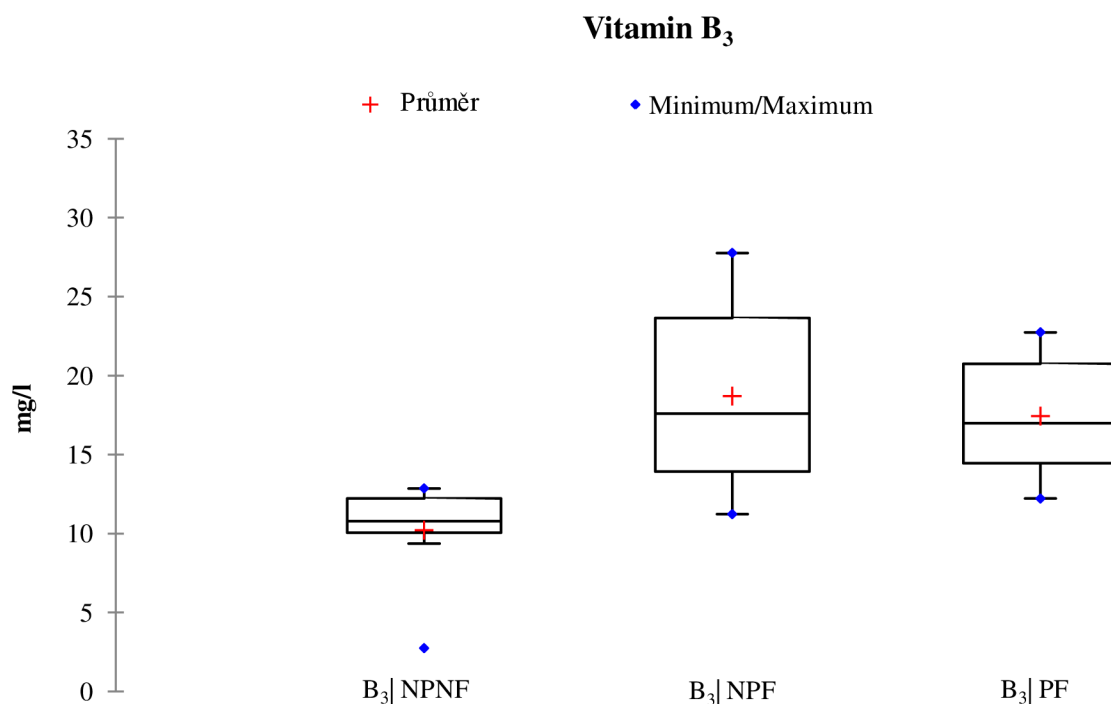
Dle Tukeyho testu je při porovnání skupin NPF a PF hodnota P parametru 0,761, což vypovídá o minimálním vlivu pasterizace na obsah vitaminu B₂ v pivu. Stabilitu tohoto vitaminu ovlivňuje mnoho faktorů, avšak mezi nejdůležitější patří pH roztoku, teplota a doba pasterizace. Sheraz et al. [59] uvádí, že při zahřátí roztoku riboflavinu na teplotu 100, 120 a 150 °C po dobu 40 minut došlo k degradaci 4, 7 a více než 20 % riboflavinu, přičemž v závislosti na pH (1,3–6,5) [60] proběhla destrukce riboflavinu při 80 °C. V našem případě

se koncentrace vitamínu B₂ snížila o necelých 5 % a nejnižší koncentrace tohoto vitamínu byla stanovena ve vzorku filtrovaného, pasterizovaného piva - Budějovický Budvar (0,679 mg/l).

Naopak v boxovém grafu na obrázku 18 je patrné, že nejvyšší množství vitamínu B₂ jsme zaznamenali ve skupině NPNF piv, což nasvědčuje vlivu filtrace. Na základě experimentálních dat vykazují nefiltrovaná piva vyšší obsah riboflavinu oproti pivům filtrovaným, což by mohlo souviset s přítomností kvasniční biomasy, která je obecně výborným zdrojem vitamínů B. Je tomu tak vzhledem k důležité roli těchto látek v metabolických drahách pivovarských kvasinek. Jednotlivé formy riboflavinu jsou využívány v redoxních reakcích citrátového cyklu, elektronovém transportním řetězci, při β -oxidaci a různých biosyntézách [61]. Studie, která by však potvrdila tuto úvahu, nebyla nalezena. Co se týče průměrné koncentrace riboflavinu v pivu, uvádí Basařová a Kosař [3, 4] hodnotu pro 12° světlý ležák v rozmezí 0,02–1,00 mg/l, zatímco Hardwick [62] zaznamenal hodnoty v intervalu 0,07–1,30 mg/l. Průměrné koncentrace vitamínu B₂ ve všech pozorovaných skupinách odpovídaly hodnotám ve zmíněné literatuře. Obecně tedy největší zastoupení vitamínu B₂ vykazují piva NPNF, konkrétně vzorek 23 (Xaver ležák tmavý) s koncentrací 1,198 mg/l, druhé v pořadí jsou piva NPF a nejnižší průměrná koncentrace byla zaznamenána v PF pivech, z čehož vyplývá synergický účinek sledovaných postfermentačních úprav.

4.2.2 Vliv postfermentačních technologií na obsah vitamínu B₃ v pivu

V rámci vitamínu B₃ byly porovnávány 3 skupiny vzorků, které byly ošetřeny kombinací dvou postfermentačních úprav. Koncentrace vitamínu B₃ jsou pro jednotlivé vzorky uvedeny v tabulkách 7–9. Rozdíly mezi skupinami byly definovány pomocí analýzy rozptylu, přičemž nejvýznamnější statisticky rozdíl byl pozorován právě u vitamínu B₃ ($P < 0,004$, $F = 7,382$; $F_{krit} = 3,56$). V krabicovém grafu na obrázku 19 je znázorněn statisticky významný rozdíl mezi skupinou nepasterizovaných, nefiltrovaných piv a skupinami NPF a PF piv. V tomto případě je znatelný vliv filtrace, která je důsledkem vyšší průměrné koncentrace niacinu v NPF a PF pivech. Hodnota průměrné koncentrace pro skupinu NPF byla vypočtena na 18,703 mg/l a pro piva PF 17,437 mg/l, kdežto NPNF piva vykazují průměrnou koncentraci 10,210 mg/l. Mezi piva skupiny NPNF patří vzorek Xaver ležák tmavý, u něhož bylo stanoveno extrémně nízké množství vitamínu B₃ (2,743 mg/l), avšak skupina NPF (tabulka 8) zahrnuje také dva vzorky, ve kterých je množství vitamínu B₃ výrazně vzdálené od průměrné hodnoty. Jedná se o vzorek piva Krakonoš (5,461 mg/l) a Chotěboř Prémium (5,718 mg/l). Naopak Starobrno – Drak, který také spadá do skupiny NPF, zaujímá vedoucí postavení s průměrnou koncentrací niacinu 27,769 mg/l. Vyšší obsah vitamínu B₃ v pivech, která při technologickém procesu prošla filtrací, vysvětlují You-Fang Li & Wei-Guo Bao [63] tím, že některé kvasinky, včetně *Saccharomyces cerevisiae*, vyžadují niacin, ve formě NAD, pro svůj růst. To znamená, že pokud zůstane v nefiltrovaných, tzv. „živých“ pivech kvasniční biomasa, proběhne sekundární fermentace, během které kvasinky zutilizují vitamin B₃. Panozzo et al. [64] potvrzují, že za podmínek anaerobního růstu je *S. cerevisiae* divokého typu auxotrofní kyseliny nikotinové.



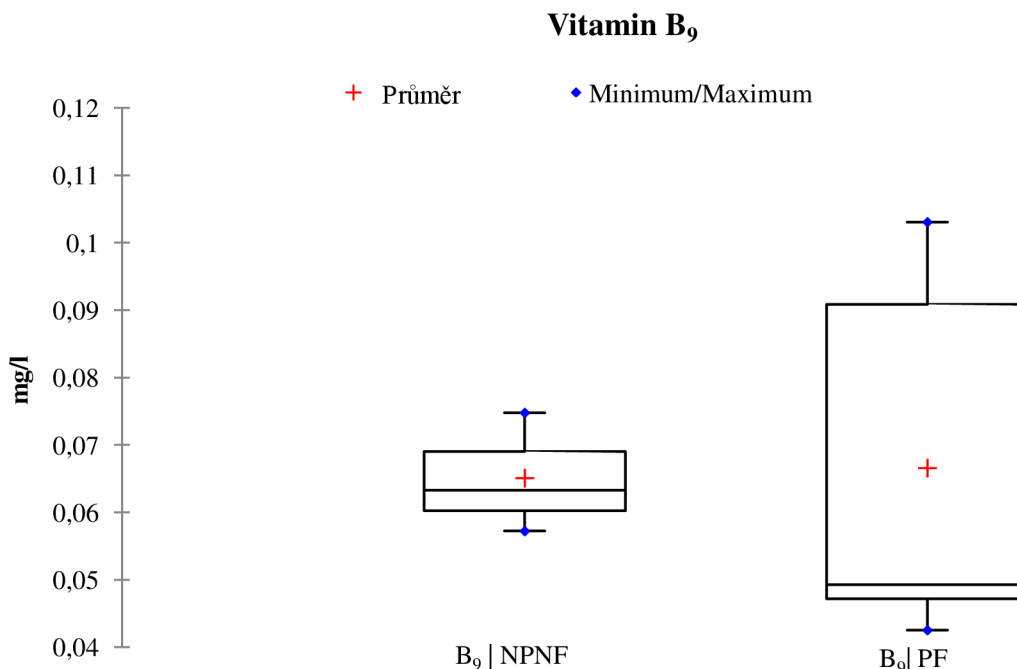
Obrázek 19: Krabicový graf pro vitamin B₃

Rozdíl mezi skupinami pív PF a NPF vypovídá o vlivu pasterizace. Dle Tukeyho testu je při porovnání těchto dvou skupin hodnota P parametru 0,857, což potvrzuje statisticky nevýznamný rozdíl. Vzhledem k tomu, že niacin je nejstabilnější, ve vodě rozpustný vitamin [30], byly ztráty způsobené pasterizací vyčísleny na necelých 7 %. Ze skupiny PF patří k pivům s nejvyšším zastoupením niacinu Bakalář a Radegast-Ryze hořká 12, s průměrnými koncentracemi 22,608 a 22,743 mg/l, což jsou hodnoty blízké některým vzorkům ze skupiny NPF. Dále zahrnuje skupina PF také dvě extrémní piva, která měla naopak velmi nízký obsah niacinu oproti ostatním analyzovaným vzorkům skupiny (viz tabulka 7). Konkrétně se jedná o vzorek Bohemia Regent a Gambrinus, Plná 12, které nebyly zahrnuty do statistického vyhodnocení, jelikož odchýlení od průměrné hodnoty bylo příliš velké.

Obecně byl tedy zaznamenán nejvyšší obsah vitaminu B₃ v NPF pivech, poté ve skupině PF a nakonec v pivech NPNF. Hodnoty koncentrací vitaminu B₃ v pivu uvedené v odborné literatuře se pohybují v intervalech 3–14 mg/l [3, 4] a 3–20 mg/l [62], přičemž obsah niacinu ve většině analyzovaných pív spadá do těchto intervalů.

4.2.3 Vliv postfermentačních technologií na obsah vitamínu B₉ v pivu

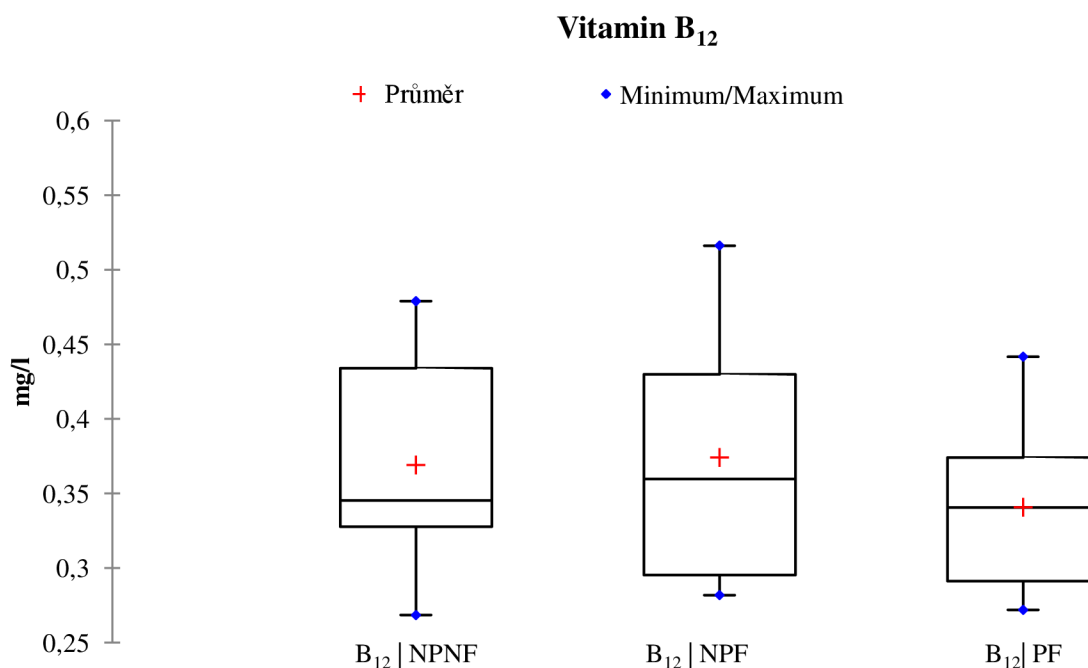
Vitamin B₉ se podařilo stanovit ve velmi nízkých koncentracích. Při porovnání dvou skupin, ve kterých byl vitamin B₉ naměřen (obrázek 20), nebyl pozorován statisticky významný rozdíl (pro vitamin B₉ vyhodnotila analýza rozptylu parametr F 0,008 a P 0,934; $F_{krit} = 3,56$). Na základě Tukeyho testu lze diskutovat vyšší obsah vitamínu B₉ v pivech pasterizovaných, filtrovaných (průměrná koncentrace vitamínu B₉ 0,067 mg/l) oproti skupině NPNF piv, kde byla průměrná koncentrace vitamínu B₉ stanovena na 0,065 mg/l, což může z hlediska pasterizace souviset s tepelnou stabilitou tohoto vitamínu. Gazzali et al. [65] upřesňuje v souladu s řadou studií [66, 67] o stabilitě kyseliny listové v kapalných médiích, že degradace této kyseliny začíná při teplotě 180 °C. Při teplotách nižších než 180 °C je relativně stabilní. Day a Gregor [66] také testovali tepelnou stabilitu kyseliny listové, a to v přítomnosti železa, askorbátu nebo obou těchto látek při teplotách 100 °C, 120 °C a 140 °C. Dle výsledků jejich pozorování vykazoval vitamin B₉ nejvyšší stabilitu v přítomnosti železa, což koreluje z hlediska filtrace i s našimi výsledky. Jelikož jsou v pivovarnictví využívány svíčkové filtry s filtračním materiálem křemelinou či perlitem (viz kapitola *Filtrace*), může být v kyselém prostředí uvolňováno železo. Tento fakt by mohl zapříčinit vyšší koncentrace vitamínu B₉ u skupiny PF. Obecně však nebyl nalezen žádný trend v rámci použitých postfermentačních metod. Co se týče průměrné koncentrace niacinu v pivu, uvádí Walker [20] hodnoty 0,10 až 0,13 mg/l, přičemž Hardwick [62] stanovil množství vitamínu B₃ v rozmezí 0,03–0,10 mg/l. V obou případech hodnoty korelují s našimi výsledky.



Obrázek 20: Krabicový graf pro vitamin B₉

4.2.4 Vliv postfermentačních technologií na obsah vitamínu B₁₂ v pivu

Stejně jako v předchozím případě, ani u vitamínu B₁₂ nebyl vyhodnocen statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami piv (hodnoty pro parametry analýzy rozptylu jsou P 0,691 a F 0,377; F_{krit} = 3,56). Z krabicového grafu na obrázku 21 je patrné, že průměrná koncentrace kyanokobalaminu v NPF pivech byla opravdu jen o málo vyšší než jeho obsah ve skupině NPNF, což dokazuje také Tukeyho test hodnotou P 0,991, která je velmi blízká číslu 1. V rámci skupiny NPF bylo zaznamenáno nevyšší množství vitamínu B₁₂ ve vzorku Klášter (0,516 mg/l), zatímco ve skupině NPNF se od průměrné hodnoty odlišuje pouze Jarošovský ležák, jehož obsah vitamínu B₁₂ je nejnižší mezi vzorky této skupiny (0,268 mg/l). Minimální rozdíl mezi těmito skupinami pravděpodobně souvisí s faktem, že pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) nejsou známy jako producenti vitamínu B₁₂ a ani tento vitamín pravděpodobně neutilizují [68, 69]. Při Tukeyho testu NPNF a PF piv byla hodnota parametru P 0,758, což sice nevypovídá o statisticky významném vlivu pasterizace, ale naznačuje možný vliv této postfermentační technologie na obsah vitamínu B₁₂ v pivu. Macdonald et al. [70] se zabývali hodnocením účinků pasterizace na hladinu vitamínů v mléce, kde byl také zaznamenán pokles vitamínu B₁₂. Přestože se jednalo o jinou komoditu, vliv pasterizace byl i v tomto případě minimální, což může souviset se skutečností, že kyanokobalamin je nejstabilnější forma vitamínu B₁₂ [68]. V rámci průměrné koncentrace vitamínu B₁₂ v pivu, uvádí Hardwick [62] ve své studii hodnotu 0,09–0,14 mg/l a Walker [15] zaznamenal pouze stopová množství. V našem případě (tabulka 7–9) se stanovená průměrná koncentrace pohybuje v rozmezí 0,26–0,51 mg/l.



Obrázek 21: Krabicový graf pro vitamín B₁₂

4.3 Vliv obsahu jednotlivých vitaminů skupiny B na nutriční hodnotu piva

Pivo je alkoholický nápoj, který mimo jiné obsahuje určité množství vitaminů skupiny B, které při střídavé konzumaci může pozitivně ovlivnit zdraví člověka. Na základě průměrných koncentrací vitaminu B₂, B₃, B₉ a B₁₂, které byly stanoveny pro jednotlivé skupiny piv (PF, NPF, NPNF), byl pro splnění DDD těchto vitaminů vypočten denní příjem uvedených piv (viz tabulka 10–12).

Tabulka 10: Vypočtené množství PF piva pro splnění DDD vitaminů

	DDD (ženy/muži) [mg/den]	Průměrná koncentrace filtrovaná, pasterizovaná piva [mg/l]	Množství piva (ženy/muži) [l]
B₂	1,1/1,3	0,797	1,39/1,64
B₃	14/16	17,437	0,81/0,92
B₉	0,4/0,4	0,067	5,98/5,98
B₁₂	0,002 4/0,002 4	0,340	0,01/0,01

V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty pro skupinu pasterizovaných a zároveň filtrovaných piv. Na základě DDD a stanovené průměrné koncentrace vitaminů v pivu bylo zjištěno, že pro splnění DDD vitaminu B₂ u žen by stačily 3 půllitrové PF piva, kdežto muž by měl vypít 4 tyto piva. U vitaminů B₃, B₉ a B₁₂ se počet půllitrových piv pro ženy a muže neliší, což znamená, že k doplnění vitaminu B₃ je potřeba vypít 2 piva, pro splnění DDD vitaminu B₉ 12 piv a po vypití jednoho půllitrového piva přijmeme 50x vyšší množství vitaminu B₁₂ než je doporučováno. Analyzované množství vitaminu B₁₂ odpovídá neaktivní formě této látky – kyanokobalaminu – jejíž nutriční význam závisí na následném metabolickém zpracování.

Tabulka 11: Vypočtené množství NPF piva pro splnění DDD vitaminů

	DDD (ženy/muži) [mg/den]	Průměrná koncentrace Nepasterizovaná, filtrovaná piva [mg/l]	Množství piva (ženy/muži) [l]
B₂	1,1/1,3	0,837	1,32/1,56
B₃	14/16	18,703	0,75/0,86
B₉	0,4/0,4	LOD	
B₁₂	0,002 4/0,002 4	0,372	0,01/0,01

V tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty pro skupinu nepasterizovaných filtrovaných piv. Pro splnění DDD vitaminu B₂ u žen by stačily 3 půllitrové NPF piva, kdežto muž by měl vypít čtyři. U vitaminů B₃ a B₁₂ se počet půllitrových piv pro ženy a muže neliší, což znamená, že k doplnění vitaminu B₃ by bylo potřeba vypít 2 piva, zatímco pro DDD vitaminu B₁₂ by stačilo pouhých 10 ml NPF piva. Průměrná hodnota koncentrace vitaminu B₉ u této skupiny piv byla pod mezí detekce, proto množství potřebných piv nelze určit.

Tabulka 12: Vypočtené množství NPNF piva pro splnění DDD vitaminů

	DDD (ženy/muži) [mg/den]	Průměrná hodnota nepasterizovaná, nefiltrovaná piva [mg/l]	Množství piva (ženy/muži) [l]
B₂	1,1/1,3	0,983	1,12/1,33
B₃	14/16	10,210	1,38/1,57
B₉	0,4/0,4	0,065	6,16/6,16
B₁₂	0,002 4/0,002 4	0,369	0,01/0,01

V tabulce 12 jsou uvedeny hodnoty pro skupinu nepasterizovaných nefiltrovaných piv. Pro splnění DDD vitamínu B₂ by postačily 3 půllitrové NPF piva jak u mužů, tak u žen. Pro doplnění vhodného množství vitaminů B₃ se doporučují 3 piva pro ženy a 4 pro muže. U vitaminů B₉ a B₁₂ se počet půllitrových piv pro ženy a muže neliší, proto k doplnění vitamínu B₉ by bylo zapotřebí 12 piv a denní dávka vitamínu B₁₂ je obsažena v pouhých 10 ml NPF piva.

Dostatečný příjem vitaminů skupiny B je pro člověka esenciální. Tyto ve vodě rozpustné vitaminy jsou součástí enzymů, proto zásadně ovlivňují metabolismus základních živin – sacharidů, bílkovin a tuků. Pro jejich správnou funkci v organismu je nutná konverze z neaktivní formy v aktivní formu, přičemž významné je spolupůsobení všech vitaminů B-komplexu. Společně napomáhají k udržení zdravé nervové soustavy, mozku, zažívacího ústrojí, kůže, očí a vlasů [49, 69, 71].

Na základě výše uvedených informací lze pivo považovat za dobrý zdroj vitaminů B. Ze všech testovaných druhů piv je vitamin B₂ nejvíce zastoupen v pivech nefiltrovaných nepasterizovaných, zatímco obsah vitaminů B₃ a B₁₂ je nejvyšší v pivech nepasterizovaných filtrovaných. Koncentrace vitamínu B₉ je u pasterizovaných filtrovaných piv vyšší než u ostatních.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo posouzení vlivu postfermentačních technologií (filtrace, pasterizace) na obsah vybraných vitaminů v pivu.

Pro experimentální účely bylo zajištěno 28 vzorků pív, které byly na základě různých postfermentačních úprav klasifikovány do tří skupin: PF, NPF a NPNF piva. Za účelem separace a identifikace vitaminů B v pivu, byla pro analýzu výše zmíněných vzorků zvolena HPLC metoda. Vysokého rozlišení píků a separační účinnosti bylo dosaženo optimalizací a následnou validací této metody. Získaná data byla zpracována statistickou metodou – analýzou rozptylu (ANOVA), která vyhodnotila statisticky významné či nevýznamné rozdíly v koncentracích B vitaminů mezi jednotlivými skupinami.

Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami pív byl zaznamenán u vitaminu B₂ a B₃. V obou případech se jedná o rozdíl mezi filtrovanými (NPF, PF) a nefiltrovanými (NPNF) pivy, což vypovídá o statisticky významném vlivu filtrace. U vitaminu B₂ způsobila filtrace snížení jeho obsahu v pivu, proto je diskutabilní vliv pozůstalých pivovarských kvasinek v těchto „živých pivech“. Vyšší množství riboflavinu v NPNF pivech nasvědčuje jeho uvolňování z přítomné kvasniční biomasy, avšak odbornou literaturou nebyla tato úvaha potvrzena.

V případě vitaminu B₃ byla vyšší koncentrace zaznamenána naopak v pivech filtrovaných. Tento fakt vysvětluje potřeba některých kvasinek, včetně *Saccharomyces cerevisiae*, přijímat niacin ve formě NAD k zajištění svého růstu. Za anaerobních podmínek se tedy *S. cerevisiae* divokého typu chová jako auxotrof, který využívá kyseliny nikotinovou. Z rozdílů, které byly stanoveny mezi skupinami pív NPF a PF, lze usuzovat, že vliv pasterizace na obsah vitaminu B₂ a B₃ je minimální. Ze všech analyzovaných vzorků patří k bohatým na vitamin B₃ Radegast, Ryze hořká 12 a Bakalář, které spadají do skupiny PF, zatímco nejvyšší zastoupení vitaminu B₃ bylo stanoveno ve vzorku Starobrno – Drak ze skupiny NPF s koncentrací niacinu 27,769 mg/l. Vitamin B₉ se podařilo stanovit ve skupinách NPNF a PF pív, ale statisticky významný rozdíl nebyl pozorován. Vliv pasterizace je potlačen vzhledem k termostabilitě kyseliny listové, jejíž degradace začíná až při 180 °C. Stabilitu této kyseliny lze také ovlivnit přítomností železa, které může být při filtraci piva uvolňováno v malém množství z filtračního materiálu (křemelina, perlit). Vitamin B₁₂ byl stanoven ve všech třech skupinách pív, avšak statisticky významný vliv zkoumaných technologických úprav nebyl opět potvrzen. Zaměřili jsme se také na vitamin B₆, jehož obsah v pivu byl dle předchozích studií Walkera a Hardwicka stanoven v koncentracích 0,13–1,7 mg/l. Z důvodu limitů naší instrumentace jsme nebyli schopni ve vybraných pivech tento vitamin naměřit.

V rámci této práce byl také studován vliv postfermentačních technologií na nutriční hodnotu piva. Z výsledných koncentrací vitaminů skupiny B lze usoudit, že jejich vyvážený obsah v pivu může pokrýt, při střídavé konzumaci, část doporučené denní dávky. Z toho vyplývá, že obsah vitaminů B-komplexu hraje z hlediska nutriční hodnoty piva významnou roli. Dle naměřených dat by např. k pokrytí DDD vitaminu B₂ měla stačit 3 půllitrová NPNF piva jak mužům, tak ženám, zatímco ke splnění denní potřeby vitaminu B₃ se doporučují vypít 2 NPF piva. Konzumace 1 l piva pokrývá u vitaminu B₂ (NPNF piva) 89 % DDD u žen

a 75 % u mužů. Pro vitamin B₃ představuje 1 l NPF piva 133 % doporučené denní dávky u žen a 116 % u mužů.

Technologické operace, filtrace a pasterizace, které jsou aplikovány při výrobě piva, zajišťují stabilitu a prodloužení trvanlivosti výrobku. V některých případech však mohou negativně ovlivnit nutriční hodnotu finálního produktu, což bylo potvrzeno v této diplomové práci.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [2] Suroviny pro výrobu piva. In: *News-insider.de* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.news-insider.de/finanzen/gallery/argumente-gegen-das-reinheitsgebot-fuer-bier>
- [3] BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7
- [4] KOSAŘ, K. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902-6586-3.
- [5] Obilka. In: *Vlastovicka.cz* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.vlastovicka.cz/cz/pekarina/detail/od-obilky-k-mouce-aneb-jak-vznika-mouka-v-ceskych-mlynech/365>
- [6] KOPÁČOVÁ, O. *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. Praha: ÚZPI, 2007. ISBN 978-807-2711-840.
- [7] MATELJAN, G. Barley. *The World's Healthiest Foods* [online]. Brno: The George Mateljan Foundation, © 2001-2018 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=nutrientprofile&dbid=91>
- [8] Humulus lupulus. In: *Fast-growing-trees.com* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://www.fast-growing-trees.com/images/D/Cascade-Hops-Plant-2-450w.jpg>
- [9] Slad. *Sladovna Bruntál* [online]. Brno: SLADOVNA, spol. s r.o., © 2018 [cit. 2018-04-28]. Dostupný z: <http://www.sladovnabruntal.cz/>
- [10] PELIKÁN, M., F. DUDÁŠ a D. MÍŠA, 2002. *Technologie kvasného průmyslu*. 2. vydání. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-578-X.
- [11] PRIEST, F a G. STEWART. *Handbook of brewing*. 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor, 2006. Food science and technology (Taylor, 157. ISBN 978-082-4726-577.
- [12] Schéma procesu výroby piva. *České pivo, české zlato* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://ceskepivo-ceskezlato.cz/pivovarnictvi/18/>
- [13] VERHOEF, B. *Velká encyklopedie piva*. 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 2003. ISBN 80-723-4283-5.]
- [14] BRIGGS, D. E., C. A. BOULTON, R. STEVENS a P. BROOKES. *Brewing: science and practice*. Cambridge, England: Woodhead Pub., 2004. ISBN 18-557-3490-7.
- [15] MACWILLIAM, I. C. WORT COMPOSITION-A REVIEW. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1968.tb03095.x. ISBN 10.1002/j.2050-0416.1968.tb03095.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1968.tb03095.x>

- [16] BRIGGS, D. E., J. S. HOUGH, R. STEVENS a T.W. YOUNG. (1981) *Malting and Brewing Science* (2nd edn), Vol. 1. *Malt & Sweet Wort*. London, Chapman and Hall, 387 pp.
- [17] ZAVŘELOVÁ, M. The composition of barley grain in regards to food technology. *Kvasny Prumysl.* 2018-05-01, 60(5), 127-130. DOI: 10.18832/kp2014013. ISSN 00235830. Dostupné také z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2014013.html>
- [18] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [19] ROP, O., J. HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [20] WALKER, G. M. *Yeast - Physiology and Biotechnology* [online]. John Wiley & Sons, 1998 [cit. 2018-04-29]. Dostupné z WWW: <http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2902&VerticalID=0>.
- [21] ROBINSON, R. K. *Encyclopedia of Food Microbiology : Volumes 1-3* [online]. Elsevier, 2000, [cit. 2018-04-29]. Dostupné z WWW: <http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1870&VerticalID=0>.
- [22] Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. In: Microbiologyonline.org [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://microbiologyonline.org/about-microbiology/introducing-microbes/fungi>
- [23] LINKO, M., et al. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*. 1998, Vol. 65, s. 85-98.
- [24] KADLEC, P., K. MELZUCH a M. VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava: Key Publishing, 2013. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4
- [25] PELIKÁN, M., D. MÍŠA a F. DUDÁŠ. *Technologie kvasného průmyslu*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1996. ISBN 80-715-7240-3.
- [26] KUNZE, W. *Technology brewing and malting: international edition*. 2. ed. Berlin: VLB, 1999. ISBN 39-216-9039-0.
- [27] VIÑAS, P., I. LÓPEZ-GARCÍA, M. BRAVO-BRAVO, M. BRICEÑO a M. HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 403(4), 1059-1066. DOI: 10.1007/s00216-012-5804-2. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-5804-2>
- [28] MARSZAŁŁ, M. L., A. LEBIEDZIŃSKA, W. CZARNOWSKI a P. SZEFER. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in

- pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1094(1-2), 91-98. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.091. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305015918>
- [29] VIÑAS, P., C. LÓPEZ-ERROZ, N. BALSALOBRE a M.HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. Determination of Thiamine and Its Esters in Beers and Raw Materials Used for Their Manufacture by Liquid Chromatography with Postcolumn Derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51(11), 3222-3227. DOI: 10.1021/jf021071f. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf021071f>
- [30] EITENMILLER, R. R., L. YE a W. O. LANDEN. *Vitamin analysis for the health and food sciences*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2008. ISBN 978-0-8493-9771-4.
- [31] GIBSON, R. S. *Principles of nutritional assessment*. New York: Oxford University Press, 1990. ISBN 01-950-5838-0.
- [32] LAMNI-KEEFE, C. J., S. C. COUCH a E. H. PHILIPSON. *Handbook of nutrition and pregnancy*. Totowa, NJ: Humana Press, c2008. ISBN 978-1-58829-834-8.
- [33] *Oregon state university* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins>
- [34] *Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
- [35] LYNCH, P. L. M. a I. S. YOUNG. *Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*. 2000, 881(1-2), 267-284. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00089-3. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300000893>
- [36] BAXTER, D. a P. S. HUGHES. *Beer: Quality, safety and nutritional aspects*, Royal Society of Chemistry, 2001, ISBN 0-8504-588-0
- [37] FURIA, T. E. *CRC handbook of food additives*. 2d ed. Cleveland: CRC Press, 1972. ISBN 08-493-0543-8.
- [38] HLÚBIK, P. Vitaminy – důležitý faktor ovlivňující zdraví 2. část: Metabolismus hydrosolubilních vitaminů. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001b, roč. 3, č. 12, [cit. 2018-04-17]. Dostupný z WWW: <<https://www.solen.cz/pdfs/int/2001/12/06.pdf>>. ISSN -1803-5256.
- [39] DAINTY, J. R., N. R. BULLOCK, D. J. HART, A. T. HEWSON, R. TURNER, P. M. FINGLAS, et al. *Quantification of the bioavailability of riboflavin from foods by use of stable-isotope labels and kinetic modeling*. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1557-64.
- [40] PRODANOV, M., I. SIERRA a Vidal-Valverde, C., Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes, *Food Chem.*, 84, 271, 2004.

- [41] Pantothenic acid. *National Center for Biotechnology Information*. [online]. Brno: PubChem Compound Database. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pantothenic_acid
- [42] SHIN, Y. S., R. RASSHOFER, B. FRIEDRICH a W. ENDRES. Pyridoxal 5'-phosphate determination by a sensitive micromethod in human blood, urine and tissues: its relation to cystathioninuria in neuroblastoma and biliary atresia, *Clin. Chim. Acta*, 127, 77, 1983.
- [43] LEKLEM, J.E. Vitamin B-6. In: Shils M, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999:413-422.
- [44] HANSEN, C. M., T. D. SHULTZ, H.-K. KWAK, H. S. MEMON a J. E. LEKLEM. Assessment of Vitamin B-6 Status in Young Women Consuming a Controlled Diet Containing Four Levels of Vitamin B-6 Provides an Estimated Average Requirement and Recommended Dietary Allowance. DOI: 10.1093/jn/131.6.1777. ISBN 10.1093/jn/131.6.1777. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jn/article/131/6/1777/4686796>
- [45] BEBOVÁ, M. *Biochemička* [online]. Brno: biochemicka.cz, © 2013–2014. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.biochemicka.cz/clanek-86/problematika-nedostatku-vitaminu-b12>
- [46] LEBLANC, J. G., C. MILANI, G. S. DE GIORI, F. SESMA, D. VAN SINDEREN a M. VENTURA. *Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective*. DOI: 10.1016/j.copbio.2012.08.005. ISBN 10.1016/j.copbio.2012.08.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095816691200119X>
- [47] GROPPER, S. A. S., J. L. SMITH, J. L. GROFF. *Advanced nutrition and human metabolism*. 5th ed. Australia: Wadsworth/Cengage Learning, 2009, 600 s. ISBN 9780495116578
- [48] SHILS, M. E. et al. *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 0781741335.
- [49] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Vyd. 2., upr. Tábor: OSSIS, 2002, 303 s. ISBN 80866590112.
- [50] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava:Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [51] DONG, M. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. ISBN 04-719-7309-2.
- [52] PRAUS, P a J. VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. 1. vydání. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [53] HPLC Center. *Fluidic Systems - Fluid Path Components* | IDEX Health & Science [online]. Oak Harbor: IDEX Corporation, c2016 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://www.idexhs.com/education-and-tools/educational-materials/hplc-center>

- [54] KAZAKEVICH, Y. a R. LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 04-716-8162-8.
- [55] *Analýza roptylu (ANOVA)* [online]. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn3/ANOVA.htm>
- [56] PYTELA, O. *Chemometrie pro organické chemiky*. Vyd. 4. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003. ISBN 80-719-4539-0.
- [57] ECKSCHLAGER, K. 1991. *Chemometrie*. 1. vyd. Praha: Universita Karlova, 156 s. ISBN 80-706-6487-8.
- [58] VOPELKOVÁ, D. *Posouzení vlivu pasterizace a filtrace na obsah vybraných chemických složek piva*. Brno, 2017. Bakalářská práce. VUT fakulta chemická.
- [59] SHERAZ, M. A., S. H. KAZI, S. AHMED, Z. ANWAR a I. AHMAD. *Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin*. DOI: 10.3762/bjoc.10.208. ISBN 10.3762/bjoc.10.208. Dostupné také z: <http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/10/1/208>
- [60] MASŁOWSKA, J. a M. MALICKA. *Thermal behaviour of riboflavin*. DOI: 10.1007/BF01913365. ISBN 10.1007/BF01913365. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01913365>
- [61] HUCKER, B., L. WAKELING a F. VRIESEKOOOP. *Vitamins in brewing: presence and influence of thiamine and riboflavin on wort fermentation*. DOI: 10.1002/jib.293. ISBN 10.1002/jib.293. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.293>
- [62] HARDWICK, W. A. *Handbook of brewing*. New York: M. Dekker, c1995. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 64. ISBN 08-247-8908-3.
- [63] LI, Y-F a W-G BAO. *Why do some yeast species require niacin for growth? Different modes of NAD synthesis*. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2007.00231.x. ISBN 10.1111/j.1567-1364.2007.00231.x. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2007.00231.x>
- [64] PANOZZO, C., M. NAWARA, C. SUSKI, R. KUCHARCZYKA, M. SKONECZNY, A-M BÉCAM, J.RYTKA a C. J. HERBERT. *Aerobic and anaerobic NAD metabolism in Saccharomyces cerevisiae*. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02585-1. ISBN 10.1016/S0014-5793(02)02585-1. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(02\)02585-1](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(02)02585-1)
- [65] GAZZALI, A. M., M. LOBRY, L. COLOMBEAU, et al. *Stability of folic acid under several parameters*. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.08.045. ISBN 10.1016/j.ejps.2016.08.045. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098716303347>
- [66] DAY, B. P. F. a J. F. GREGORY. *Thermal Stability of Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Liquid Model Food Systems*. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb10795.x. ISBN 10.1111/j.1365-2621.1983.tb10795.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10795.x>

- [67] PAINE-WILSON, B. a T. S. CHEN. Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb08484.x. ISBN 10.1111/j.1365-2621.1979.tb08484.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08484.x>
- [68] FANG, H., J. KANG a D. ZHANG. *Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives*. DOI: 10.1186/s12934-017-0631-y. ISBN 10.1186/s12934-017-0631-y. Dostupné také z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0631-y>
- [69] HLÚBIK, P., L. OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [70] MACDONALD, L. E., J. BRETT, D. KELTON, E. SHANNON, K. SNEDEKER a J. M. SARGEANT. *A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effects of Pasteurization on Milk Vitamins, and Evidence for Raw Milk Consumption and Other Health-Related Outcomes*. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-269. Dostupné také z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-10-269>
- [71] BALCH, J. F. a P. A. *Bible předpisů zdravé výživy*. 1. vyd. Praha: Pragma, 1998. 572 s. ISBN 80-7205-637-9.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA	Analýza rozptylu (Analysis of variance)
DAD	diodové pole
CK	cyliindrokónický
CoA	koenzym A
DDD	doporučená denní dávka
DFE	ekvivalent folátu (dietary folate equivalent)
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadenindinukleotid fosfát
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
MDL	limit detekce metody (method detection limit)
MF	mobilní fáze
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NE	ekvivalent niacinu (niacin equivalent)
NPF	skupina piv nepasterizovaných, filtrovaných
NPNF	skupina piv nepasterizovaných, nefiltrovaných
PF	skupina piv pasterizovaných, filtrovaných
PL	pyridoxal
PM	pyridoxamin
PN	pyridoxin
PLP	pyridoxal fosfát
PMP	pyridoxamin fosfát
PNP	pyridoxin fosfát
PP	starší název pro vitamin B ₃ (Pellagra Preventive factor)
THF	tetrahydrofolát
TMP	monofosfát thiaminu
TPP	pyrofosfát thiaminu
TTP	trifosfát thiaminu
UV	ultrafialová část spektra
VIS	viditelná část spektra