



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

OBSAH LIPIDŮ A MASTNÝCH KYSELIN V ZÁVISLOSTI NA ODRŮDĚ JEČMENE

LIPID AND FATTY ACID CONTENT DEPENDING ON THE BARLEY VARIETY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Havlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zdeněk Svoboda, DiS.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1804/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Michaela Havlíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **Ing. Zdeněk Svoboda, DiS.**

Název bakalářské práce:

Obsah lipidů a mastných kyselin v závislosti na odrůdě ječmene

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše k dané problematice (lipidy a mastné kyseliny, jejich výskyt a význam v zrnu ječmene, možnosti stanovení lipidů a mastných kyselin)
2. Stanovení obsahu lipidů a profilu mastných kyselin v různých odrůdách ječmene
3. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Michaela Havlíková
studentka

Ing. Zdeněk Svoboda, DiS.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá zhodnocením vlivu odrůdy ječmene na obsah lipidů a profil mastných kyselin. Byly analyzovány vzorky sladovnického ječmene a z něj vyrobeného sladu sklizně roku 2022, sedmi odrůd doporučených Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a.s. pro výrobu piva s chráněným zeměpisným označením „České pivo“.

V teoretické části práce jsou charakterizovány lipidy a mastné kyseliny, je popsán jejich výskyt a význam v zrna ječmene, změny s nimi spojené v průběhu technologie výroby sladu a piva a jak tyto změny mohou ovlivnit výslednou kvalitu piva. Jsou uvedeny možnosti stanovení lipidů a mastných kyselin, pozornost je věnována stanovení profilu mastných kyselin metodou plynové chromatografie.

V experimentální části práce byly vyextrahovány lipidy z obilke ječmene a sladu metodou extrakce na fluidním loži přístrojem fexIKA® dive-in control. Vyextrahované lipidy byly podrobeny transesterifikační reakci a vzniklé methylestery mastných kyselin byly následně analyzovány metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí na kapilární koloně SLB-IL 100. Bylo identifikováno osm mastných kyselin v ječmeni i sladu jako jejich methylestery. Převládající mastnou kyselinou byla kyselina linolová. Byl pozorován úbytek lipidů a změna profilu mastných kyselin způsobená sladováním.

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the evaluation of the influence of barley variety on lipid content and fatty acid profile. Samples of barley and malt from the 2022 harvest, seven varieties recommended by Research Institute of Brewing and Malting, Plc. for the production of beer with the protected geographical indication „České pivo“, were analysed.

The theoretical part of the thesis characterizes lipids and fatty acids, describes their occurrence and importance in barley grain, describes the changes associated with them during the technology of malt and beer production and how these changes can affect the final quality of beer. The possibilities for the determination of lipids and fatty acids are given and attention is paid to the determination of the fatty acid profile by using the method of gas chromatography.

In the experimental part, lipids were extracted from barley grains and malt by fluidized bed extraction method using the fexIKA® dive-in control extractor. The extracted lipids were transesterified into methyl esters of the corresponding fatty acids, which were analysed by gas chromatography with flame ionization detection on a SLB-IL 100 capillary column. In both barley and malt were identified eight fatty acids as their methyl esters. The predominant fatty acid was linoleic acid. Reduction of total lipid content and change in fatty acid profile due to the malting process were observed.

KLÍČOVÁ SLOVA

lipidy, mastné kyseliny, ječmen, slad, plynová chromatografie

KEYWORDS

lipids, fatty acids, barley, malt, gas chromatography

HAVLÍKOVÁ, Michaela. *Obsah lipidů a mastných kyselin v závislosti na odrůdě ječmene* [online]. Brno, 2023. 75 s. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148183>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Zdeněk Svoboda, Dis.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat panu Ing. Zdeňkovi Svobodovi, Dis. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při měření a následném zpracování výsledků. Děkuji za trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval. Poděkování patří také zaměstnancům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně, a.s.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Lipidy a mastné kyseliny	9
2.1.1	Lipidy.....	9
2.1.2	Mastné kyseliny	9
2.2	Výskyt a význam lipidů a mastných kyselin v rostlinách a jejich semenech.....	10
2.3	Ječmen.....	11
2.3.1	Lipidy a mastné kyseliny v obilce ječmene	11
2.4	Slad	12
2.4.1	Lipidy a mastné kyseliny ve sladu	12
2.5	Enzymatická oxidace lipidů.....	13
2.6	Rozdílné zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene a ve sladu	15
2.7	Změny lipidů a mastných kyselin během technologického procesu výroby a jejich vliv na kvalitu sladu a piva	15
2.7.1	Změny lipidů při sladování	15
2.7.1.1	Máčení.....	15
2.7.1.2	Klíčení.....	16
2.7.1.3	Hvozdění	16
2.7.2	Změny lipidů při přípravě sladiny.....	16
2.7.2.1	Vystírání a rmutování.....	16
2.7.2.1.1	Rozdílné zastoupení lipidů při infuzním/dekokčním způsobu rmutování.....	17
2.7.2.2	Scezování sladiny a vyslazování mláta	17
2.7.2.2.1	Aktivita enzymů při sladování	18
2.7.3	Změny lipidů při přípravě mladiny	18
2.7.3.1	Chmelovar	18
2.7.3.2	Chlazení mladiny a vylučování kalů ve vířivé kádi	18
2.7.4	Změny lipidů při kvašení mladiny a dokvašování piva	18
2.7.4.1	Úpravy před kvašením	19
2.7.4.2	Provzdušnění mladiny – vliv kyslíku na metabolismus pivovarských kvasinek	19
2.7.4.3	Zakvášení	19
2.7.4.4	Hlavní kvašení.....	19
2.7.4.5	Dokvašení a zrání piva.....	20
2.7.5	Změny lipidů při finálních úpravách piva – filtrace, pasterace, stáčení	20
2.7.6	Změny lipidů a jejich vliv na stárnutí piva	20
2.7.6.1	Vliv kyslíku.....	22
2.7.6.1.1	Fotooxidace (singletovým) kyslíkem.....	22
2.7.6.1.2	Radikálová oxidace	22
2.7.6.2	Ovlivnění sensorické stability piva.....	22
2.7.7	Vliv lipidů a mastných kyselin na pěnovost piva	23
2.7.7.1	Tvorba pivní pěny a ovlivnění pěnovosti.....	23
2.7.7.2	Přepěnování piva (gushing).....	24

2.8 Stanovení obsahu lipidů a mastných kyselin	25
2.8.1 Stanovení obsahu lipidů.....	25
2.8.1.1 Extrakční metody vhodné pro obiloviny.....	25
2.8.1.1.1 Metoda podle Soxhleta.....	26
2.8.1.1.2 SFE – superkritická fluidní extrakce.....	27
2.8.1.1.3 FBE – extrakce na fluidním loži	27
2.8.1.1.4 SPE – extrakce na pevné fázi.....	28
2.8.2 Metody stanovení mastných kyselin.....	29
2.8.3 Analýza mastných kyselin metodou plynové chromatografie	29
2.8.3.1 Příprava methylesterů mastných kyselin (FAME).....	29
2.8.3.1.1 Kyselá katalyzovaná esterifikace	30
2.8.3.1.2 Bazický katalyzovaná esterifikace	30
2.8.3.2 Plynová chromatografie	30
2.8.3.2.1 Instrumentace plynového chromatografu.....	30
2.8.3.2.1.1 Zdroj plynu a zařízení pro regulaci a měření průtoku nosných plynů	31
2.8.3.2.1.2 Dávkovací zařízení.....	31
2.8.3.2.1.3 Kolona.....	31
2.8.3.2.1.4 Termostat	33
2.8.3.2.1.5 Detektor	33
2.8.3.2.1.6 Zařízení na zpracování a záznam signálu detektoru a vyhodnocení analýzy.	34
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
3.1 Laboratorní vybavení a chemikálie.....	35
3.1.1 Přístroje.....	35
3.1.2 Pracovní pomůcky	35
3.1.3 Chemikálie.....	35
3.1.4 Plyny.....	36
3.2 Příprava vzorků.....	36
3.3 Stanovení lipidů	36
3.3.1 Porovnání stanovení obsahu lipidů s referenční metodou	37
3.4 Stanovení mastných kyselin.....	38
3.4.1 Příprava methylesterů mastných kyselin	38
3.4.1.1 Alkalická esterifikace vyextrahovaných lipidů.....	38
3.4.1.2 Kyselá esterifikace vyextrahovaných lipidů	38
3.4.2 Analýza methylesterů mastných kyselin metodou plynové chromatografie.....	39
3.5 Validace	40
3.6 Statistické zpracování výsledků	41
3.6.1 Aritmetický průměr.....	41
3.6.2 Směrodatná odchylka (SD).....	42
3.6.3 Rozšířená nejistota měření (U)	42
3.6.4 Relativní směrodatná odchylka (RSD)	42
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	43
4.1 Opakovatelnost extrakce tuků.....	43
4.2 Porovnání stanovení obsahu lipidů s referenční metodou.....	43

4.3	Optimalizace počtu cyklů extrakce	43
4.4	Stanovení obsahu lipidů v různých odrůdách ječmene a sladu	44
4.5	Validační parametry GC-FID.....	46
4.5.1	Opakovatelnost	46
4.5.2	Linearita.....	46
4.5.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	48
4.6	Stanovení obsahu mastných kyselin v různých odrůdách ječmene a sladu	48
4.6.1	Změny relativního zastoupení mastných kyselin způsobené procesem sladování.....	56
4.6.2	Porovnání metody alkalické a kyselé esterifikace pro přípravu FAME	59
5	ZÁVĚR	61
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	69
8	SEZNAM PŘÍLOH	70
9	PŘÍLOHY	71

1 ÚVOD

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je druh obiloviny, která se pěstuje pro sladovnické, krmné a potravinářské účely. Pro výrobu sladu a následně piva je v České republice hlavní surovinou ječmen jarní. Lipidy a mastné kyseliny přítomné v obilce ječmene a následně ve sladu, které v technologii výroby piva přechází až do finálního výrobku, mohou nepříznivě ovlivňovat kvalitu piva. Jedná se zejména o sensorický profil piva a stabilitu pивní pěny, což jsou parametry, které mají pro spotřebitele velký význam.

V průběhu klíčení ječmene dochází k strukturním změnám a odbourávání nebo syntéze sloučenin, jejichž důsledkem je změna obsahu lipidů a profilu mastných kyselin. Během procesu sladování také vzrůstá aktivita lipas a lipoxygenas a produkty jejich činnosti mohou dále podléhat sérii reakcí, které vedou ke zhoršení sensorických vlastností piva. Riziko představují zejména polynenasycené mastné kyseliny linolová, linolenová a arachidonová, jejichž dvojná vazba je oxidována molekulovým kyslíkem. Nejvýznamnějším zástupcem sensoricky aktivních produktů je aldehyd (2E)-non-2-enal, jehož zvýšená hladina, která se projevuje jako chuť a vůně po kartonu a lepence, je způsobená oxidací linolové kyseliny.

Množství a zastoupení lipidických látek v pivu závisí především na kvalitě vstupních surovin. Vhodným výběrem odrůdy ječmene v kombinaci s technologií sladování lze získat slad požadovaných vlastností, jehož kvalita výrazně ovlivňuje fyzikálně-chemické, biochemické i organoleptické vlastnosti piva.

Vzhledem k příspěvku lipidických látek a mastných kyselin k vývoji sensoricky nežádoucích sloučenin je cílem práce v teoretické části popsat, jaké změny lipidů a mastných kyselin mohou při výrobě sladu a piva nastat a jak se tyto změny podílí na výsledné kvalitě piva. Experimentální část práce má za cíl stanovení a porovnání obsahu lipidů a profilu mastných kyselin ve vybraných odrůdách ječmene a z něj vyrobeného sladu. Dále posouzení vlivu odrůdy ječmene na obsah lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilce. Závěrem, na základě teoretických poznatků a dosažených výsledků, výběr odrůd ječmene, které jsou profilem mastných kyselin vhodné pro výrobu sladů, jejichž použití by při výrobě piva mohlo zlepšit trvanlivost a kvalitu hotového výrobku. Případně výběr odrůd vhodných pro šlechtění.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy a mastné kyseliny

2.1.1 Lipidy

Lipidy tvoří ve výživě člověka jednu z hlavních živin nezbytnou pro zdraví a vývoj organismu [1]. Představují významný zdroj energie a důležitý stavební prvek buněčných membrán. Mají zásobní funkci a slouží k izolaci a ochraně [2]. Jde o různorodou skupinou látek biologického původu, které jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Řadíme zde různé tuky, oleje, nebílkovinné složky membrán, některé vitamíny, hormony a jejich prekurzory. Obvykle jsou definovány jako přírodní sloučeniny obsahující esterově vázané mastné kyseliny o více než třech atomech uhlíku v molekule.

Fyzikálně-chemické vlastnosti lipidů jsou dány zastoupením a strukturou navázaných mastných kyselin, s tím souvisí i jejich hydrofobicita, způsobená dlouhými nepolárními řetězci vázaných mastných kyselin [1; 3].

Lipidy můžeme na základě jejich chemického složení rozdělit do tří hlavních skupin na [1]:

- *Homolipidy*

Jsou tvořeny mastnými kyselinami esterově vázanými na alkoholy. Rozdělují se dle struktury vázaného alkoholu. Nejvýznamnějšími zástupci v potravinářství jsou triacylglyceroly, což jsou estery mastných kyselin a glycerolu, které se podle skupenství označují jako tuky nebo oleje. Dále jsou zde řazeny vosky, definované jako estery vyšších mastných kyselin a vyšších jednosytných alkoholů.

- *Heterolipidy*

Od homolipidů se odlišují přítomností další kovalentně vázané sloučeniny. Řadí se zde fosfolipidy, glykolipidy a sulfolipidy.

- *Komplexní lipidy*

Tvoří je nelipidový podíl a lipidická složka (homolipidy i heterolipidy), která je vázána pomocí vodíkových můstků nebo hydrofobními interakcemi. Částečně se zde uplatňují i kovalentní vazby. Řadí se zde lipoproteiny, glykolipidy a mukolipidy.

2.1.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou z výživového hlediska nejvýznamnější složkou lipidů. Jedná se o karboxylové kyseliny s většinou alifatickým uhlovodíkovým řetězcem a zpravidla sudým počtem atomů uhlíků v molekule. V praxi se často užívá jejich triviálních názvů. Vyznačují se amfipatickou povahou, a proto hrají důležitou roli v biologických tkáních jako složky membrán, kde ovlivňují jejich tekutost, integritu a propustnost [1].

V živých organismech jsou nejvíce zastoupeny mastné kyseliny s 16 nebo 18 atomy uhlíku v molekule. Speciální pozornost je věnována třem mastným kyselinám, které obsahují 18 atomů uhlíku v molekule – kyselině stearové, olejové a linolové. Mastné kyseliny se v organismech vyskytují především jako estery, ale mohou být přítomny i v neesterifikované formě jako tzv. volné mastné kyseliny.

Kondenzační reakcí mastných kyselin s glycerolem za uvolnění vody vznikají estery nazývané glyceridy. V případě esterifikace všech tří hydroxylových skupin na glycerolu hovoříme o triglyceridech, resp. triacylglycerolech, které řadíme mezi lipidy [4].

Podle charakteru vazeb v řetězci rozlišujeme mastné kyseliny na [1]:

- *Nasyčené mastné kyseliny*

Jsou běžnou složkou přírodních lipidů. Mají zpravidla rovný, nerozvětvený řetězec, nejčastěji o sudém počtu atomů uhlíku. Hlavními nasycenými mastnými kyselinami v lipidech potravin jsou kyseliny palmitová (C16:0) a stearová (C18:0).

- *Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové; MUFA)*

Liší se počtem atomů uhlíku, polohou dvojně vazby a její prostorovou konfigurací, která bývá u přírodních mastných kyselin zpravidla *cis*. První dvojná vazba se často objevuje mezi devátým a desátým atomem uhlíku v molekule. Nejznámějšími zástupci jsou kyselina olejová (C18:1 Δ^9) a palmitoolejová (C16:1 Δ^9).

- *Nenasycené mastné kyseliny s dvěma a více dvojnými vazbami (polyenové; PUFA)*

Stejně jako u monoenoových mastných kyselin i u těchto existují polohové a prostorové isomery. Zvláště významné jsou mastné kyseliny, které obsahují konjugované dvojně vazby a podstatně se tak odlišují svou reaktivitou a fyziologickými účinky. Mezi nejvýznamnější zástupce patří kyselina linolová (C18:2 $\Delta^{9,12}$), linolenová (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$), arachidonová (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) a eikosapentaenová (C18:5 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$).

- *Nenasycené mastné kyseliny s trojnou vazbou, rozvětvené, cyklické a různě substituované*
Tyto mastné kyseliny jsou ve srovnání s výše uvedenými v potravinářství méně důležité [1; 3].

2.2 Výskyt a význam lipidů a mastných kyselin v rostlinách a jejich semenech

Vegetativní buňky rostlin obsahují 5–10 % lipidů v sušině. Téměř veškerá tato hmotnost se nachází v membránách, jejichž vznik je umožněn kombinací nepolárních mastných acylových řetězců a polární hydrofilní hlavy tvořené karboxylovou skupinou, což má za následek amfipatické fyzikální vlastnosti fosfolipidů, které jsou pro tvorbu membrán zásadní. Lipidové membrány vytváří hlavní bariéru, která ohraničuje buňku a její jednotlivé organely, čímž vytváří kompartmenty. To napomáhá optimalizovat průběh chemických reakcí, které v buňce probíhají. Patří sem například sběr světla a přenos elektronů při fotosyntéze [5]. Strukturální glycerolipidy všech rostlinných membrán obsahují převážně čtyři mastné kyseliny – palmitovou, olejovou, linolovou a linolenovou [6].

Buňky krycích pletiv produkují kutikulární lipidy, které pokrývají povrch všech suchozemských rostlin a zajišťují hydrofobní bariéru, která zabraňuje ztrátám vody a chrání rostliny před patogeny a stresovými vlivy prostředí. Hlavní složkou kutikulárních lipidů je kutin, složený převážně z 16 až 18 uhlíkatých hydroxymastných kyselin [5].

V buňkách se kromě lipidů vyskytují v malé míře i volné mastné kyseliny. Slouží k acylaci některých membránových proteinů, nebo mohou působit jako prekurzory. Například biosyntéza kyseliny jasmonové (jasmínové) probíhá z α -linolenové kyseliny enzymatickou cestou pomocí lipoxygenasy. Kyselina jasmonová je řazena mezi přirozené růstové regulátory a ve zvýšené koncentraci se v rostlinách vyskytuje při stresovém zatížení a pomáhá jim adaptovat se na vzniklé stresové podmínky [5; 7].

Biosyntéza mastných kyselin představuje primární metabolickou dráhu, protože probíhá v každé rostlinné buňce a je nezbytná pro buněčný růst. V rostlinách na rozdíl od živočichů a hub není situována v cytoplasmě, ale v plastidech, především v chloroplastech. Rostliny proto musí disponovat mechanismy pro transport syntetizovaných mastných kyselin z plastidů do jiných míst v buňce [5; 8].

V semenech rostlina ukládá rezervní materiál, aby byl umožněn růst další generace, než budou nové semenáčky schopny fotosyntetizovat [2; 5]. Zásobní zdroj energie pro klíčení semen rostlin zastávají především triacylglyceroly [1; 9], které jsou před samotným klíčením hydrolyzovány lipasami. Uvolňují se mastné kyseliny a ty jsou následně transportovány do glyoxysomů a metabolizovány β -oxidací, kde konečným produktem je acetyl-CoA. Tento univerzální metabolit je v klíčících semenech přeměněn glyoxylátovým cyklem na sukcinát, který následně vstupuje do citrátového cyklu v mitochondriích a nakonec se glukoneogenezí v cytosolu přeměňuje na hexózy, které rostlina používá pro postgerminativní růst [5].

2.3 Ječmen

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je druh obiloviny z čeledi lipnicovité, do níž patří všechny obilniny s vysokým obsahem škrobu v plodech, které jsou zároveň základem pro výrobu potravin. Je známo 32 druhů ječmene, z nichž se určité odrůdy využívají majoritně jako suroviny pro výrobu piva. Další využití nachází ječmen jako surovina pro výrobu kávových náhražek, krup, krmiv a sladových výtažků [10].

Od konce 19. století je na území České republiky hlavní surovinou pro výrobu sladu a následně piva ječmen jarní [11]. Ječmen pěstovaný pro sladovnický průmysl je omezen na odrůdy s vysokým obsahem škrobu, dostatečným obsahem bílkovin a vysokou klíčivostí. Jsou vybírány odrůdy, které zaručují žádané vlastnosti finálního výrobku – piva [12].

Pěstování sladovnických odrůd vyžaduje oblasti mírného pásma, především střední Evropy, s nadmořskou výškou 200 až 300 m. n. m. a střední až hluboké hlinité půdy na spraši. Optimální průměrná roční teplota je 8,5 °C a průměrné roční srážky 500 až 600 mm. Tyto optimální podmínky pro pěstování jsou v České republice splněny zejména v oblasti Hané a v povodí velkých řek jako jsou Labe, Dyje a Morava [13].

2.3.1 Lipidy a mastné kyseliny v obilce ječmene

Zrno ječmene obsahuje 1,5 až 5 % lipidů v sušině. Z celkového množství jsou nejhojněji zastoupeny neutrální lipidy tvořené převážně triacylglyceroly (65–78 %), dále polární

fosfolipidy (15–26 %) a nejméně glykolipidy (7–13 %) [10]. Převážná část se nachází v aleuronové vrstvě, pluchách a zárodku [14]. Malé množství polárních lipidů se nachází v endospermu, zejména na povrchu škrobových zrn [10], kde vytváří amyloso-lipidové komplexy, jelikož amylosa má hydrofobní vlastnosti a umožňuje komplexaci s volnými mastnými kyselinami [12]. V povrchových vrstvách zrna se vyskytují vosky, karotenoidy, tokoferoly, steroly a jiné [10].

Největší zastoupení má linolová kyselina (kolem 50 %), následovaná kyselinou palmitovou a olejovou [11; 15]. Při sladování se tyto kyseliny částečně spotřebují při látkové výměně a zprostředkování dýchání. Lipidy aleuronové vrstvy z větší části zůstávají v mlátě.

Obsah lipidů v obilce je závislý na roku sklizně, zeměpisném původu a odrůdě ječmene, kdy největší vliv má rok sklizně a nejméně důležitá je odrůda. Významnost roku sklizně přímo souvisí s podmínkami pěstování jako je teplota, úhrn srážek a povětrnostní vlivy. Obsah mastných kyselin je ovlivněn také zeměpisným původem, který souvisí s nadmořskou výškou a teplotou v místě pěstování. Závislost na odrůdě není až tak velká, což je pravděpodobně způsobeno vysokou mírou křížení. U nejhojněji zastoupených mastných kyselin jako je kyselina linolová, palmitová a olejová, nebyly pozorovány výrazné rozdíly v obsahu, co se závislosti na odrůdě týče. Rozdíly mezi odrůdami byly zaznamenány u minoritně zastoupených kyselin jako je kyselina laurová, myristová, palmitoolejová, pentadekanová a arachidonová. Z toho vyplývá, že analýza obsahu mastných kyselin není spolehlivým nástrojem pro určení odrůdy, odráží však její původ. Odrůdy se liší především v obsahu nižších mastných kyselin, zatímco obsah těch vyšších je na odrůdě nezávislý [16].

Bylo prokázáno [17], že zvýšením přísunu dusíkatých živin dojde ke zvýšení obsahu bílkovin a zároveň ke snížení obsahu volných mastných kyselin v obilce. Byly pozorovány menší změny v poměrech zastoupení jednotlivých mastných kyselin, kdy mírně poklesl podíl kyseliny olejové, a naopak se zvýšil podíl kyseliny palmitové.

2.4 Slad

Kvalita sladu je závislá na odrůdě použitého ječmene, technologii sladování a podmínkách skladování. Závisí na ní fyzikálně-chemické, biochemické i organoleptické vlastnosti piva.

Slad požadovaných vlastností se získává vhodným výběrem odrůdy ječmene v kombinaci s technologií máčení a klíčení. Míru tvorby barevných a aromatických látek lze regulovat ve fázi hvozdní. Z hlediska technologického a kvalitativního je důležité používat slad připravený maximálně ze dvou odrůd geneticky sobě podobných [12; 15].

2.4.1 Lipidy a mastné kyseliny ve sladu

Obsah lipidů ve sladu se příliš neliší od obsahu lipidů v ječmeni a může být až 4,5 % v sušině. Mezi lipidické látky obsažené ve sladu patří mastné kyseliny, acylglyceroly, fosfolipidy, lipoproteiny, lipopolysacharidy a steroly.

Největší význam pro kvalitu piva mají mastné kyseliny. Nejvíce je zastoupena kyselina linolová, která tvoří 50 až 60 % z celkového obsahu mastných kyselin. Je následovaná kyselinou palmitovou a olejovou. V menším množství se vyskytuje kyselina linolenová a stearová [15; 18; 19].

Při sladování probíhají první změny ječných lipidů, které dále pokračují ve výrobě piva. Během technologického procesu sladování se uplatňují reakce jako autooxidace, fotooxidace a enzymatické oxidace [15; 20]. Obecně celkový obsah lipidů a mastných kyselin během procesu sladování klesá o 5 až 24 % [16]. Úbytek je způsoben především odbouráním lipidů během klíčení. Produkty odbourávání jsou částečně oxidovány a prodýchány, částečně slouží jako stavební látky pro klíček. Následným odstraněním klíčku, který je na lipidy bohatý, dochází k úbytku celkového obsahu lipidů ve sladu [15; 16; 18]. Při dýchání se spotřebuje asi 0,3 % celkového obsahu lipidů a dochází k přeměně na teplo, vodu a oxid uhličitý. Nejméně se jejich obsah mění v aleuronové vrstvě, která se procesu klíčení tolik neúčastní [15].

V poklesu obsahu lipidů při sladování nebyla pozorována závislost na odrůdě nebo zeměpisném původu ječmene [16].

2.5 Enzymatická oxidace lipidů

Enzymatické změny lipidů jsou způsobeny dvěma enzymovými systémy, které tvoří lipasy a lipoxygenasy, přesněji dioxygenasy (EC 1.13.11.12). Pomocí lipolytických enzymů jsou lipidy štěpeny a vzrůstá obsah glycerolu a volných mastných kyselin. Nenasycené mastné kyseliny jsou dále v přítomnosti kyslíku nebo jen katalytickým účinkem lipoxygenas oxidovány za vzniku prekurzorů karbonylových sloučenin [15]. Při oxidačních reakcích v přítomnosti kyslíku se uplatňuje radikálový mechanismus a primárními produkty jsou hydroperoxydy mastných kyselin. Vzniklé hydroperoxydy jsou vysoce reaktivní a dochází buď k jejich rozkladu, nebo oxidaci na sekundární produkty, které mohou nepříznivě ovlivnit nutriční hodnotu, aroma, chuť a kvalitu potraviny. Jedná se především o směs sensoricky aktivních karbonylových sloučenin, kyselin a vyšších alkoholů [15; 21; 22; 23].

Rychlosti oxidací se různí v závislosti na počtu dvojných vazeb v kyselinách. Linolenová kyselina se oxiduje asi 3–4krát rychleji než kyselina linolová a ta se oxiduje zhruba 30krát rychleji než kyselina olejová [21]. Pomalejší oxidace probíhá také u acylglycerolů a esterů zmíněných mastných kyselin [15; 23].

Nejvýznamnějším zástupcem sensoricky aktivních produktů je (2E)-non-2-enal, jehož zvýšená hladina způsobená oxidací linolové kyseliny je odpovědná za starou chuť piva, která se projevuje jako chuť a vůně po kartonu a lepence [15; 22]. Enzymatická oxidace lipidů může probíhat již při skladování, dále se uplatňuje při klíčení ječmene, dalších úkonech sladování a rmutování [15].

Lipasy způsobují štěpení tuků. Aktivní jsou již při teplotách kolem 35 °C. Značnou činnost vykazují při 55 až 65 °C a jejich optimální hodnota pH je 6,8 až 7,0. Jejich enzymatickou aktivitou vznikají produkty jako parciální estery acylglycerolů, popřípadě až glycerol, volné mastné kyseliny s dlouhými řetězci a jejich hydroperoxydy [15]. Sensorickým projevem jejich působení je převážně mýdlová chuť [24].

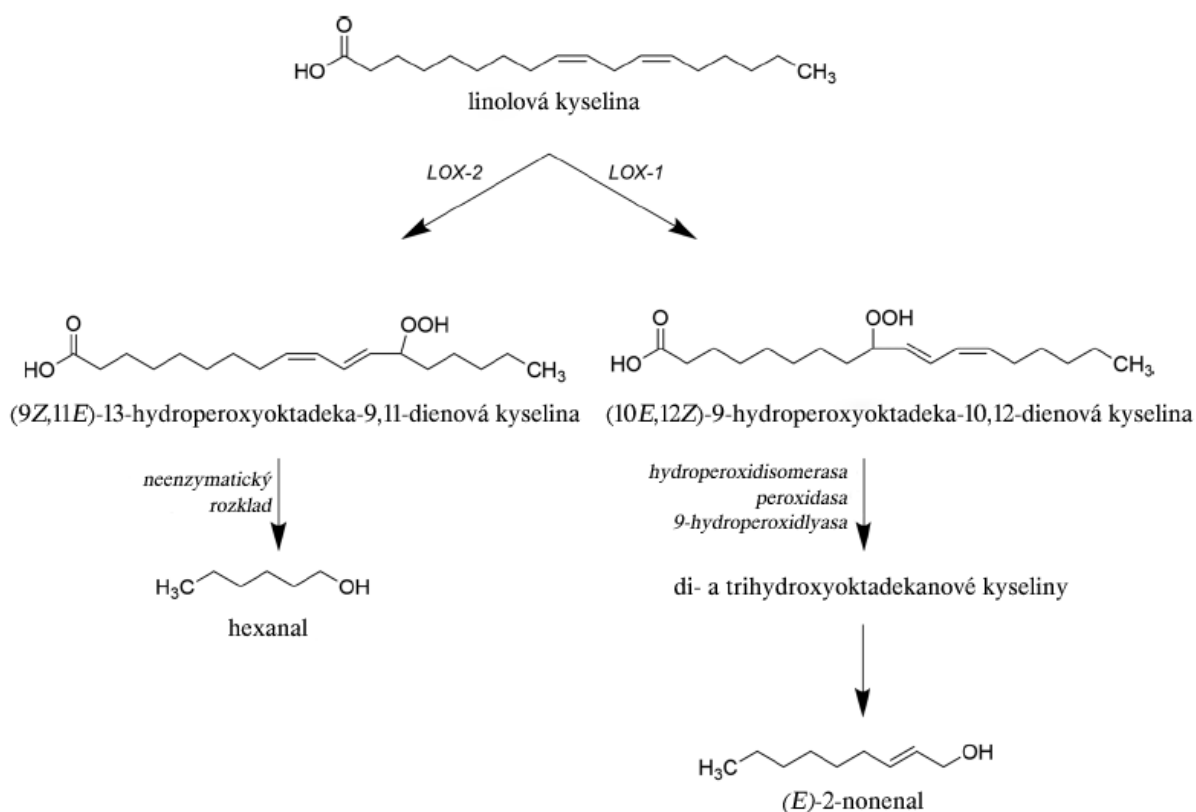
Lipoxygenasy (LOX) způsobují oxidaci volných mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které obsahují (Z,Z)-1,4-penta-1,4-dienovou skupinu. Poškozují už skladovaný ječmen a ovlivňují jeho chuťovou stabilitu, která se snižuje s délkou skladování. Velmi obtížně se

inaktivují a zůstávají aktivní i při nízkých teplotách, což je příčinou nežádoucích změn chuti a aroma [15; 24]. Sensorickým projevem jejich působení je škrablavá, hořká a žluklá chuť [24].

Pro jejich činnost je optimální teplota 45 až 55 °C a pH v rozmezí 6,5 až 7,0. Oxidace probíhá dvěma isomery enzymu LOX-1 a LOX-2. Poměr těchto enzymů (LOX-1):(LOX-2) a jejich aktivita je dána odrůdou ječmene [10; 25]. LOX-1 je přítomna již v ječmeni, na rozdíl od LOX-2, která se objevuje až v průběhu sladování během procesu klíčení. Z uvedeného vyplývá, že celková aktivita lipoxygenas se zvyšuje při klíčení a je úměrná počtu klíčících dnů [24].

Substrátem pro lipoxygenasy jsou esenciální mastné kyseliny linolová, linolenová a arachidonová, jejichž dvojná vazba je oxidována molekulovým kyslíkem. Oxidaci podléhají také acylglyceroly a estery zmíněných mastných kyselin.

Produktem jejich aktivity jsou konjugované *Z,E*-hydroperoxydienové mastné kyseliny, které jsou vysoce reaktivní. Z linolové kyseliny pomocí aktivity LOX-1 vzniká (10*E*,12*Z*)-9-hydroperoxyoktadeka-10,12-dienová kyselina. Méně specifická LOX-2 oxiduje linolovou kyselinu na (9*Z*,11*E*)-13-hydroperoxyoktadeka-9,11-dienovou kyselinu, která je prekursorem (2*E*)-non-2-enalu. Pomocí dalších enzymů, jako jsou hydroperoxidisomerasy a hydroperoxidlyasy dochází k následné isomeraci a štěpení vzniklých hydroperoxidů na karbonylové sloučeniny (aldehydy a ketony) nebo mastné kyseliny s kratšími uhlíkatými řetězci. Tím dochází k vytvoření sloučenin charakteristické vůně a chuti [15; 23; 24].



Obrázek 1 Navrhované mechanismy produkce hexanalů a (*E*)-2-nonenalu prostřednictvím lipoxygenasy (LOX-1 a LOX-2) podle Guido et al. [26]

Kvůli senzorické stabilitě piva by měl mít ječmen a slad nízkou enzymovou aktivitu lipoxygenas, aby se předešlo tvorbě nežádoucích karbonylových sloučenin [15; 24]. Možnými způsoby ovlivnění aktivity lipoxygenas je volba odrůdy ječmene, změna podmínek v jednotlivých fázích technologie sladování nebo kombinace obou zmíněných parametrů. Výsledkem je zmírnění poškození senzorických vlastností sladu a z něj vyrobeného piva a zvýšení kvality [24].

2.6 Rozdílné zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene a ve sladu

Zásadní změny způsobené sladováním jsou pozorovány v obsahu palmitové, α -linolenové a olejové kyseliny, která vykazuje výrazný pokles [16; 18; 27; 28], zatímco obsah kyseliny linolové se příliš neliší [11]. Studie Bravi et al. [18] zahrnovala výrobu sladu ze 4 jarních a 1 ozimé odrůdy ječmene. U jarních odrůd byl ve sladu zaznamenán pokles obsahu kyseliny olejové a mírné zvýšení obsahu kyseliny linolové. U ozimé odrůdy nebyl tento trend zaznamenán a obsah kyseliny linolové zůstal nezměněn. Z poznatků o mechanismu oxidace polynenasycených mastných kyselin lipoxygenasou za tvorby prekurzorů zatuchlé chuti lze vyvodit, že použitím sladových odrůd, které se vyznačují nižším obsahem polynenasycených mastných kyselin jako tato ozimá odrůda, lze docílit zlepšení trvanlivosti a senzorické kvality piva [18].

2.7 Změny lipidů a mastných kyselin během technologického procesu výroby a jejich vliv na kvalitu sladu a piva

Význam lipidů je při výrobě piva přehlížen, protože kvalitní sladovnický ječmen je často vybírán na základě diastatické mohutnosti, obsahu bílkovin a škrobu nebo velikosti zrna. Tyto kvalitativní znaky s lipidy a jejich účinky během výroby piva nesouvisí. Proto se jejich vliv v případě nevyhovující kvality hotového produktu často ignoruje [12].

2.7.1 Změny lipidů při sladování

Slad obsahuje přírodní antioxidační činidla, která pochází z ječmene (polyfenoly a aromatické hydroxykyseliny), nebo byla vytvořena v procesu sladování (produkty Maillardovy reakce). Lze optimalizovat proces sladování tak, aby se zachovala nebo podpořila syntéza těchto látek, jelikož inhibují chemické a enzymatické oxidační procesy, které mohou posléze ovlivňovat organoleptické vlastnosti piva [10; 24].

Během máčení a klíčení vzrůstá aktivita lipoxygenas. Pokles na původní obsah nastává na konci sladování, v závislosti na průběhu procesu hvozdění a jeho podmínkách. Dalšími faktory, které aktivitu ovlivňují, jsou stupeň domočení, teplota při klíčení a doba klíčení [24; 25].

2.7.1.1 Máčení

Máčení představuje první krok sladovacího procesu a je zásadní pro klíčení, které po něm následuje. Byla hodnocena souvislost mezi lipidickým profilem zrna ječmene a jeho schopností přijímat vodu. Bylo prokázáno [29], že olejová kyselina má pozitivní vliv na příjem vody zrnem, na rozdíl od nasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem jako je arachidová nebo lignocerová kyselina.

2.7.1.2 Klíčení

Během procesu máčení a klíčení stoupá aktivita lipas o 50 až 80 %. Bohatá na lipidy a tudíž i na aktivitu lipas je rostoucí stělna, která svým složením negativně působí na trvanlivost pěny piva nebo jeho senzorycké vlastnosti. Lipasy působí v největší míře v zárodku, méně poté v aleuronové vrstvě [10]. Vzdůstá také aktivita lipoxygenas, kterou významně ovlivňují teploty klíčení a jeho délka [24; 25].

V důsledku působení lipas dochází k uvolňování mastných kyselin, které jsou postupně odbourávány [10; 15; 16; 18; 24]. Nenasycené mastné kyseliny, které se během procesu klíčení uvolní, mohou být na počátku rmutování v přítomnosti kyslíku oxidovány buď lipoxygenasami, nebo neenzymaticky (působením vyšších teplot, světla, těžkých kovů a peroxidů) za vzniku nežádoucích produktů [10; 24].

2.7.1.3 Hvozdění

V posledním kroku sladování se celkový obsah lipidů výrazně nemění. Během sušení dochází ke snižování vlhkosti a zastavení vegetativních a enzymatických pochodů. Důsledkem je již dále neměnný obsah lipidů ve sladu. Navíc dochází k tvorbě antioxidačních látek např. melanoidinů, které chrání lipidy před případnou oxidací [18; 24].

Hvozdění představuje důležitý krok sladování, protože aktivita lipoxygenas se v závislosti na jeho podmínkách významně snižuje, přičemž aktivita LOX-1 je v hotovém sladu vyšší než aktivita LOX-2 [15; 25]. Snižené aktivity lipoxygenas lze dosáhnout i následným odležením sladu, jelikož jejich aktivita klesá v závislosti na čase [24].

2.7.2 Změny lipidů při přípravě sladiny

Ve varné části technologického procesu dochází převážně k enzymatickým změnám lipidů. Hlavním enzymatickým systémem, který se zde uplatňuje jsou lipoxygenasy. Působí při vystírání a rmutování a jejich úplná inaktivace nastává až při vaření mladiny – chmelovaru [15].

2.7.2.1 Vystírání a rmutování

Během vystírání a rmutování se enzymovými a neenzymovými reakcemi změni asi 20 až 25 % ve rmutu přítomných lipidů [15]. Větší množství zůstane zachyceno v mlátě, ale část se extrahuje do mladiny. Lipidy se tak mohou dostat až do piva a tam působit v případě nepolárních lipidů jako protipěnový prostředek, v případě polárních jako stabilizátor pěny. Mohou působit také jako prekurzory senzoryckých aktivních látek či jako substráty pro kvasinky [10; 12; 18; 19]. Z hlediska senzorycké stability piva jsou velmi důležité vznikající hydroperoxydy mastných kyselin, které díky své hydrofilní povaze přechází až do finálního výrobku [20; 25].

Ve sladu jsou díky lipoxygenasové aktivitě již přítomny stopové množství hydroperoxydů mastných kyselin. Jejich významnější tvorba začíná při vystírání šrotu [20]. Aktivita lipoxygenas je stanovena v rozsahu teplot 45–55 °C, nad touto teplotou aktivita rychle klesá a při 65 °C dochází k jejich inaktivaci [15; 25]. V důsledku zvyšování teploty vystírky na teplotu optimální pro činnost těchto enzymů dochází k postupnému nárůstu koncentrace hydroperoxydů. Jejich pokles je zaznamenán při odrmutovacích teplotách, kdy lipoxygenasy již nejsou aktivní [20].

Hydroperoxydy mohou podléhat transformaci hydroperoxidisomerasou, kdy vznikají příslušné α - a γ -ketoly, které jsou dále přeměněny na mono-, di- a trihydroxy a hydroepoxy kyseliny. Monohydroxy, dihydroxy a trihydroxy mastné kyseliny mají díky přítomnosti hydroxylových skupin hydrofilní charakter a v procesu scezování mohou přecházet do piva, kde dochází vlivem autooxidačních reakcí k tvorbě sensoricky aktivních karbonylů [20]. Monohydroxy- a dihydroxymastné kyseliny mohou dále podléhat také změnám během kvašení mladiny. Trihydroxymastné kyseliny nepodléhají metabolismu kvasinek a z tohoto hlediska neovlivňují sensorickou stabilitu piva. Při působení hydroperoxidlyas na hydroperoxydy dochází ke štěpení na aldehydy, ketony, alkoholy, kyseliny s kratším uhlíkatým řetězcem a další sensoricky aktivní produkty. Mastné kyseliny, které při tomto procesu vzniknou, mohou být dále odbourány β -oxidací v buňkách kvasinek [15].

U dobře rozluštěných nebo přelustěných sladů není vhodné při rmutování prodlužovat dobu působení teplot pod 50 °C z důvodu teploty optimální pro činnost lipoxygenas. Množství vytvořených karbonylových sloučenin a oxidačních produktů nenasycených mastných kyselin narůstá se zvýšenou intenzitou varu [15].

2.7.2.1.1 Rozdílné zastoupení lipidů při infuzním/dekokčním způsobu rmutování

Sladina získaná infuzním způsobem rmutování obsahuje méně lipidů než sladina získaná dekokčním rmutováním. Je to dáno technologií, kdy při infuzním způsobu není nikdy dosaženo teploty varu. Oproti tomu při dekokčním rmutování je část vystírky odčerpána a postupně zahřívána až k bodu varu. Následně je vracena do vystírací kádě, čímž dojde ke zvýšení teploty celé vystírky. Při vaření dochází k destrukci buněčných stěn zrn, což umožňuje snadnější přístup hydrolytických enzymů k jejich substrátům (včetně lipáz). Obecně je účinnost dekokčního rmutování, co se týče výtěžnosti, daleko vyšší než u infuzního způsobu, a proto se v praxi používá, i na úkor zvýšeného obsahu lipidů ve sladince [19].

2.7.2.2 Scezování sladiny a vyslazování mláta

Oddělením sladiny od mláta přirozenou filtrací přes vrstvu pluch vzniká předek. Následným vyslazováním mláta horkou vodou poté výstřelek. Pro sensorickou a koloidní stabilitu piva je důležité přiměřené vyslazování sladového mláta pouze po nezbytně nutnou dobu, a to tak dlouho, dokud se luhuje kvalitní extrakt [15].

Tuky, nenasycené mastné kyseliny a jejich hydroperoxydy jsou hydrofobního charakteru a nejsou rozpustné ve vystírce, většina z nich je proto zachycena v mlátě. Hydroxymastné kyseliny ale díky hydrofilnímu charakteru mohou v procesu scezování přecházet do piva [20]. Je nežádoucí vyslazovat mláto dlouho, jelikož přechází velké množství polyfenolů, hořkých látek a těchto lipidických látek sladu do výstřelků. Obsah zmíněných sloučenin má posléze negativní vliv na fyzikálně-chemické a sensorické vlastnosti piva [15]. Předek obsahuje oproti výstřelkům zanedbatelné množství těchto sloučenin [15; 20].

I když většina látek vzniklých činností enzymů zůstává při správném scezování zadržena v mlátě a kalech, je vhodné jejich tvorbu potlačit [15]. Rozdělení lipidů a produktů jejich oxidace mezi sladinu a mláto lze korigovat výběrem surovin z hlediska obsahu a složení lipidů [14; 15].

2.7.2.2.1 Aktivita enzymů při sladování

Změnou pH nebo přidáním enzymových inhibitorů do vystírky lze docílit snížení aktivity lipoxygenas a tím dokázat, že při rmutování převažuje enzymová oxidace nenasycených mastných kyselin nad jejich autooxidací [15].

Ke snížení rizika výskytu nejen (2*E*)-non-2-enalu se doporučuje sledovat dokonalost odstranění sladových klíčků, vzestup obsahu kyslíku, který by podporoval oxidaci, hodnotu pH vystírky a vystírací teploty [14], jelikož volbou teploty vystírání a rmutování lze ovlivnit koncentraci hydroxymastných kyselin a jejich následných produktů [15].

Nejvíce se na vzniku staré chuti piva podílí velikost provzdušnění v průběhu varního procesu, což znamená, že nižší aktivity enzymů lze kromě snížení pH vystírky a sledování teploty docílit i šrotováním a rmutováním v atmosféře oxidu uhličitého [15]. Mletí sladu, rmutování a scezování bez přístupu kyslíku je technologicky náročné, proto inertní atmosféru obstojně nahradí napouštění vystírky, rmutů a mladiny spodem kádě, bez zbytečného rozstříkávání tekutiny o stěny nádob, čímž se zamezí provzdušnění díla [15; 22]. Vhodné je také suché mletí sladu, úchova surovin v atmosféře oxidu uhličitého a vystírání s odplyněnou vodou [15].

2.7.3 Změny lipidů při přípravě mladiny

Obsah lipidů v mladině je nižší než ve sladince. Chmelovarem a čířením ve vířivé kádi dochází k jejich eliminaci v důsledku usazení s kalem na dně kádě [15; 19].

2.7.3.1 Chmelovar

Povařením sladiny s chmelem vzniká mladina, ve které jsou přítomny nasycené i nenasycené mastné kyseliny v různých koncentracích. Největší obsah vykazují kyseliny linolová a linolenová. Hydroperoxydy, které vznikají, dále degradují za tvorby karbonylových sloučenin. Obecně ale obsah mastných kyselin i obsah produktů jejich oxidace během chmelovaru klesá. Přesto se část dostává do piva, kde negativně ovlivňuje jeho organoleptické vlastnosti [15; 19].

2.7.3.2 Chlazení mladiny a vylučování kalů ve vířivé kádi

Při chlazení a vylučování kalů dochází zároveň k poklesu obsahu mastných kyselin v mladině. Míra poklesu závisí na stupni vyčiření. Při správné funkci vířivé kádě dochází ke snížení původního množství mastných kyselin s 12–18 uhlíky v řetězci až o 90 % [15].

2.7.4 Změny lipidů při kvašení mladiny a dokvašování piva

Lipidy sladu extrahované během vystírání a rmutování mají narušit od lipidů chmele významný vliv na růst a metabolismus pivovarských kvasinek. Nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a steroly (zejména ergosterol) jsou nedílnými strukturálními složkami membrán kvasinkových buněk a mají zásadní význam pro udržení jejich tekutosti [15; 19]. Proto jsou tyto nenasycené mastné kyseliny nezbytné pro aktivaci růstu kvasinek a významně tím napomáhají k intenzivnějšímu a rychlejšímu kvašení [12; 18; 19].

Přídavek kvasinek do mladiny způsobí modifikaci profilu mastných kyselin, jelikož v kvasinkách probíhají série reakcí, které vedou k syntéze mastných kyselin s dlouhým

řetězcem. Tyto mastné kyseliny hrají roli v integritě membrán a toleranci k ethanolu, jakožto metabolitu, který je kvasinkami produkován [19]. Zároveň později během dokvašení dochází k produkci mastných kyselin s nižším počtem atomů uhlíku v řetězci, které přispívají k organoleptickým vlastnostem piva [15; 18; 19; 30].

2.7.4.1 Úpravy před kvašením

Zákaly mladiny podporují metabolismus kvasinek, ale z hlediska sensorické stability piva jsou nežádoucí, protože obsahují vyšší koncentrace mastných kyselin jakožto prekurzorů komponent staré chuti piva. Je proto nutné před kvašením dokonale odstranit hrubé kaly a co nejvíce minimalizovat výskyt kalů jemných [15].

2.7.4.2 Provzdušnění mladiny – vliv kyslíku na metabolismus pivovarských kvasinek

Kyslík v metabolismu kvasinek působí stimulačně a je kvasinkami využíván pro syntézu sterolů a nenasycených mastných kyselin, které zajišťují správnou funkci buněčných membrán.

Za přítomnosti kyslíku se z nasycených mastných kyselin syntetizují v kvasinkách nenasycené mastné kyseliny olejová, stearová a linolová. K syntéze nemusí docházet, pokud jsou tyto kyseliny kvasinkami využívány přímo z mladiny. Dodávání kyslíku probíhá volným mechanickým provzdušňováním mladiny, které by nemělo trvat déle než po dobu nezbytně nutnou k ochlazení na zákvasnou teplotu a v míře potřebné pro pomnožení kvasinek. Udává se obsah kyslíku 5–7 mg/l. Nadměrné provzdušnění indikuje zvýšenou tvorbu aldehydů a dalších sensoricky nežádoucích látek. Provádí se jen v ochlazené mladině při zakvašení. Pozdější provzdušňování již zakvašené mladiny snižuje antioxidační vlastnosti mladiny a piva a způsobuje vyšší tvorbu prekurzorů staré chuti piva [15].

2.7.4.3 Zakvašení

V zakvašené mladině obsah lipidů vzrůstá. Je to dáno příspěvkem lipidických složek buněk kvasinek a lipidy syntetizovanými v rámci jejich metabolismu. Kvasinky také mohou za kultivačních podmínek v přítomnosti kyslíku produkovat extracelulární lipidy [19].

2.7.4.4 Hlavní kvašení

Během hlavního kvašení mladiny dochází k tvorbě sensoricky aktivních látek, které spoluvytvářejí buket piva. K těmto látkám se řadí estery, které se vyznačují ovocnou vůní a v určitých koncentracích mají pozitivní vliv na sensorickou charakteristiku piva [15; 22]. Jejich tvorba je spojována s metabolismem lipidů pivovarských kvasinek. Při zkvašování kalných mladin, které obsahují vyšší koncentrace nenasycených mastných kyselin, dochází k jejich mohutnější produkci. Asi třetinu vzniklých esterů tvoří ethylacetát.

Dochází také k tvorbě volných mastných kyselin, které vznikají hlavně během prvních čtyř dnů kvašení. Jejich zvýšené množství vyvolává kalnost mladiny [15] a vyšší obsah kyseliny hexanové, oktanové a dekanové způsobuje kvasničnou příchut' a zhoršení pěnivosti piva [15; 22]. Za určitých podmínek mohou být kvasinkami produkovány také lipidy. Mají obvykle nižší molekulární hmotnost a obsahují velký podíl mastných kyselin s 6 a 8 atomy uhlíku v molekule [30].

Změnám podléhají také mono- a dihydroxymastné kyseliny vzniklé enzymatickou oxidací v průběhu vystírání a rmutování. Stejným způsobem vzniklé trihydroxymastné kyseliny nejsou kvasinkami metabolizovány, a tudíž neovlivňují senzorickou stabilitu piva.

Obsah membránových sterolů a lipidů v kvasinkách během kvašení klesá. Pokud se kvasinky používají k opakovanému nasazení, je potřeba tento kvalitativní faktor brát v potaz [15].

2.7.4.5 Dokvašení a zrání piva

Dokvašováním a zráním piva dochází ke skoro finalizaci výsledného produktu – piva. Během tohoto procesu jsou kvasinkami exkretovány volné mastné kyseliny obsahující 4–10 atomů uhlíku v řetězci. Uvolňování mastných kyselin je mohutnější při vyšších teplotách. Negativní vliv na organoleptické vlastnosti piva může mít hexanová kyselina, která je akumulována a exkretována kvasinkami při vyšších teplotách zrání piva [15]. Obecně se během dokvašení a zrání piva obsah lipidů nemění [19].

Dokvašování vede k lepšímu fyzikálně-chemickému stavu piva, který zahrnuje jeho koloidní a senzorickou stabilitu, zaručenou probíhajícím samočištěním, zvyšováním redoxní kapacity a sycením CO₂. Pro správný průběh těchto reakcí je nutné zajistit nízké teploty a důsledné omezení provzdušnění. Tyto podmínky je nezbytné dodržet až do okamžiku stáčení piva do transportních obalů [15; 19].

2.7.5 Změny lipidů při finálních úpravách piva – filtrace, pasterace, stáčení...

Separaci kvasinek a kalů dochází k poklesu obsahu lipidů. Míra úbytku je dána velikostí pórů filtru. Čím menší póry, tím efektivnější zachycení lipidických látek. Filtrace tedy může ovlivnit konečný obsah lipidů ve finálním výrobku. Ve filtrovaném pivu je nejhojněji zastoupena kyselina olejová [19].

V závěrečných úpravách piva a jeho stáčení je rizikem pro narušení stability organoleptických vlastností styk se vzdušným kyslíkem, který způsobí oxidační reakce v již hotovém výrobku [15; 20; 22]. S rostoucí teplotou dochází k výraznému zhoršení chuti a vůně piva. U piva s vyšším obsahem rozpuštěného kyslíku je tento jev ještě více umocněn, a proto je nutné při stáčení zamezit styku se vzdušným kyslíkem, aby bylo zaručeno neporušení piva při následné pasteraci [15].

2.7.6 Změny lipidů a jejich vliv na stárnutí piva

Jako stárnutí se označuje samovolná nevratná oxidace spojená s degradací významných složek piva. Projevuje se zhoršením chuti a vůně skladovaného piva a je výsledkem různých typů reakcí, které se mohou vzájemně kombinovat [15].

Nejvíce se na stárnutí piva při jeho úchově podílejí neenzymové reakce, které mohou souběžně s enzymatickými oxidačními reakcemi probíhat ve všech fázích pivovarské výroby. Díky inaktivaci enzymů varním procesem, respektive při pasteraci hotového výrobku, jsou tyto neenzymatické, nejčastěji autooxidační reakce jediným zdrojem tvorby dalších těkavých karbonylových sloučenin. Neenzymatickým reakcím při procesu stárnutí nejčastěji podléhají sloučeniny, které vznikly enzymatickou oxidací v předchozích fázích výroby a přešly do hotového piva. Příkladem jsou autooxidační reakce transformovaných nebo štěpných produktů hydroperoxidů mastných kyselin, které přešly při vyslazování do sladiny [15; 20].

Obecně se uvádí tyto typy neenzymatických oxidací [1]:

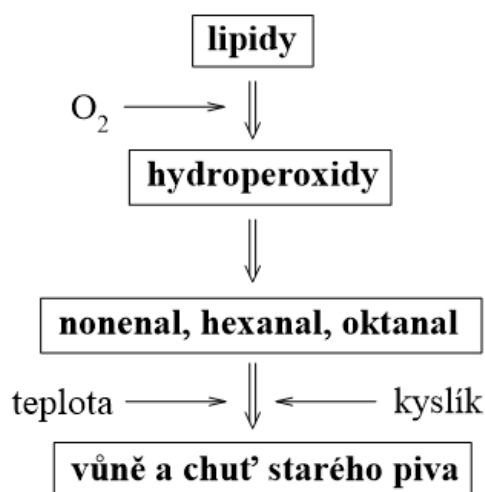
- autooxidace vzdušným kyslíkem (tripletovým)
- oxidace hydroperoxydy nebo peroxidem vodíku
- fotooxidace (singletovým) kyslíkem
- oxidace těžkými kovy
- oxidace chinony a příbuznými sloučeninami

K neenzymatickým změnám může docházet již krátce po pasteračním zákroku. S obsahem rozpuštěného kyslíku jejich intenzita narůstá, protože celé spektrum cizích vůní a chutí má původ nejčastěji v oxidaci některých složek piva [15; 20; 22]. Prekurzorem jsou nejčastěji karbonylové látky, které jsme schopni identifikovat už během varního procesu. Většina z nich při varu mladiny vytěká, ale některé přechází i do studené mladiny [15; 22]. Jedná se hlavně o aldehydy a ketony odvozené od mastných kyselin, které obsahují 5–12 atomů uhlíku v řetězci.

Oxidační chutě a vůně se vyvíjejí pomalu, od několika dnů až po týdny po stočení. Příčinou pomalosti jevu je, že koncentrace vznikajících látek nestoupá nepřetržitě, ale jedná se o dynamický proces oxidačních reakcí, kdy obsah některých látek stoupá, až dosáhne svého maxima a poté se látky začnou odbourávat na jiné. Vzniklé produkty mohou být neškodné, ale také mohou být ještě více sensoricky nepříjemné [22].

Vůně typická pro stárnutí za přítomnosti kyslíku je lepenková. Při stárnutí za anaerobních podmínek vzniká především sladká vůně s chutí po ovoci [15]. V celkovém procesu stárnutí piva se nejdříve začíná vyvíjet oxidační chuť a vůně po kartonu nebo lepence, tyto poté postupně přecházejí na chuť sladkou až karamelovou [22].

Stárnutím vznikají převážně sensoricky aktivní karbonylové sloučeniny, alkanaly, alkenaly a alkadienaly. Typickými produkty jsou acetaldehyd, 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, fenylacetaldehyd, benzaldehyd, (2*E*,4*Z*)-deka-2,4-dienal, (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienal, (2*E*)-non-2-enal a jiné [15]. Zejména (2*E*)-non-2-enal je považován za hlavního představitele sensoricky aktivních látek. Jeho koncentrace stoupá v pivu během prvních dvou až tří měsíců, poté dosáhne svého maxima a začne se odbourávat, čímž se stará vůně dále vyvíjí a zintenzivňuje [22].



Obrázek 2: Hlavní mechanismy tvorby staré vůně a chuti [15]

2.7.6.1 Vliv kyslíku

Intenzita sensorických změn s obsahem rozpuštěného kyslíku vzrůstá. Přístupu kyslíku do piva se velmi obtížně zabraňuje, jelikož četnost styku kyslíku s pivem je v technologii velká. K rizikovým operacím patří přečerpávání mezi jednotlivými úseky výroby, filtrace, stabilizace a stáčení do transportních obalů. Ke kontaktu s kyslíkem může docházet i nepatrnými netěsnostmi v nádobách, potrubích atd. Omezení styku piva se vzduchem řeší napouštění tekutin spodem nebo předplňováním tanků inertním plynem [15; 20; 22]. Rychlost stárnutí piva může ovlivňovat také nevhodná výplň korunkových uzávěrů, přes kterou může do piva difundovat vzduch z okolí [22].

2.7.6.1.1 Fotooxidace (singletovým) kyslíkem

Zdrojem těkavých látek v pivu mohou být také fotooxidační reakce v přítomnosti vzdušného kyslíku za účasti fotosenzibilizátorů, např. riboflavinu produkovaného kvasinkami. Proto je pivo ve svých finálních úpravách náchylné ke styku se vzdušným kyslíkem.

Záření generuje singletový kyslík a volné radikály, které působí na mastné kyseliny a dochází k jejich přeměně na sensoricky nežádoucí látky. Tvorba těchto látek závisí na intenzitě světla a barvě láhve.

2.7.6.1.2 Radikálová oxidace

Může docházet také k radikálové oxidaci reaktivními formami kyslíku, ale lze předpokládat výskyt mnoha dalších radikálů s různou životností a reaktivitou. Mezi reaktivní formy kyslíku řadíme například peroxid vodíku a singletový kyslík [15].

2.7.6.2 Ovlivnění sensorické stability piva

Znaky provázející stárnutí piva jsou kromě sensorických změn i změny barvy a tvorba zákalů. Zpomalení tohoto procesu je možné dosáhnout přidávkem látek s redukčním účinkem, tzv. antioxidantů, které i v nízké koncentraci zpomalují nebo úplně zabraňují oxidaci. Mezi přirozené antioxidanty piva jsou řazeny především polyfenolové sloučeniny, reduktony a melanoidní látky [15]. Až 80 % polyfenolových sloučenin v hotovém pivu pochází ze sladu,

kde se vyskytují především v obalových částech zrn a v aleuronové vrstvě [10]. Antioxidační účinky se projevují inhibicí oxidačních přeměn lipidických složek, čímž přispívají k blokování procesů stárnutí piva [10; 24].

Organoleptickým změnám stočeného piva není možné zabránit jednoduchým technologickým zásahem. Složitost procesů, které vedou ke stárnutí piva, se totiž odvíjí již od výchozích surovin. Na sensorické změny má významný vliv také průběh výrobního procesu. Proto je nutná znalost reakcí, které mohou přispívat k vývoji nežádoucích sloučenin a vhodnou úpravou technologie výroby tyto sloučeniny eliminovat nebo alespoň minimalizovat jejich tvorbu a výskyt [15].

Pro oddálení stárnutí piva je nutné vybírat slady a chmele požadovaných vlastností. Vhodné jsou slady pocházející z odrůd ječmene s předpokladem nižší aktivity lipoxygenas. Omezení lipoxygenasové aktivity sladu lze dosáhnout máčením za použití vyššího hydrostatického tlaku a delších přestávek pod vodou nebo vhodným poměrem $\text{CO}_2 : \text{O}_2$ při provzdušňování klíčícího ječmene. Nejúčinnějšího omezení aktivity lipoxygenas lze dosáhnout vyššími teplotami při dotahování sladu v procesu hvozdnění. Při těchto teplotách je ale nutné brát v potaz degradaci lipidů a také tvorbu aldehydů pocházejících z Maillardovy reakce nebo vznikajících Streckerovou degradací aminokyselin. Proto je důležité aplikovat výdrž při vyšších teplotách jen po nezbytně nutnou dobu, aby se dostatečně omezila lipoxygenasová aktivita a zároveň aby nedocházelo ke zvýšené tvorbě aldehydů. Důležitým faktorem je také dokonalé odstranění plev a kořínků a minimálně dvoutýdenní odležení sladu před jeho použitím k výrobě piva. Při takto dlouhém odležení klesá aktivita LOX až o 30 % [15; 18; 24].

Kvůli účinku teploty v kombinaci s obsahem rozpuštěného kyslíku je velmi spolehlivým způsobem pro oddálení stárnutí piva jeho skladování při nízkých teplotách [15].

2.7.7 Vliv lipidů a mastných kyselin na pěnivost piva

Vzhled piva, který je z velké části určen pěnou, je jednou z nejdůležitějších kvalitativních charakteristik piva pro spotřebitele [15; 19; 30]. Za stabilizátory pěny piva jsou považovány proteiny. Stabilita pěny je ale dána účinkem jak stabilizátorů, tak destabilizátorů. Často se objevují odchylky v pění způsobené interakcí proteinů s jinými látkami obsaženými v pivu, např. s α -isohorými kyselinami z chmele, kovy a lipidy. Lipidy jsou v tomto případě považovány za hlavní sloučeniny, které pěnu destabilizují a poškozují.

Cílem je plně využít příznivých účinků mastných kyselin během vaření piva (výživa kvasinek) a zároveň kontrolovat a minimalizovat jejich nepříznivé účinky na pěnu hotového výrobku [30].

2.7.7.1 Tvorba pívni pěny a ovlivnění pěnivosti

Při tvorbě pěny dochází k interakcím amfipatických proteinů s bublinami. Vzniká rigidní vazba mezi hydrofobním povrchem bublin a vodným roztokem piva. Volné mastné kyseliny mohou s touto hydrofobní vazbou interferovat adsorpcí na bílkovinnou vrstvu. Takto navázané mastné kyseliny narušují interakce mezi bílkovinami, případně je úplně vytlačují z povrchových filmů bublin, což snižuje pevnost a pružnost bílkovinné vrstvy. Výsledkem je nestabilita pěny, menší odolnost vůči mechanickému narušení a její následný rychlý rozpad [30; 31].

Vzhledem ke své struktuře nepolární lipidy působí jako protipěnový prostředek, polární jako stabilizátor pěny [10]. Bylo prokázáno [30], že pokud je k výrobě piva použitý slad, který má vyšší obsah proteinů, má pivo z tohoto sladu vyrobené vysokou toleranci proti nepříznivému účinku mastných kyselin na pěnu.

Pěnovost piva negativně ovlivňuje přechod lipidů do mladiny při rmutování [15; 32]. Lipidy destabilizují pивní pěnu v závislosti na délce řetězce mastných kyselin a stupni jejich nasycení. U mastných kyselin s delším řetězcem se efekt narušení pěny zvyšuje. Nejvíce destabilizují pивní pěnu nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem [31]. Mastné kyseliny, které mají méně než 12 atomů uhlíku v řetězci nejsou v pивu přítomny v takových koncentracích, aby mohly konkurovat proteinům a významným způsobem destabilizovat pивní pěnu [15; 31]. Nasycené mastné kyseliny obsahující 12 až 14 atomů uhlíku v řetězci nebo nenasyčené mastné kyseliny olejová a linolová destabilizují tím, že narušují a oslabují adsorbovaný proteinový film, což vede ke zvýšené pravděpodobnosti prasknutí bublin. Nasycené mastné kyseliny s 16 až 18 atomy uhlíku v řetězci jsou méně rozpustné než ostatní mastné kyseliny a v roztoku s větší pravděpodobností vytvářejí agregáty, které pěnu ničí [31].

Značné odpěňovací účinky mají během varního postupu a skladování přeměnami vznikající produkty kyseliny linolové, jako jsou di- a trihydroxyhexadekanové kyseliny [10; 30]. Významný negativní vliv na pěnu je dán jejich strukturou. Díky obsaženým hydroxy skupinám, které mají hydrofilní charakter, jsou tyto hydroxyhexadekanové kyseliny rozpustné, a proto jsou v pивu přítomny ve větším množství než ostatní mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které se daří úspěšně eliminovat scezováním [20; 30]. Jejich vznik lze do jisté míry omezit upravenými podmínkami vystírání a rmutování. Je vhodné začínat při vyšších teplotách, snížit pH vystírky a zamezit přístupu kyslíku do vystírky [15; 33; 34].

2.7.7.2 Přepěňování piva (*gushing*)

Pěna piva má pro spotřebitele velký sensorický význam [15; 30; 31]. Kromě jejího pozitivního vlivu se uplatňuje také její negativní působení v podobě bouřlivého přepěňování po otevření lahve neboli *gushingu*. Podstatou je náhlé, masivní uvolnění bublinek CO₂ způsobené různými vlivy.

Přepěňování piva může vznikat z různých příčin závislých na kvalitě vstupních surovin (přítomnost metabolitů plísní), technologii varního procesu (nerozpustné částice přítomné v pивu), ale může být způsobeno také vlivem iontů železa a těžkých kovů [15]. Uvádí se také souvislost s množstvím a poměrem nenasyčených a nasycených mastných kyselin, který je určující při posouzení rizika přepěňování piva [15; 18; 20].

2.8 Stanovení obsahu lipidů a mastných kyselin

2.8.1 Stanovení obsahu lipidů

Vzhledem k rozdílné polaritě lipidických látek a absenci chromoforů, které by usnadnily spektrometrickou detekci, není analýza lipidů jednoduchá. Jelikož se lipidy ve vzorcích většinou nevyskytují ve volném stavu, je potřeba nejprve provést jejich extrakci [35], které předchází úprava vzorku, spočívající v jeho rozmělnění. Rozrušením vzorku je dosaženo většího povrchu a tím pádem efektivnější extrakce pomocí rozpouštědla. Ke zvýšení množství vyextrahovaných lipidů z matrice, zvláště pokud je potřeba provést kvantitativní analýzu, je před extrakcí vhodné provést kyselou nebo alkalickou hydrolyzu, která slouží k rozrušení vazeb lipidů s proteiny a sacharidy a také k zastavení tvorby tukových emulzí [36; 37; 38].

Analytický postup pro stanovení jednotlivých lipidických sloučenin zahrnuje zpravidla tři základní kroky:

- 1) Extrakci ze vzorku
- 2) Analytickou separaci
- 3) Identifikaci a kvantifikaci

Po úspěšné extrakci lipidů ze zdroje je tedy v případě stanovení specifických lipidických látek potřeba ještě jejich separace a následná analýza.

Problém představuje nestabilita lipidů, obzvláště nenasycených mastných kyselin, které podléhají oxidaci působením vzduchu, kdy kyslík napadá dvojnou vazbu. Kyselina linolová se oxiduje 20krát rychleji než kyselina olejová a každá další dvojná vazba v mastné kyselině zvyšuje rychlost degradace dvakrát až třikrát. Fosfolipidy, které obsahují vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, hlavně linolové a arachidonové kyseliny, jsou proto náchylnější k poškození [35]. Extrakce lipidů ze vzorku by proto měla být provedena co nejdříve, aby se minimalizovaly následné změny. Pokud není okamžitá extrakce možná, je nutné vzorky uchovávat při nízkých teplotách v uzavřených nádobách [39].

2.8.1.1 *Extrakční metody vhodné pro obiloviny*

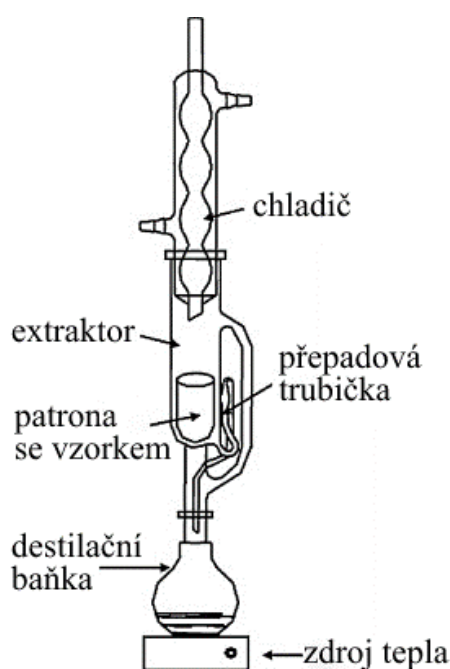
Metody jsou založeny na extrakci lipidů rozpouštědlem, přičemž extrahované složky se stanoví gravimetricky a definují jako obsah surového tuku nebo oleje [36]. Jako tuk jsou označovány netěkavé látky, které se extrahují ze vzorku málo polárním rozpouštědlem [40].

Výtěžnost extrakce závisí na polaritě lipidů a rozpouštědla, proto je potřeba zvolit ideální rozpouštědlo pro daný vzorek [37; 40]. Pro extrakci neutrálních lipidů, jako jsou estery mastných kyselin a acylglyceroly, se využívají nepolární rozpouštědla hexan a petrolether. Pro polární a složené lipidy se používají více polární rozpouštědla jako methanol nebo acetonitril. Často se využívá také kombinace více rozpouštědel, například u metody podle Folche, kde je využívána směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1 [35; 36; 37; 40]. Ideální rozpouštědla by měla být levná, s nízkým bodem varu, netoxická a nehořlavá [37].

2.8.1.1.1 Metoda podle Soxhleta

Základní a hojně využívanou metodou pro extrakci lipidů je metoda dle Soxhleta a její případné modifikace. Je součástí normovaných postupů a často bývá používána jako standard pro nově vyvíjené extrakční techniky, protože stanovení tuku se provádí gravimetricky, a tudíž se jedná o absolutní metodu [38; 40]. Je vhodná pro analýzu materiálů bohatých na neutrální lipidy s nízkým obsahem vody. Umožňuje extrakci s využitím malého objemu rozpouštědla, kterým je vzorek opakovaně extrahován v cyklech. Používanými rozpouštědly jsou hexan, petrolether, diethylether nebo chloroform [41; 42].

Jedná se o kontinuální extrakci, kdy je ke vzorku neustále přiváděno čisté rozpouštědlo, zatímco ve varné baňce jsou koncentrovány netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Aparatura sestává z destilační baňky, extraktoru a chladiče. Tuhý zhomogenizovaný vzorek je navážen do patrony, která se vysuší v sušárně a následně se umístí do Soxhletova extraktoru. Destilační baňka se naplní vhodným rozpouštědlem a je zahřívána k jeho varu. Páry rozpouštědla stoupají postranní trubicí do chladiče, kde následně kondenzují a kapou do extraktoru. V něm dochází k vymývání rozpustných komponent z tuhé matrice vzorku v patroně. Extraktor se postupně plní rozpouštědlem a principem spojených nádob se plní i přepadová trubička. Po vystoupení hladiny rozpouštědla k nejvyšší části přepadové trubičky přeteče rozpouštědlo obsahující rozpuštěné analyty zpět do destilační baňky. Izolované látky proto musí být stabilní při teplotě varu použitého extrakčního rozpouštědla. Celý proces se opakuje, dokud nejsou požadované komponenty ze vzorku vyextrahovány v dostatečném množství. Po skončení extrakce je v destilační baňce získán roztok obsahující rozpouštědlo a vyextrahované lipidické látky. Pro izolaci lipidických látek je nutné odstranění rozpouštědla, které se provádí destilací při teplotách do 60 °C nejčastěji za pomoci vakuové odpary, aby nedocházelo k rozkladu extraktu. Po oddestilování rozpouštědla následuje vysušení obsahu baňky do konstantní hmotnosti [40; 43].



Obrázek 3 Klasický Soxhletův extraktor [43]

Přestože v současné době existují mnohem rychlejší extrakční metody, při nichž extrakce vzorku probíhá přímo vroucím rozpouštědlem, je Soxhletova metoda stále nejčastěji popisovanou a využívanou metodou pro stanovení tuku v krmivech a potravinách [38]. Její provedení je velmi jednoduché. Má ale řadu nevýhod, jako je časová náročnost a nutnost použití vysoce čistých rozpouštědel, které jsou hořlavé a nebezpečné. Rizikem je také možný únik emisí toxických sloučenin během extrakce. Vzhledem k působení vyšších teplot tato metoda není vhodná pro termolabilní sloučeniny [37; 41; 42].

2.8.1.1.2 SFE – superkritická fluidní extrakce

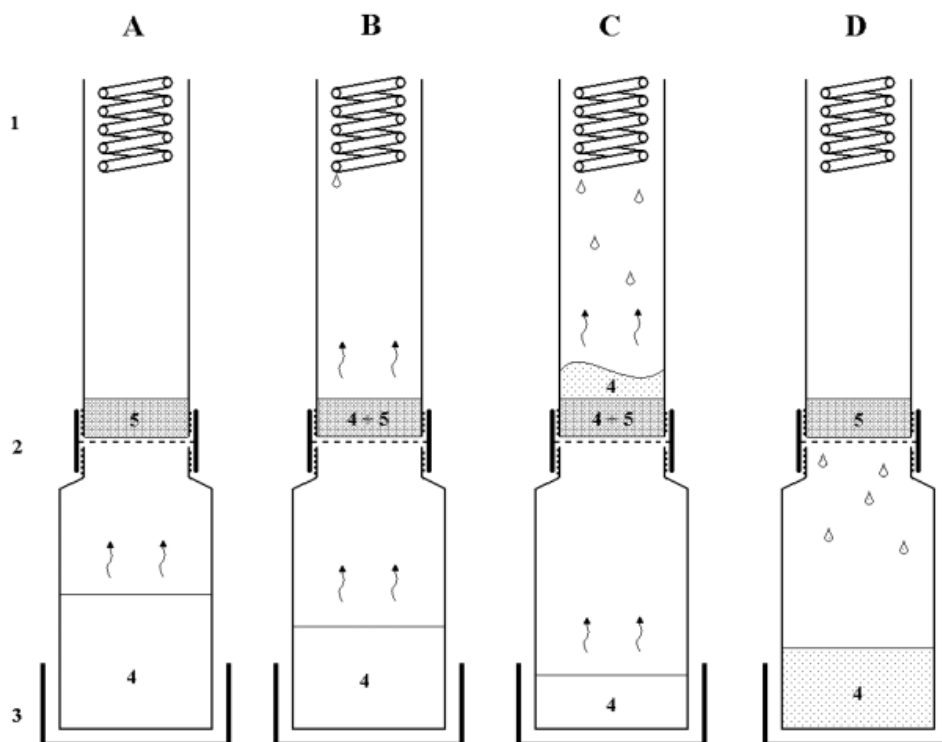
Extrakčním činidlem je u této metody superkritická kapalina, pomocí které je stanovovaná látka z obvykle pevné matrice extrahována. Nejčastěji se používá CO₂, někdy modifikovaný ethanolem, methanolem nebo vodou pro zvýšení rozpustnosti polárních látek. Extrakce probíhá v podmínkách, při kterých je CO₂ v kapalném stavu – teplota vyšší než 31 °C a tlak vyšší než 73 atm. Po extrakci je extrakt vrácen do normálních podmínek, ve kterých se CO₂ odpaří [35; 37; 38].

SFE je považována za slibnou alternativu ke konvenčním typům extrakcí. Mezi její hlavní výhody patří nepoužívání organických rozpouštědel a opětovné využití CO₂, mírné extrakční podmínky a zejména použití nízké teploty, která je vhodná pro termolabilní sloučeniny [35; 37].

2.8.1.1.3 FBE – extrakce na fluidním loži

Tento typ extrakce představuje možnou alternativu k Soxhletově metodě, oproti níž se vyznačuje používáním malých objemů rozpouštědla a značným zkrácením doby extrakce.

Rozpouštědlo ve spodní nádobě je zahříváno až k bodu varu a jeho páry pronikají přes filtr do extrakční trubice, kde je umístěn vzorek, a dále až ke kondenzátoru. Zkondenzované páry rozpouštědla kapou do ekstraktoru na vzorek a mísí se s horkými parami rozpouštědla, které neustále pronikají přes filtr. Tím je zajištěno udržení zkondenzovaného rozpouštědla při teplotě varu. Technika zajišťuje po celou dobu intenzivní a efektivní extrakci, která je ukončena zastavením ohřevu a chlazením aparatury. Ochlazení rozpouštědla a jeho kondenzace vede k poklesu tlaku, čímž dojde ke stečení rozpouštědla a extrahovaných látek přes filtr do spodní části nádoby. Celý proces je možné několikrát zopakovat. Po extrakci se zbylé rozpouštědlo odpaří na rotační vakuové odparce a baňka s vyextrahovaným tukem se vysuší [11; 44].



Obrázek 4 Schéma přístroje pro extrakci na fluidním loži: 1=chladič; 2=filtr; 3=ohřev/chlazení; 4=rozpouštědlo a 5=vzorek. **A:** začátek cyklu – ohřev spodní nádoby k varu rozpouštědla, **B:** zvlhčování vzorku parami rozpouštědla, které začíná kondenzovat na chladiči, **C:** zkondenzované rozpouštědlo zůstává se vzorkem na filtru a míší se s parami rozpouštědla ze spodní nádoby, dochází k intenzivní extrakci, **D:** konec cyklu – chlazení spodní nádoby, pokles tlaku v systému a stečení rozpouštědla s extrahovanými látkami přes filtr [44].

2.8.1.1.4 SPE – extrakce na pevné fázi

Extrakce typu kapalina-kapalina je většinou časově náročná a vyžaduje použití velkých množství drahých a zdraví škodlivých rozpouštědel. Proto ji stále více nahrazuje extrakce na pevné fázi, která je její dobrou alternativou.

Opírá se o principy kapalinové chromatografie, u které dochází k zachycení analytů obsažených v kapalně fázi na speciálním sorbentu a jejich následnému vymytí vhodně zvolenými rozpouštědly. Zadržení probíhá díky silným, ale reverzibilním interakcím mezi analytem a povrchem stacionární fáze. Používají se kolonky určené na jedno použití naplněné sorbentem, který je umístěn mezi dvě frity. Sorbenty se vyznačují různou polaritou a mohou být i iontově výměnné. Kapalně vzorek je veden přes kolonku a sloučeniny ze vzorku jsou zachytávány sorbentem, zatímco nežádoucí látky jsou selektivně vymyty. Sledované analyty jsou poté získány elucí vhodným rozpouštědlem.

Cílem je odstranění rušivých látek z matrice, izolace a zakoncentrování stanovovaných látek. Touto technikou lze také vzorky rozdělit na různé třídy lipidů v závislosti na jejich polaritě. Jedná se o jednu z nejučinnějších technik pro rychlou a selektivní separaci, jejíž výhodou je nižší spotřeba rozpouštědla, zkrácení doby přípravy vzorku a vyšší výtěžnost analytu [35; 45; 46; 47].

Metoda se skládá ze čtyř kroků, které zahrnují [45]:

- 1) Kondicionaci sorbentu
- 2) Aplikaci vzorku
- 3) Promytí
- 4) Eluci

Metodu je možné využít také pro přečištění vzorků methylesterů mastných kyselin určených pro plynovou chromatografii. Průchodem přes kolonku dojde k odstranění rušivých peroxidů a hydroxidů. Obecně plynová a kapalinová chromatografie využívají výhod této metody, která jim často předchází [46].

2.8.2 Metody stanovení mastných kyselin

Obvykle se mastné kyseliny stanovují metodou plynové chromatografie (GC) ve spojení s plamenově ionizačním detektorem (FID). Tato metoda vyžaduje, aby byl stanovovaný analyt v plynném skupenství. Jelikož mají mastné kyseliny vysoké body varu, je nutné před vlastní analýzou provést derivatizaci vzorku, která zahrnuje transesterifikační reakce. Produktem jsou těkavé methylestery mastných kyselin (FAME) vhodné pro analýzu metodou GC [11; 35; 37; 48].

Kromě plynové chromatografie je využívána také vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která v porovnání s GC umožňuje jakýmkoliv způsobem upravovat složení mobilní fáze změnou poměru polárních a nepolárních složek a tím ovlivňovat retenci. Z tohoto pohledu je HPLC oproti GC velmi flexibilní [49]. Využívá se pro rychlou analýzu volných mastných kyselin a jejich methylesterů, stanovení konjugovaných polynenasycených mastných kyselin a identifikaci jejich geometrických isomerů [35]. Vzhledem ke struktuře mastných kyselin se nejčastěji využívá ve spojení s ELCD detektorem (*Evaporative Light Scattering Detector*), který je kompatibilní s gradientovou elucí a umožňuje stanovení látek, které neobsahují chromofory. Z tohoto důvodu není vyžadována derivatizace vzorku, což se projeví úsporou času. HPLC je vhodná pro stanovení tepelně labilních látek a úchovu frakcí eluátu pro další analýzu [49]. Pro stanovení komplexních směsí mastných kyselin se ale z důvodu nízké účinnosti velmi nepoužívá a preferovanou metodou je GC [50].

2.8.3 Analýza mastných kyselin metodou plynové chromatografie

Stanovení mastných kyselin předchází jejich extrakce ze vzorku ve formě surového tuku, který je před vlastní analýzou mastných kyselin podroben esterifikačním a transesterifikačním reakcím. Vzniklé FAME jsou separovány pomocí GC. Jejich identifikace a kvantifikace probíhá nejčastěji za použití FID [35; 37; 48; 51].

2.8.3.1 Příprava methylesterů mastných kyselin (FAME)

Protože volné ani vázané mastné kyseliny nejsou dostatečně těkavé pro přímé stanovení pomocí GC, je nutné provést jejich derivatizaci. Nejjednodušší a nejvíce těkavý derivát mastných kyselin představují methylestery. K jejich přípravě se využívá v závislosti na povaze vzorku kyselá nebo bazická esterifikace [37; 48; 51]. Reakce je nutné provádět v bezvodém prostředí, aby nedocházelo k saponifikaci [48].

2.8.3.1.1 Kyselá katalyzovaná esterifikace

Kyselá katalyzovaná reakce vyžadují záhřev v nadbytku bezvodého methanolu a v přítomnosti kyselého katalyzátoru. Nejčastěji používanými činidly jsou kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a fluorid boritý. Jelikož je vzorek zahříván spolu s činidlem pod zpětným chladičem několik hodin, je tato metoda časově náročná. Výsledkem reakce je esterifikace volných mastných kyselin i transesterifikace mastných kyselin vázaných v lipidech [37; 48; 51].

2.8.3.1.2 Bazicky katalyzovaná esterifikace

Bazicky katalyzovaná reakce jsou rychlejší a probíhají za mírnějších podmínek, klidně i při pokojové teplotě. Používanými činidly jsou methoxid sodný, methoxid draselný a hydroxid draselný v bezvodém methanolu. Díky mírnějším podmínkám je zde nižší riziko rozkladu polyenových mastných kyselin.

Dochází k esterifikaci pouze vázaných mastných kyselin [51]. Pro vzorky obsahující značné množství volných mastných kyselin je navržen modifikovaný postup, kdy po bazické transesterifikaci dochází k přidavku bezvodé kyseliny chlorovodíkové v methanolu pro esterifikaci volných mastných kyselin [48].

2.8.3.2 Plynová chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda založená na rozdělování mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, kdy jedna fáze je mobilní a druhá stacionární.

Principem GC je dělení složek směsi v koloně na základě rozdílné afinity ke stacionární fázi. Mobilní fází je zde nosný plyn, který musí být vůči stacionární fázi a stanovovaným analytům inertní. Vzorek se nanáší pomocí injektoru do nástřikové komory, která je vyhřívána a dochází zde k jeho zplynění. Ve formě par je poté unášen nosným plynem kolonou. Nastává interakce mezi vzorkem a stacionární fází, kdy jsou jednotlivé složky různě pevně zadržovány a dochází tak k jejich separaci. Takto separované složky jsou následně dle stupně zadržení desorbovány nosným plynem, postupně opouští kolonu a vstupují do detektoru, který kontinuálně sleduje složení eluátu a převádí ho na měřitelnou veličinu – např. elektrický signál. Doba, po kterou prochází látka kolonou se označuje jako retenční čas t_R . Představuje dobu od nástřiku vzorku na kolonu po dosažení vrcholu píku sledované látky v chromatogramu.

Výhodou plynové chromatografie je jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a použití malého množství vzorku. Dělit a stanovovat lze pevné látky, plyny a kapaliny s bodem varu do 400 °C [47; 48; 52; 53; 54; 55; 56].

2.8.3.2.1 Instrumentace plynového chromatografu

Plynový chromatograf sestává ze zdroje nosného plynu (tlaková láhev), regulačních prvků k úpravě tlaku, injektoru, kolony, termostatu, detektoru a zařízení na zpracování a záznam signálu detektoru. Podmínkou úspěšné analýzy je správná funkce všech částí chromatografu a vhodný výběr kolony a detektoru [56].

2.8.3.2.1.1 Zdroj plynu a zařízení pro regulaci a měření průtoku nosných plynů

Zdrojem nosného plynu jsou většinou tlakové lahve plněné H₂, N₂, He, Ar nebo CO₂, za kterými následují regulátory tlaku, tlakoměry a průtokoměry [55; 56; 57]. Volba nosného plynu závisí na používaném detektoru [57]. Všechny plyny využívané v GC je nutné před analýzou zbavit vodních par a nečistot [56].

Pro kvantitativní práci je zcela nezbytné pomocí regulátorů tlaku udržovat konstantní průtok nosného plynu, na kterém závisí účinnost separace kolony a funkce některých detektorů. Pro hrubý odhad průtoku plynu se využívá rotametrů, přesnější hodnoty poskytují mýdlové průtokoměry [56]. Průtok je možné regulovat pomocí regulačních ventilů na lahvích nebo pomocí regulačních zařízení, které se nachází v přístroji [57] a umožňují docílit stejného průtoku nosného plynu i při měnících se teplotách v průběhu analýzy [47].

2.8.3.2.1.2 Dávkovací zařízení

Aby bylo dosaženo velké separační účinnosti kolony, je potřeba dávkovat do systému vhodné množství vzorku. Příliš velké množství vzorku může způsobit rozmytí zón a snížení rozlišení píků na chromatogramu [55].

K nástřiku se používají kalibrované mikrostříkačky, které propíchnou septum vialky, nasají vzorek a nadávkují ho do vyhřívaného injektoru, kde dojde ke zplynění a zavedení látky do proudu nosného plynu [55; 57]. V injektoru se udržuje teplota asi o 50 °C vyšší, než je teplota varu nejméně těkavé látky vzorku [55; 56; 57; 58].

Volba dávkovacích zařízení je určena typem kolon, vlastnostmi analyzované látky a účelem analýzy. Kapaliny a plyny jsou dákovány stříkačkami. Tuhé látky lze dávkovat kovovou jehlou, ale tento způsob dákování je zatížen velkou chybou, vhodnějším způsobem je předchozí rozpuštění stanovovaných látek v rozpouštědle. Kapalné vzorky vyžadují okamžité zplynění a dákování par na kolonu [56].

Při použití náplňových kolon se dákuje 0,1–20 µl. Kapilární kolony vyžadují sto i vícenásobně menší množství vzorku, jelikož vykazují menší kapacitu a je důležité kolonu nepřetížít. Proto u nich bývá využíváno děličů toku (*split injektors*), pomocí kterých je na kolonu dákována jen nepatrná část vzorku a zbytek je vyloučen do atmosféry [55; 57]. Dělič toku nesmí ovlivnit kvalitativní ani kvantitativní údaje. Pro vzorky zastoupené ve stopových množstvích lze využít přímého dákování na kolonu pomocí *on-column injektoru* [56].

Pro reprodukovatelný nástřik vzorku a celodenní využití přístroje s minimální obsluhou se využívají autoinjektory a autosamplery, díky kterým probíhá plnění stříkaček a dákování konstantního množství vzorku na kolonu automaticky [55; 56].

2.8.3.2.1.3 Kolona

Dříve byly používány výhradně náplňové kolony se sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou stacionární fází. V dnešní době jsou nahrazeny kapilárními, kde funkci nosiče zastávají vnitřní stěny kapiláry. Vykazují účinnější separaci a umožňují rychlejší analýzu [55].

V případě náplňových kolon se nejčastěji jedná o skleněné nebo kovové trubice dlouhé 2–3 m s vnitřním průměrem 2–4 mm, které jsou naplněny jemně mletými sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou stacionární fází. Vzhledem ke své konstrukci se hodí více pro těkavější

látky a mohou být vystaveny vysoké zátěži, takže nejsou potřeba vysoce citlivé detektory. Oproti kapilárním kolonám mají vyšší kapacitu, ale nemají tak vysokou účinnost a separační schopnost.

Kapilární kolony jsou vhodné pro vzorky s vyšší molekulovou hmotností, které jsou méně těkavé. Mají vysokou separační účinnost danou velikostí plochy, na které separace probíhá [55; 56]. Kolony jsou dlouhé 10–100 m, proto bývají stočeny do smyček. Jejich vnitřní průměr se v závislosti na výrobci pohybuje v rozmezí 0,01–0,50 mm [56]. Nevýhodou kapilárních kolon OTC (*Open Tubular Columns*) je malá kapacita vyžadující minimální dávkování vzorku, jelikož jsou náchylné k přetížení a mají tendence se zanášet.

Rozlišujeme tři skupiny OTC:

WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) – kolony s tenkou vrstvou kapalné stacionární fáze zakotvené na vnitřních stěnách kapilární trubice.

SCOT (*Support Coated Open Tubular*) – kolony s tenkou vrstvou pevného nosiče na vnitřní stěně kapilární trubice, na kterém je naadsorbována kapalná stacionární fáze. Mají větší kapacitu než WCOT, jelikož obsahují větší množství stacionární fáze [55; 56].

PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) – kolony s tenkou pórovitou vrstvou adsorbentu, kterou lze smočit kapalnou fází, nanesenou na vnitřní stěně kapiláry [56].

Materiály pro výrobu kapilárních kolon musí být dostatečně tvárné, aby mohly být vytvořeny kapiláry až stovky metrů dlouhé. Využívá se nerezová ocel, sklo a tavený křemen. Kovové kapiláry mají výborné mechanické vlastnosti a jsou tepelně stálé, jejich povrch však působí katalyticky na řadu analyzovaných organických látek i na stacionární fáze. Jsou neprůhledné a nelze tedy kontrolovat dokonalé pokrytí stacionární fází. Skleněné kapiláry jsou průhledné, chemicky inertní a mechanicky dost pevné, ale jsou křehké a jejich hladký povrch vyžaduje úpravy leptáním před smáčením kapalnou stacionární fází. Křemenné kapiláry vykazují oproti skleněným vyšší pevnost, pružnost a menší reaktivitu vůči stanovovaným složkám. Mají daleko tenčí stěny a pro zvýšení odolnosti a pevnosti se pokrývají z vnější strany vrstvou polyimidu, který umožňuje pracovní teploty až do 340 °C [55; 56].

Používané stacionární fáze musí být teplotně stabilní a chemicky inertní, s teplotou varu minimálně o 100 °C vyšší, než je maximální provozní teplota kolony. Polarita stacionární fáze by měla odpovídat polaritě složek analyzovaného vzorku [55].

Vzhledem ke struktuře FAME se při jejich stanovení používají kolony s polárními stacionárními fázemi, kdy míra polarity ovlivňuje retenční časy FAME, zejména poté polynenasycených typů. Výběr kolony proto probíhá na základě struktury stanovovaných FAME [48; 55]. Závisí na délce uhlovodíkových řetězců, stupni nasycení, přítomnosti *cis-trans* isomerů a lokaci dvojných vazeb. Rozlišovací schopnost je zejména pro nenasycené typy FAME nejvyšší na kolonách s vysoce polární stacionární fází, která umožňuje i detailní separaci *cis-trans* izomerů. Bohužel, vysoce polární kolony mají nízkou tepelnou kapacitu, proto se pro separaci komplexních směsí FAME doporučuje použití středně polárních stacionárních fází, které mají relativně vysokou rozlišovací schopnost a jsou poměrně tepelně stabilní [48; 59].

Využívají se polysiloxany substituované methylem, fenylem nebo kyanopropylem [55; 59]. Pro vzorky, které obsahují jednoduché směsi FAME, postačí kolony s polyethylenglykolem (PEG) [11; 59].

2.8.3.2.1.4 Termostat

Pro udržení vzorku v plynné fázi je kolona umístěna v termostatu. Pokud probíhá separace vzorků, které mají široké rozmezí teplot varu složek, používá se teplotní program a v průběhu analýzy dochází ke gradaci teploty pro zplynění všech složek. Termostat také zajišťuje dostatečně vysokou teplotu injektoru, případně detektoru. Výběr teploty analýzy je vždy kompromisem mezi nízkými teplotami, které jsou vhodné pro optimální separaci a mezi vysokými teplotami, které zaručí rychlou analýzu [55; 58].

2.8.3.2.1.5 Detektor

Funkce detektorů je převádět analytické vlastnosti analyzované látky na hodnoty, které lze registrovat. Pro stanovení FAME se využívá plamenově ionizační (FID) nebo tepelně vodivostní (TCD) detektor, jejich identifikace probíhá pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) [48; 55].

TCD (*Thermal Conductivity Detector*) je univerzálním detektorem, jelikož signál poskytují všechny látky. Principem je měření elektrického odporu drátku v závislosti na tepelné vodivosti plynu, který jej obklopuje. Z tohoto důvodu se nepoužívá, pokud je vodivost nosných plynů blízká vodivosti stanovovaných analytů. Přednostně se využívá pro detekci nízkomolekulárních organických látek a anorganických plynů. Výhodou je jeho univerzálnost, jednoduchost, široký lineární rozsah a nedestruktivní charakter, kterého se využívá při sběru analytů po jejich detekci. Nevýhodou oproti jiným detektorům je nízká citlivost, takže se nehodí pro použití s kapilárními kolonami, na které se dávkuje velmi malé množství vzorku [55].

V plynové chromatografii jsou hojně využívány ionizační detektory. Princip, na kterém jsou tyto detektory založeny, spočívá ve vedení elektřiny v plynech. Pokud jsou v plynu přítomny elektricky nabitě atomy, molekuly nebo volné elektrony, způsobuje jejich pohyb ve směru elektrického pole vodivost plynu. Takto lze zjistit přítomnost i nepatrného počtu nabitých molekul, což vysvětluje vysokou citlivost těchto detektorů.

Pro analýzu uhlovodíků je nejrozšířenějším a v analýze FAME nejvyužívanějším detektorem FID. Je velmi citlivý a má dobrou linearitu v širokém rozsahu koncentrací za předpokladu, že jsou dodržena doporučení výrobců přístrojů týkající se průtoku plynu [48; 55; 56]. Principem je měření změny elektrické vodivosti, která se projeví v přítomnosti eluované látky. Vedení proudu je zprostředkováno ionty, které vznikají ionizací molekul v kyslíko-vodíkovém plameni, je tedy potřeba použití takzvaných přídavných (make-up) plynů, a tudíž i dalších regulátorů. Nosným plynem je zde dusík, který se před vstupem do trysky hořáku mísí s vodíkem. Vzduch, který do plamene difunduje, působí jako zdroj kyslíku. Detektor je tvořen dvěma elektrodami, na které je vloženo stejnosměrné napětí. Pokud do plamene přichází pouze nosný plyn, je vodivost nepatrná v důsledku minimálního vzniku iontů. Při eluci stanovované látky dochází v plameni k její ionizaci a vzniklé ionty migrují k elektrodám, což zvýší elektrickou vodivost. Z rozdílu změřeného signálu získáme přesnou informaci o vzorku, protože proud je přímo úměrný ionizaci, která závisí na složení vzorku.

Nejmenší detekované množství představuje 10^{-12} g/s, proto se FID používá ve spojení s kapilárními kolonami. Jeho nevýhodou je destrukce vzorku při spalování a nutnost použití přídavných plynů a regulátorů [47; 52; 53; 54; 55].

Při analýze neznámých směsí lze využít také spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), což je jeden z nejuniverzálnějších detektorů. MS je založena na převedení molekul na ionty a separaci těchto iontů na základě jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) v magnetickém nebo elektrickém poli. Existují různé druhy hmotnostních spektrometrů, které se liší použitým typem ionizace a hmotnostního analyzátoru. Při identifikaci FAME se využívá chemických ionizačních technik a analyzátozem bývá zpravidla kvadrupól a iontová past. MS odhaluje látky, které se při GC eluovaly společně a představovaly jeden pík na chromatogramu. Pro každou složku lze získat hmotnostní spektrum, které je porovnáno s knihovnou spekter a dochází tak k její identifikaci [35; 47; 55].

2.8.3.2.1.6 Zařízení na zpracování a záznam signálu detektoru a vyhodnocení analýzy

Působením analytické vlastnosti na čidlo vzniká signál, který je snímán v nastavených časových intervalech a zaznamenán pomocí softwarového programu. Záznam intenzity signálu na čase se nazývá chromatogram, ze kterého lze získat jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o jednotlivých složkách vzorku.

Identifikace látek probíhá na základě shody retenčních časů t_R (maxima píků) stanovované látky a standardu, za předpokladu měření hodnot při stejných podmínkách experimentu. Správná identifikace je založena na úplné separaci všech složek, kdy každý pík odpovídá pouze jedné eluované látce.

Koncentrace látky je úměrná ploše píku [47; 48; 52; 53; 54; 55; 56]. Kvantifikace na základě výšky píku není vhodná, jelikož i malé změny ve tvaru píku zkreslují výsledek. Pokud při kvantifikaci nejsou dva píky od sebe zcela odděleny, zejména pokud je jedna složka viditelná pouze jako menší rameno nebo rozšíření píku, je potřeba změnit podmínky separace, případně vybrat kolonu s vyšší rozlišovací schopností [48].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení a chemikálie

3.1.1 Přístroje

- laboratorní mlýnek na jemné mletí (MIAG)
- předvážky (SARTORIUS-INTEC)
- analytické váhy s přesností na 0,001 g (Denver instrument, USA)
- extraktor fexIKA® dive-in kontrol s příslušenstvím (IKA, Německo)
- extrakční přístroj podle Soxhleta – extrakční nástavec (200 ml), kuličkový chladič, baňka s kulatým dnem, topné hnízdo
- stolní počítač
- rotační vakuová odparka IKA®RV 10 digital (IKA, Německo)
- horkovzdušná sušárna Venticell (BMT, Česká republika)
- termoblok – Dry Block Heater HB2DG, (OHAUS, USA)
- plynový chromatograf Trace Ultra s FID detektorem (Thermo Scientific, USA)
- vortex Genie 2, (Scientific Industries, Inc., USA)
- centrifuga Eppendorf MiniSpin plus (Eppendorf)
- exsikátor
- chladnička a mraznička

3.1.2 Pracovní pomůcky

- extrakční baňky pro extraktor fexIKA® 200 ml
- automatické mikropipety 10–100 µl, 100–1000 µl, špičky
- skleněné zkumavky 10 ml se zábrusem a skleněnou zátkou
- extrakční baňka 500 ml
- mikrozkušavky Eppendorf 2 ml
- Pasteur pipety 1 ml
- vialky 2 ml, 5 ml
- hliníková víčka se septem 11 mm
- krimpovací kleště
- filtrační papír hladký nehlazený pro základní laboratorní využití 2R, 80 g/m²
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.1.3 Chemikálie

- Petrolether, Sigma-Aldrich (Izrael)
- Hexan pro HPLC $\geq 97,0$ %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Methanol pro HPLC $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich (Francie)
- Hydroxid draselný, Lach-Ner s.r.o (Česká republika)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o (Česká republika)
- Síran sodný bezvodý, Lach-Ner s.r.o (Česká republika)
- Isooktan p.a., PENTA s.r.o (Česká republika)
- Směsný standard methylesterů mastných kyselin – Supelco 37 Component FAME mix, Sigma-Aldrich (USA)
- Hydrogensíran draselný, Sigma-Aldrich (Německo)
- Kyselina sírová 96% p.a., PENTA s.r.o (Česká republika)

3.1.4 Plyny

- Vodík, čistota 4.5
- Dusík, čistota 5.0
- Helium, čistota 5.5
- Vzduch, čistota 5.0

3.2 Příprava vzorků

Byly analyzovány vzorky ječmene jarního, vypěstovaného v České republice soukromými pěstiteli, ze kterých byly ve VÚPS, a.s. v mikroskladovně za standardních podmínek vyrobeny slady. Standardní podmínky sladování jsou uvedeny v Tabulka 1. Jednalo se o sladovnický ječmen sklizně roku 2022 odrůd doporučených VÚPS, a.s. pro výrobu piva s chráněným zeměpisným označením „České pivo“.

Tabulka 1 Podmínky pro sladování obilky ječmene

parametr	hodnota parametru
stupeň domočení	45 ± 1 %
doba sladování	144 ± 1 hod
teplota klíčení	14 ± 1 °C
teplota hvozdění	55–80 °C

Celkem bylo analyzováno 14 vzorků ječmene a 14 vzorků z něj vyrobených sladů. Z důvodu analýzy vždy dvou odrůd shodného názvu bylo pro jejich rozlišení použito horních indexů^{1,2}. Těsně před zpracováním byly vzorky pomlety, aby se zabránilo možné oxidaci lipidů.

Tabulka 2 Seznam vzorků s místem původu

číslo vzorku	odrůda	původ (okres)	číslo vzorku	odrůda	původ (okres)
1	Bojos ¹	Olomouc	8	LG Ester ²	Hradec Králové
2	Bojos ²	Olomouc	9	LG Stangast ¹	Šumperk
3	Francin ¹	Opava	10	LG Stangast ²	Olomouc
4	Francin ²	Olomouc	11	Malz ¹	Opava
5	Laudis 550 ¹	Olomouc	12	Malz ²	Přerov
6	Laudis 550 ²	Kolín	13	Manta ¹	Opava
7	LG Ester ¹	Bruntál	14	Manta ²	Olomouc

3.3 Stanovení lipidů

Princip

Extrakce lipidů na fluidním loži se provede z rozemletého ječmene nebo sladu petroletherem v extrakčním přístroji fexIKA® dive-in control. Po odpaření rozpouštědla se vysušené extrakty zváží.

Pracovní postup

Do extrakční patrony z filtračního papíru bylo naváženo $5 \pm 0,001$ g zrna ječmene nebo sladu předem rozemletého na laboratorním mlýnku pro jemné mletí. Extrakční patrona se vzorkem byla vložena do extraktoru, ke kterému byla přišroubována předem vysušená a zvážená extrakční baňka (30 minut při $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, chlazení v exsikátoru, vážení s přesností na $0,001$ g), do které bylo odměřeno 60 ml petroletheru. Po sestavení extrakční aparatury byl vzorek automaticky extrahován v 7 cyklech ($75\text{ }^{\circ}\text{C}$ s výdrží 10 minut, následovalo chlazení na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Celková extrakce trvala asi 2 hodiny. Po extrakci bylo zbylé rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Baňka s vyextrahovanými lipidy byla sušena 1 hodinu při $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ v elektrické sušárně. Po ochlazení v exsikátoru byla baňka zvážena s přesností na $0,001$ g. Do extrakční baňky byl k vyextrahovaným lipidům přidán 1 ml isooktanu a tato směs byla převedena do 2 ml Eppendorfové mikrozkuřavky a uchována v mrazáku pro stanovení mastných kyselin.

Výpočet a vyhodnocení

$$L_p = \frac{H \cdot 100}{n}, \quad (1)$$

$$L_s = \frac{L_p \cdot 100}{s}, \quad (2)$$

kde:

L_p ... obsah lipidů v původním vzorku (%),

L_s ... obsah lipidů v sušině vzorku (%),

H ... hmotnost baňky s vyextrahovanými lipidy – hmotnost prázdné baňky (g),

n ... navážka ječmene nebo sladu (g),

s ... sušina ječmene nebo sladu (%).

Výsledek byl uveden v procentech na dvě desetinná místa.

3.3.1 Porovnání stanovení obsahu lipidů s referenční metodou

Metoda extrakce na fluidním loži pomocí přístroje fexIKA® dive-in control byla porovnána s referenční metodou extrakce podle Soxhleta.

Pracovní postup

Do extrakční baňky, která byla předem vysušená a zvážená (30 minut při $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, chlazení v exsikátoru, vážení s přesností na $0,001$ g), bylo odměřeno 250 ml petroletheru. Do extrakční patrony bylo naváženo $5 \pm 0,001$ g předem rozemletého vzorku. Po připojení chladiče a sestavení aparatury extrakce probíhala 3 hodiny s frekvencí 8–10 přepadů za hodinu. Po ukončení extrakce a vychladnutí aparatury bylo zbylé rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Baňka s vyextrahovanými lipidy byla sušena 1 hodinu při $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ v elektrické sušárně. Po ochlazení v exsikátoru byla baňka s lipidy zvážena s přesností na $0,001$ g.

3.4 Stanovení mastných kyselin

Z vyextrahovaných lipidů byly triacylglyceroly převedeny na methylestery příslušných mastných kyselin, které byly analyzovány metodou GC-FID.

3.4.1 Příprava methylesterů mastných kyselin

3.4.1.1 Alkalická esterifikace vyextrahovaných lipidů

Princip

Triacylglyceroly jsou rozpuštěny v isooktanu a převedeny na methylestery transesterifikací s methanolickým roztokem hydroxidu draselného. Po ukončení reakce je hydroxid draselný neutralizován hydrogensíranem draselným, aby se zamezilo zmýdelňování methylesterů. Takto připravené methylestery se analyzují metodou plynové chromatografie.

Pracovní postup

Příprava methanolického roztoku KOH (c = 2 mol/l)

Ve 100 ml absolutního methanolu bylo rozpuštěno 13,1 g KOH. K vysušení připraveného roztoku bylo přidáno větší množství bezvodého síranu sodného a po 30 minutách byl roztok přefiltrován.

Příprava FAME

Do zkumavky se zábrusem bylo napipetováno 100 µl roztoku vyextrahovaného tuku v isooktanu a přidány 4 ml isooktanu. Zkumavka byla uzavřena a obsah protřepán. Bylo přidáno 200 µl připraveného methanolického roztoku KOH a směs ve zkumavce bylo intenzivně třepáno po dobu 30 sekund. Poté byl ke směsi přidán asi 1 g hydrogensíranu draselného a znovu bylo intenzivně třepáno po dobu 15 sekund, aby se zneutralizoval hydroxid draselný. Po usazení soli byla do 2 ml vialky odebrána horní isooktanová vrstva, která byla 5x zředěna isooktanem a analyzována metodou GC-FID.

3.4.1.2 Kyselá esterifikace vyextrahovaných lipidů

Princip

Volné a vázané mastné kyseliny jsou esterifikovány zahříváním v přebytku bezvodého methanolu v přítomnosti kyseliny sírové jako katalyzátoru. Po ukončení reakce je přebytek kyseliny neutralizován hydroxidem draselným.

Pracovní postup

Do krimpovací vialky bylo naváženo přibližně 10 mg vyextrahovaných lipidů. Následně bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi (15% kyselina sírová v methanolu a interní standard kyseliny heptadekanové o koncentraci 0,5 mg/ml) a vialka byla zakrimpována. Takto připravený vzorek byl inkubován v termobloku 2 hodiny při 85 °C. Následovalo ochlazení na laboratorní teplotu a obsah vialky byl kvantitativně převeden do čisté vialky o objemu 5 ml. Následně bylo přidáno 0,5 ml 0,05 M NaOH a 1 ml hexanu. Uzavřené vialky byly třepány na vortexu po dobu 10 minut. Následovalo stočení na centrifuze, při kterém došlo k oddělení organické fáze, ze které bylo odebráno 0,1 ml do čisté vialky. Po přidavku 0,9 ml hexanu byly vzorky připraveny pro analýzu metodou GC-FID.

3.4.2 Analýza methylesterů mastných kyselin metodou plynové chromatografie

Analýza FAME byla provedena optimalizovanou metodou GC-FID na koloně SLB-IL 100. Podmínky analýzy jsou uvedeny níže. Před nástřikem vzorku byla ověřena hladina pozadí záznamu pomocí nástřiku čistého rozpouštědla.

Podmínky analýzy

- Plynový chromatograf Trace Ultra
- Autosampler AS/AI 3000
- Kapilární kolona SLB-IL 100 (60 m x 0,25 mm x 0,2 μm)
- Celková doba analýzy 52,5 min
- Teplotní program
 - 50 °C → gradient 4 °C/min → 220 °C s výdrží 10 min
 - teplotní limit 230 °C
- Injektor (PTV)
 - teplota: 250 °C
 - objem nástřiku: 1 μl
 - doba bezděličového dávkování: 48 sekund
 - průtok splitovacím ventilem: 60 ml/min
- Nosný plyn
 - Helium
 - průtok: 1,5 ml/min
- Detektor (FID)
 - teplota: 250 °C
 - průtok vzduchu: 250 ml/min
 - průtok vodíku: 35 ml/min
 - průtok dusíku (makeup): 30 ml/min

Výpočet a vyhodnocení

Identifikace mastných kyselin probíhala na základě porovnání retenčních časů methylesterů mastných kyselin se standardem, jehož parametry uvádí Příloha 1. Vyhodnocení probíhalo v programu Chrom-Card a zastoupení jednotlivých mastných kyselin v analyzovaných vzorcích bylo vyjádřeno v procentech jako jejich relativní obsah. Výsledek byl uveden na dvě desetinná místa.

Dále proběhl výpočet hmotnostní koncentrace mastných kyselin v mg/g vyextrahovaného tuku. K výpočtu byly použity získané lineární regrese z proměření roztoků kalibrační řady, ve tvaru:

$$y = ax + b, \quad (3)$$

kde:

- y... plocha píku standardu,
- x... koncentrace standardu (μg/ml),
- a... směrnice kalibrační přímky (ml/μg),
- b... absolutní člen.

Koncentrace mastných kyselin byla vypočtena pomocí rovnic:

$$c_{\text{methylesteru MK}} = \frac{S - b}{a}, \quad (4)$$

$$c_{\text{MK}} = c_{\text{methylesteru MK}} \cdot \frac{Mr_{\text{MK}}}{Mr_{\text{methylesteru MK}}}, \quad (5)$$

$$m_{\text{MK}} = c_{\text{MK}} \cdot V_{\text{iso}} \cdot z\check{r} \cdot 10^{-3}, \quad (6)$$

$$c = \frac{m_{\text{MK}}}{m_{\text{tuku}}}, \quad (7)$$

kde:

$c_{\text{methylesteru MK}}$... koncentrace methylesteru MK ve vialce ($\mu\text{g/ml}$),

S ... plocha píku methylesteru,

c_{MK} ... koncentrace MK ve vialce ($\mu\text{g/ml}$),

Mr_{MK} ... molární hmotnost MK (g/mol),

$Mr_{\text{methylesteru MK}}$... molární hmotnost methylesteru MK (g/mol),

m_{MK} ... hmotnost MK ve vyextrahovaném tuku (mg),

V_{iso} ... celkový objem isooktanu použitý k esterifikaci (ml),

m_{tuku} ... hmotnost vyextrahovaného tuku (g),

c ... koncentrace MK ve vyextrahovaném tuku (mg/g).

Výsledek byl uveden v procentech na dvě desetinná místa.

3.5 Validace

U metody stanovení lipidů byla ověřena opakovatelnost. Pro metodu stanovení FAME pomocí GC-FID byla provedena validace v rozsahu – opakovatelnost, linearita, mez detekce a mez stanovení.

Validace

Prokazuje, že zvolený postup metody je vhodný pro zamýšlené analytické použití. Vlastnosti metody jsou vyjádřeny v pojmech analytických charakteristik – přesnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, selektivita, specifičnost, rozsah, linearita a robustnost. Každá analytická metoda musí být před použitím validována [60; 61].

Opakovatelnost

Vyjadřuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek, které byly provedeny stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji a ve stejné laboratoři, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody [60; 61].

Linearita

Definuje schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci analytu [60]. Je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými – analytickým signálem a koncentrací analytu. Těsnost závislosti těchto dvou proměnných charakterizuje korelační koeficient. Čím více se tento koeficient blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější, zároveň hodnota koeficientu nesmí klesnout pod hodnotu 0,98 [61].

Mez detekce (LOD)

Mez detekce je definována jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, nikoliv však kvantifikováno [60]. Jedná se o nejnižší koncentraci, při které se analytický signál statisticky významně liší od šumu. Lze ji vypočítat pomocí vztahu [61].

$$LOD = 3 \cdot \frac{h_s}{a}, \quad (8)$$

kde:

h_s ... výška šumu základní linie,

a ... směrnice kalibrační křivky (závislost výšky píku h na koncentraci c).

Mez stanovitelnosti (LOQ)

Jedná se o nejnižší koncentraci analytu, která může být stanovena s přijatelnou přesností a správností za uvedených podmínek metody [60]. Lze ji vypočítat pomocí vztahu [61]:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{h_s}{a}, \quad (9)$$

kde:

h_s ... výška šumu základní linie,

a ... směrnice kalibrační křivky (závislost výšky píku h na koncentraci c).

3.6 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu Microsoft Excel 365. Při vyhodnocování byly využity následující statistické parametry:

3.6.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován vztahem [62]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (10)$$

kde:

n ... rozsah souboru,

$x_1 - x_n$... hodnoty prvního až n -tého prvku souboru.

3.6.2 Směrodatná odchylka (SD)

Směrodatná odchylka uvádí rozptýlení jednotlivých hodnot okolo aritmetického průměru. Uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřen aritmetický průměr \bar{x} . Vypočítá se podle vztahu [62]:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (11)$$

Ve formě směrodatné odchylky se vyjadřuje standardní nejistota výsledku měření u [61].

3.6.3 Rozšířená nejistota měření (U)

Rozšířená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření u (směrodatné odchylky) a koeficientu rozšíření $k=2$, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí přibližně 95 %.

3.6.4 Relativní směrodatná odchylka (RSD)

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru. Uvádí se v procentech a je definována následujícím vztahem [62]:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (12)$$

Ve výpočtech RSD byla namísto směrodatné odchylky s použita rozšířená nejistota měření U .

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Opakovatelnost extrakce tuků

Opakovatelnost extrakce byla vyhodnocena z výsledků 8 nezávislých měření, která proběhla v krátkém časovém intervalu. Pro stanovení byl použit vzorek ječmene č. 13 (Manta¹). Výsledky vyjádřené jako obsah lipidů v sušině ječmene a statistické zpracování uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3 Opakovatelnost extrakce

číslo extrakce	obsah lipidů v sušině [%]
1	1,94
2	1,87
3	1,83
4	1,82
5	1,84
6	1,95
7	1,97
8	1,92
průměr [%]	1,89
U [%]	0,12
RSD [%]	6,35

Hodnota relativní směrodatné odchylky (nejistota) stanovení obsahu tuku v ječmeni byla 6,4 %.

4.2 Porovnání stanovení obsahu lipidů s referenční metodou

K měření byl použit stejný vzorek jako pro stanovení opakovatelnosti – vzorek ječmene č. 13 (Manta¹). Obsah vyextrahovaných lipidů Soxhletovou metodou přepočtený na sušinu vzorku a srovnání s výsledky opakovatelnosti udává Tabulka 4.

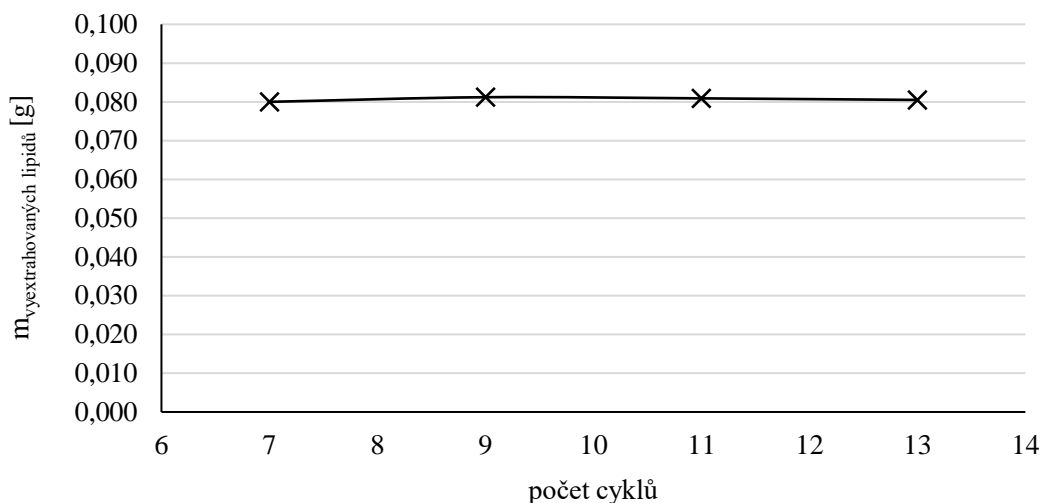
Tabulka 4 Srovnání různých metod extrakce

metoda extrakce	obsah lipidů v sušině [%]
fexIKA® dive-in control	1,89
Soxhlet	1,83

Srovnáním extrakce lipidů na fluidním loži s referenční metodou dle Soxhleta bylo ověřeno, že použitá metoda extrakce na fluidním loži je vhodná k extrakci lipidů z analyzovaných vzorků.

4.3 Optimalizace počtu cyklů extrakce

Metoda extrakce na fluidním loži byla nastavena na 7 extrakčních cyklů. Bylo provedeno ověření, zda je nastavený počet cyklů dostatečný. Závislost počtu cyklů na vyextrahovaném množství lipidů ze vzorku je zobrazena v Graf 1. Z grafu vyplývá, že uvedený počet cyklů (7) je dostatečný a při vyšším počtu cyklů nedochází k nárůstu množství vyextrahovaných lipidů, pouze by se prodlužovala doba extrakce.



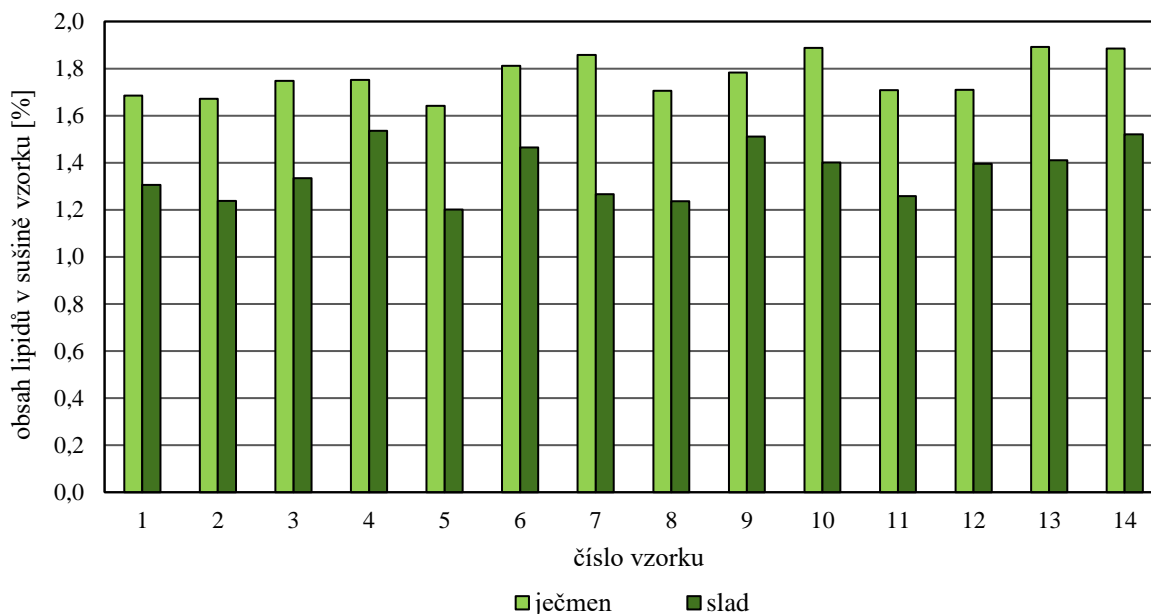
Graf 1 Ověření počtu cyklů extrakce

4.4 Stanovení obsahu lipidů v různých odrůdách ječmene a sladu

Metodou extrakce na fluidním loži přístrojem fexIKA® dive-in control byly vyextrahovány lipidy ze 14 vzorků ječmene a 14 vzorků z něj vyrobených sladů ze sklizně roku 2022. Výsledky obsahu lipidů v sušině udává Tabulka 5, grafické srovnání zobrazuje sloupcový Graf 2. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých měření, nejistota měření byla vypočtena z opakovatelnosti extrakce a je uvedena v Tabulka 3.

Tabulka 5 Obsah lipidů v odrůdách ječmene a sladu

odrůda	číslo vzorku	JEČMEN				SLAD			
		lipidy [g]	lipidy [%]	sušina [%]	lipidy v sušině [%]	lipidy [g]	lipidy [%]	sušina [%]	lipidy v sušině [%]
Bojos ¹	1	0,0727	1,45	86,30	1,68	0,0628	1,25	95,98	1,31
Bojos ²	2	0,0738	1,47	88,10	1,67	0,0599	1,19	96,41	1,24
Francin ¹	3	0,0773	1,54	88,10	1,75	0,0642	1,28	96,26	1,33
Francin ²	4	0,0768	1,53	87,30	1,75	0,0738	1,47	95,78	1,53
Laudis 550 ¹	5	0,0723	1,43	87,20	1,64	0,0577	1,15	96,10	1,20
Laudis 550 ²	6	0,0803	1,59	87,80	1,81	0,0708	1,41	96,51	1,46
LG Ester ¹	7	0,0821	1,64	88,00	1,86	0,0611	1,22	96,26	1,27
LG Ester ²	8	0,0757	1,51	88,60	1,71	0,0599	1,19	96,30	1,24
LG Stangast ¹	9	0,0770	1,54	86,40	1,78	0,0730	1,45	96,27	1,51
LG Stangast ²	10	0,0819	1,63	86,60	1,89	0,0680	1,35	96,53	1,40
Malz ¹	11	0,0749	1,50	87,70	1,71	0,0605	1,21	95,97	1,26
Malz ²	12	0,0752	1,50	88,00	1,71	0,0670	1,34	96,02	1,40
Manta ¹	13	0,0835	1,67	88,10	1,89	0,0680	1,35	96,05	1,41
Manta ²	14	0,0834	1,65	87,80	1,88	0,0734	1,47	96,39	1,52



Graf 2 Grafické porovnání obsahu lipidů v odrůdách ječmene a sladu

Obsah lipidů v sušině se u vzorků ječmene pohyboval v rozmezí 1,64–1,89 %. Tyto výsledky se shodují s hodnotami uváděnými v literatuře (1,64–2 % tuku v sušině metodou FBE – Olšovská et al. [16], $1,73 \pm 0,02$ % tuku v sušině metodou podle Soxhleta – Özcan et al. [63].) nebo jsou mírně nižší (1,78–2,1 % tuku v sušině metodou podle Soxhleta – Bravi et al. [18]), vyšší hodnoty 2,70–2,74 % uvádí Ighwela [64]. Všechny zmíněné metody používaly jako rozpouštědlo petrolether.

U vzorků sladu byl stanoven obsah lipidů v sušině v rozmezí 1,20–1,53 %. Výsledky se shodují s hodnotami uváděnými v literatuře ($1,52 \pm 0,03$ % tuku v sušině metodou podle Soxhleta – Bravi et al. [19]) nebo jsou opět o něco nižší (1,48–1,88 % tuku v sušině metodou podle Soxhleta – Bravi et al. [18]). Všechny zmíněné metody používaly jako rozpouštědlo petrolether. Metodou podle Folche (methanol + chloroform) Lordan et al. [65] dosáhli výsledku $0,7 \pm 0,1$ % lipidů ve sladu.

Z naměřených dat je patrný úbytek lipidů ve sladu oproti ječmeni, který mohl být způsobený jejich degradací při sladování. Snížení celkového množství lipidů souvisí s lipolytickou aktivitou během klíčení, při kterém je potřeba velké množství energie a stavebních látek. Významný úbytek lipidů představuje následné odklíčení sladu. Ztráty lipidů mohou být způsobeny také zvýšením aktivity LOX v počátcích hvozdění při teplotách do 60 °C, kde aktivita LOX vykazuje až 1,5násobek původní aktivity LOX v ječmeni [27]. Úbytek lipidů činil 12–32 %, jedná se o mírně vyšší hodnotu, než udává literatura (9–19 % Bravi et al. [18], 5–24 % Olšovská et al. [16], 23 % Kaukovirta-Norja et al. [27]). Vzhledem k aplikaci totožných [16] nebo podobných podmínek sladování [18] (studie [27] neuvádí teploty klíčení ječmene a hvozdění sladu), lze rozdílnost výsledků stanovení a hodnot uváděných v literatuře připisovat analýze odlišných odrůd ječmene. Orientačně se ale výsledky shodují. Zajímavé výsledky poskytuje článek Özcan et al. [63], kde byl zaznamenán nárůst procentuálního obsahu lipidů ve sladu oproti ječmeni o 12 %.

Průměrný obsah lipidů přepočtený na sušinu ječmene představoval $1,77 \pm 0,06$ %. Nejnižší obsah 1,64 % byl zaznamenán u odrůdy Laudis 550¹, nejvyšší obsah 1,89 % u odrůdy Manta¹.

Průměrný obsah lipidů přepočtený na sušinu sladu představoval $1,4 \pm 0,1$ %. Nejnižší obsah 1,20 % vykazovala odrůda Laudis 550¹, nejvyšší obsah 1,53 % odrůda Francin².

Největší úbytek lipidů během sladování byl zaznamenán u odrůdy LG Ester¹ (32% úbytek). Naopak nejnižší úbytek lipidů byl zaznamenán u odrůdy Francin², kde se jednalo o 12% úbytek.

4.5 Validační parametry GC-FID

Byla stanovena opakovatelnost, linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID. Pro stanovení opakovatelnosti byl použit vzorek ječmene č. 13 (Manta¹). Pro stanovení meze detekce, meze stanovitelnosti a linearity byl použit směsný standard methylesterů mastných kyselin Supelco 37 Component FAME mix, jehož složení a eluční pořadí jednotlivých methylesterů uvádí Příloha 1, chromatogram standardu je uveden v Příloha 2.

4.5.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost esterifikace byla ověřována na vzorku ječmene č. 13 (Manta¹). Měření bylo provedeno čtyřikrát. Výsledky vyjádřené jako procentuální obsah jednotlivých mastných kyselin ve vyextrahovaných lipidech a statistické zpracování uvádí Tabulka 6.

Nejistoty stanovení jednotlivých MK (FAME) byly v rozsahu 0,2 % až 24,2 %. Kyselina arachová se ve všech vzorcích vyskytovala ve velmi malém množství, konkrétně v 0,07–0,28% zastoupení, z tohoto důvodu mohou být výsledky zatíženy větší nejistotou měření. Obecně všechny MK, které byly zastoupeny minoritně, vykazovaly větší nejistotu měření.

Tabulka 6 Opakovatelnost metody

číslo analýzy	zastoupení [%]							
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 Δ^9	C18:2 $\Delta^{9,12}$	C20:0	C20:1 Δ^{11}	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$
1	0,26	24,60	1,47	15,67	53,51	0,13	3,32	1,05
2	0,28	24,56	1,54	15,29	53,58	0,17	3,40	1,18
3	0,28	24,46	1,41	15,43	53,60	0,17	3,64	1,05
4	0,27	24,75	1,42	15,43	53,50	0,15	3,35	1,14
průměr [%]	0,27	24,59	1,46	15,45	53,55	0,15	3,43	1,10
U [%]	0,02	0,23	0,12	0,31	0,10	0,04	0,29	0,13
RSD [%]	6,12	0,95	8,11	2,01	0,19	24,21	8,49	11,67

4.5.2 Linearita

Pro stanovení linearity byl použit směsný standard methylesterů mastných kyselin Supelco 37 Component FAME mix. Bylo pipetováno 5; 10; 25; 50 a 100 μ l tohoto standardu a doplněno isooktanem na objem 1 ml. Rozmezí koncentrací methylesterů mastných kyselin v takto připravených roztocích představovalo 1,0–60,1 μ g/ml.

Celkové koncentrace methylesterů mastných kyselin, které byly ve vzorcích analyzovány a jejich koncentrace po naředění roztoků pro kalibrační řadu jsou uvedeny v Tabulka 7.

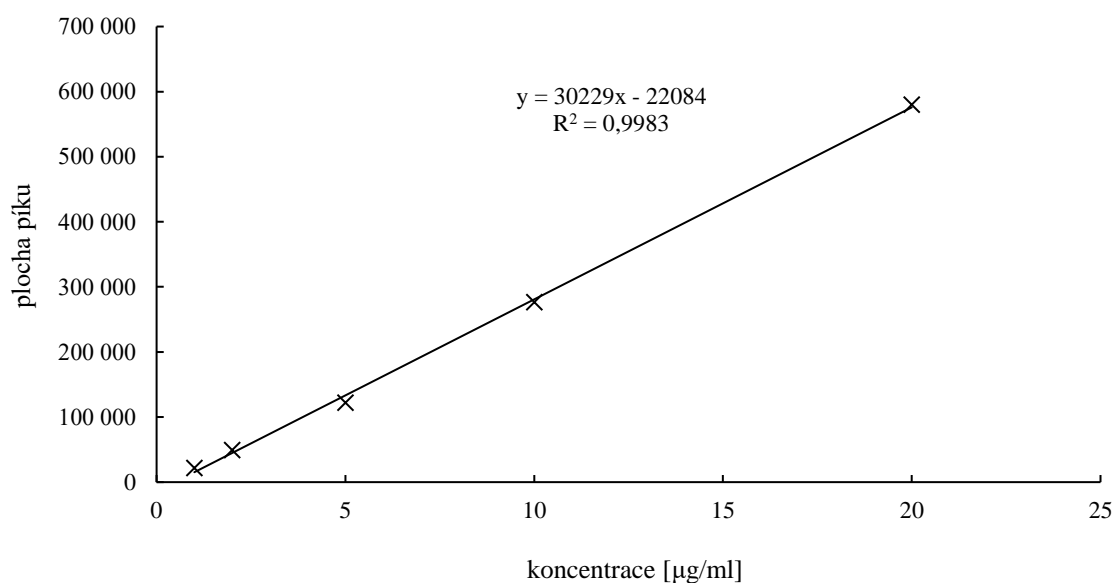
Tabulka 7 Koncentrace FAME ve standardu a v připravených roztocích kalibrační řady

mastná kyselina	popis molekuly	CFAME ve stand. [$\mu\text{g/ml}$]	st1	st2	st3	st4	st5
			CFAME v naředěných roztocích [$\mu\text{g/ml}$]				
myristová	C14:0	401 \pm 11	2,01	4,01	10,03	20,05	40,10
palmitová	C16:0	601 \pm 26	3,01	6,01	15,03	30,05	60,10
stearová	C18:0	200 \pm 10	1,00	2,00	5,00	10,00	20,00
olejová	C18:1 Δ^9	401 \pm 19	2,01	4,01	10,03	20,05	40,10
linolová	C18:2 $\Delta^{9,12}$	200 \pm 13	1,00	2,00	5,00	10,00	20,00
arachová	C20:0	401 \pm 22	2,01	4,01	10,03	20,05	40,10
cis-11-eikosenová	C20:1 Δ^{11}	200 \pm 11	1,00	2,00	5,00	10,00	20,00
α -linolenová	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	200 \pm 18	1,00	2,00	5,00	10,00	20,00

Ukázka naměřených dat pro methylestery kyseliny linolové v jednotlivých roztocích kalibrační řady je uvedena v Tabulka 8, jejich kalibrační křivka je zobrazena v Graf 3. Hodnoty spolehlivosti R^2 pro stanovení jednotlivých FAME jsou uvedeny v Tabulka 9.

Tabulka 8 Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky methylesterů kyseliny linolové

	c [$\mu\text{g/ml}$]	plocha píku
st1	1,0	11502
st2	2,0	49101
st3	5,0	114477
st4	10,0	276388
st5	20,0	586804



Graf 3 Kalibrační křivka kyseliny linolové – Závislost plochy píku na koncentraci

Tabulka 9 Hodnoty spolehlivosti pro jednotlivé FAME

mastná kyselina	popis molekuly	hodnota spolehlivosti R²
myristová	C14:0	0,9998
palmitová	C16:0	0,9994
stearová	C18:0	0,9990
olejová	C18:1 Δ^9	0,9989
linolová	C18:2 $\Delta^{9,12}$	0,9983
arachová	C20:0	0,9983
<i>cis</i> -11-eikosenová	C20:1 Δ^{11}	0,9963
α -linolenová	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	0,9970

Aby byla metoda vhodná pro kvantifikaci, korelační koeficient R² by neměl klesnout pod hodnotu 0,98 [61]. U měřených FAME se hodnota spolehlivosti pohybovala v rozmezí 0,9963–0,9998, tudíž lze říci, že linearita metody byla prokázána a metoda je vhodná pro kvantifikaci identifikovaných mastných kyselin.

4.5.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Ke stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti byly do výpočtu použity směrnice kalibračních křivek – závislosti výšky píků jednotlivých FAME na jejich koncentraci v roztocích kalibrační řady, spolu s výškou šumu na základní linii dle vztahů (8) a (9). Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti udává Tabulka 10.

Tabulka 10 Mez detekce a mez stanovitelnosti jednotlivých FAME

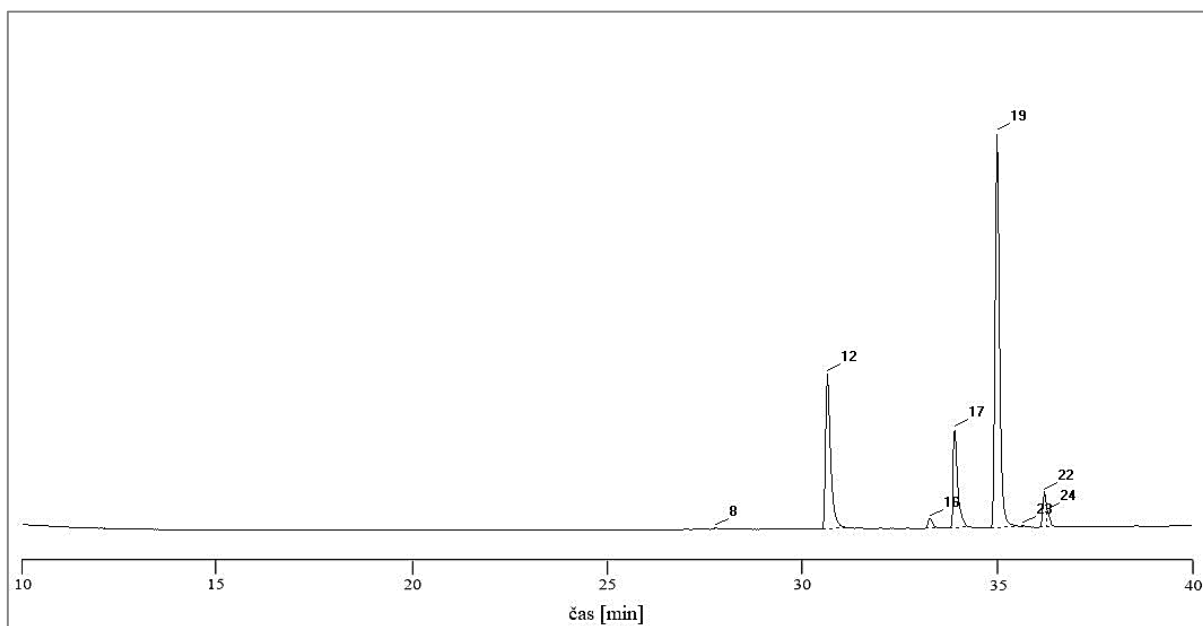
mastná kyselina	popis molekuly	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
myristová	C14:0	0,3	0,9
palmitová	C16:0	0,3	1,1
stearová	C18:0	0,1	0,3
olejová	C18:1 Δ^9	0,2	0,6
linolová	C18:2 $\Delta^{9,12}$	0,2	0,7
arachová	C20:0	0,2	0,6
<i>cis</i> -11-eikosenová	C20:1 Δ^{11}	0,2	0,7
α -linolenová	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	0,2	0,5

Ze stanovených hodnot vyplývá, že použitá metoda GC s FID detektorem je dostatečně citlivá pro stanovení mastných kyselin v obilkách ječmene a sladu.

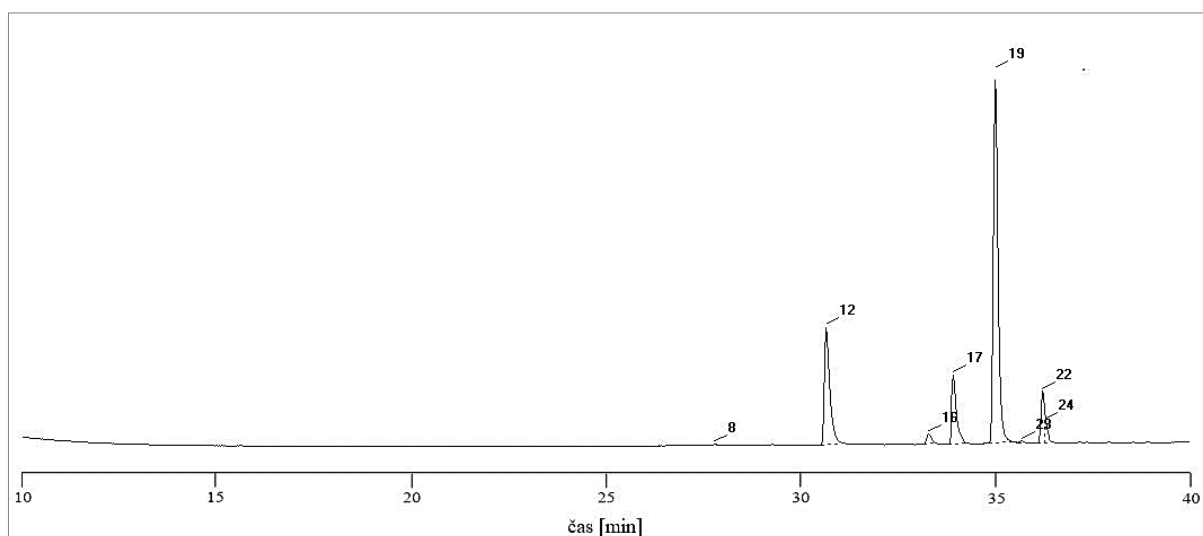
4.6 Stanovení obsahu mastných kyselin v různých odrůdách ječmene a sladu

Po esterifikaci a transesterifikaci triacylglycerolů vyextrahovaných lipidů následovala analýza methylesterů příslušných mastných kyselin metodou GC-FID. Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.4.2. Identifikace methylesterů mastných kyselin probíhala na základě porovnání jejich retenčních časů se standardem, jehož parametry jsou uvedeny v Příloha 1.

Metodou GC-FID s použitím kapilární kolony SLB-IL 100 (60 m x 0,25 mm x 0,2 µm) bylo ve vzorcích identifikováno a kvantifikováno 8 mastných kyselin s 14–20 atomy uhlíku v molekule jako jejich methylestery. Jednalo se o kyselinu myristovou, palmitovou, stearovou, olejovou, linolovou, *cis*-11-eikosenovou, arachovou a α -linolenovou. Získaná data byla vyhodnocena a kvantifikována jako relativní obsah jednotlivých mastných kyselin v programu Chrom-Card. Výsledky udává Tabulka 12. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých měření, nejistoty měření pro jednotlivé MK byly vypočteny z opakovatelnosti a jsou uvedeny v Tabulka 6. Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin v ječmeni a sladu udává Tabulka 11. Je uvedena ukázka naměřených dat – chromatogram vzorku ječmene odrůdy Bojos¹ (Obrázek 5) a chromatogram vzorku sladu odrůdy Bojos¹ (Obrázek 6).



Obrázek 5 Chromatogram vzorku ječmene odrůdy Bojos¹



Obrázek 6 Chromatogram vzorku sladu odrůdy Bojos¹

Při použití metody GC-FID autoři identifikovali srovnatelný počet mastných kyselin – Özcan et al. [63] ve vzorcích ječmene i sladu identifikovali 9 MK, Osman et al. [66] ve vzorcích ječmene identifikovali 9 MK, Bravi et al. [18] identifikovali ve vzorcích ječmene a sladu 12 MK, Bravi et al. [19] identifikovali ve vzorku sladu 13 MK. Všichni autoři identifikovali kyselinu myristovou, palmitovou, stearovou, olejovou, linolovou a α -linolenovou.

Identifikace vyššího počtu MK byla zaznamenána u autorů, kteří použili metodu GC-MS – Wijekoon et al. [67] v různých odrůdách ječmene identifikovali 15 MK, Lordan et al. [65] identifikovali ve vzorku sladu 16 MK.

Metoda GC-FID je díky vyšší citlivosti vhodnější pro kvantifikaci, kombinace GC-MS je díky vyšší selektivitě využívána spíše pro kvalitativní analýzu.

Ve vzorcích sladu byly identifikovány stejné MK jako ve vzorcích ječmene ve srovnatelných poměrech (viz Tabulka 11). Dostupné zdroje [11; 15; 18; 19; 63; 65; 66] se shodují v největším procentuálním zastoupení kyseliny linolové, která je následovaná kyselinou palmitovou a olejovou, ať už v ječmeni [11; 15; 66] či sladu [65; 67]. Naměřené hodnoty v této práci uvedeným údajům odpovídají.

V analyzovaných vzorcích byla v největším zastoupení **kyselina linolová**, jejíž obsah se pohyboval v rozmezí 51,14–55,21 % v ječmeni a 52,93–58,46 % ve sladu. Byla následovaná **kyselinou palmitovou** s obsahem 23,53–27,18 % v ječmeni a 20,12–25,38 % ve sladu a **kyselinou olejovou** s obsahem 14,25–16,63 % v ječmeni a 11,21–15,66 % ve sladu.

Literatura udává tyto hodnoty zastoupení analyzovaných MK: kyselina linolová 39,49–58,03 % v ječmeni [15; 18; 63; 66] a 57,67–60,65 % ve sladu [18; 19; 65], kyselina palmitová 18,42–19,38 % v ječmeni [18; 63] a 16,44–19,83 % ve sladu [18; 19; 65], kyselina olejová 12,93–22,40 % v ječmeni [18; 63; 66] a 9,04–12,57 % ve sladu [18; 19; 65].

Porovnáním výsledků mé práce s literaturou lze pozorovat vyšší relativní zastoupení kyseliny palmitové v analyzovaných vzorcích ječmene i sladu.

Méně zastoupena byla **kyselina cis-11-eikosenová** s obsahem 2,79–4,06 % v ječmeni a 3,18–6,27 % ve sladu a **kyselina stearová** s obsahem 1,17–1,55 % v ječmeni a 1,42–4,35 % ve sladu. Minoritně byla zastoupena **kyselina α -linolenová** s obsahem 0,82–1,75 % v ječmeni a 1,02–1,60 % ve sladu. Ve stopových množstvích se pohyboval obsah **kyseliny myristové** (0,11–0,32 % v ječmeni a 0,09–0,25 % ve sladu) a **kyseliny arachové** (0,07–0,16 % v ječmeni a 0,12–0,28 % ve sladu).

U naměřených hodnot těchto méně zastoupených MK jsou viditelné odchylky oproti hodnotám udávaným v literatuře: kyselina cis-11-eikosenová 0,18–0,26 % v ječmeni [18] a 0,26–0,56 % ve sladu [18; 19], kyselina stearová 1,03–1,85 % v ječmeni [18; 63] a 1,25–2,26 % ve sladu [18; 19; 65], kyselina α -linolenová 0,97–8,55 % v ječmeni [18; 63; 66] a 6,80–9,34 % ve sladu [18; 19; 65], kyselina myristová 0,14–0,48 % v ječmeni [18; 63] a 0,16–0,62 % ve sladu [18; 19; 65], kyselina arachová 0,31 % v ječmeni [63] a 0,45–0,58 % ve sladu [63; 65].

Uvedené výsledky ale nelze porovnávat absolutně, jelikož jsou vyjádřeny jako relativní zastoupení MK a liší se vzhledem ke skutečnosti detekce rozdílných počtů MK v jednotlivých publikacích. Publikace se od sebe odlišují použitou metodou esterifikace, výběrem kolony k separaci FAME a zvoleným způsobem jejich detekce. Je také nutné přihlídnout k analýze odlišných odrůd ječmene, respektive sladu. Přestože hodnoty obsahu různých mastných kyselin

v diskutovaných pracích vykazují určitou variabilitu, lze pozorovat shodu v pořadí MK od majoritně k minoritně zastoupeným a obecně lze říci, že byly detekovány běžně se vyskytující MK v obvyklém zastoupení.

Tabulka 11 Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích ječmene a sladu

mastná kyselina	popis molekuly	zastoupení [%]	
		ječmen	slad
myristová	C14:0	0,11–0,32	0,09–0,25
palmitová	C16:0	23,53–27,18	20,12–25,38
stearová	C18:0	1,17–1,55	1,42–4,35
olejová	C18:1 Δ^9	14,25–16,63	11,21–15,66
linolová	C18:2 $\Delta^{9,12}$	51,14–55,21	52,93–58,46
arachová	C20:0	0,07–0,16	0,12–0,28
<i>cis</i> -11-eikosenová	C20:1 Δ^{11}	2,79–4,06	3,18–6,27
α -linolenová	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	0,82–1,75	1,02–1,60

Kyselinu arachovou identifikovali pouze Özcan et al. [63] a Lordan et al. [65]. Použili kapilární kolonu se stacionární polysiloxanovou fází substituovanou kyanopropylem. Lordan et al. podrobili esterifikaci za použití roztoku KOH v methanolu pouze frakci polárních lipidů. Identifikace a kvantifikace probíhala metodou GC-MS. Özcan et al. aplikovali esterifikaci vyextrahovaných lipidů za použití BF₃ jako katalyzátoru v kombinaci s metodou GC-FID. Vzhledem k tomu, že Bravi et al. [63] použili kapilární kolonu se stejnou stacionární fází jako Özcan et al. i Lordan et al. a kyselina arachová v jejich studii nebyla detekována, přestože za použití kapilární kolony SLB-IL 100 s odlišnou stacionární fází detekována byla, s volbou kolony výsledky nesouvisí. Nesouvisí ani s použitou metodou esterifikace, jelikož Özcan et al. aplikovali katalýzu BF₃ a Lordan et al. aplikovali ve své práci stejně jako já alkalickou esterifikaci s použitím KOH. Volba metody identifikace a kvantifikace také nemá vliv, jelikož kyselina byla detekována jak při použití metody GC-FID, tak při použití metody GC-MS.

Kyselina *cis*-11-eikosenová byla identifikována pouze u autorů, kteří použili k separaci FAME kolonu se stacionární polysiloxanovou fází substituovanou kyanopropylem a metodu esterifikace za použití KOH v methanolu. K identifikaci a kvantifikaci FAME použili Bravi et al. [18], [19] metodu GC-FID, Lordan et al. [65] metodu GC-MS. Vzhledem k identifikaci kyseliny *cis*-11-eikosenové i při použití odlišné stacionární fáze kapilární kolony SLB-IL 100 lze říci, že přítomnost této kyseliny přímo nesouvisí s výběrem stacionární fáze kapilární kolony, na které probíhá separace FAME, ani s volbou metody identifikace a kvantifikace FAME.

Ze skutečnosti, že přítomnost kyseliny arachové nezávisí na zvolené metodě esterifikace a s přihlédnutím k výsledkům v kapitole 4.6.2, nemá přítomnost kyseliny *cis*-11-eikosenové souvislost ani se zvoleným způsobem esterifikace. Jelikož ve studii [65] byla kyselina *cis*-11-eikosenová přítomna pouze v analyzovaných vzorcích chmele a ve sladu nebyla detekována, lze se domnívat, že je přítomnost kyseliny *cis*-11-eikosenové stejně jako přítomnost kyseliny arachové závislá na odrůdě ječmene, respektive souvisí s místem původu, podmínkami pěstování a ročníkem sklizně.

Tabulka 12 Průměrný procentuální obsah jednotlivých mastných kyselin v analyzovaných odrůdách ječmene a sladu

Odrůda		MK [%]							
		C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 Δ^9	C18:2 $\Delta^{9,12}$	C20:0	C20:1 Δ^{11}	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$
Bojos ¹	ječmen	0,15	23,96	1,37	15,08	54,43	0,11	3,86	1,04
	slad	0,11	21,00	1,65	11,80	57,50	0,14	6,27	1,53
Bojos ²	ječmen	0,15	25,15	1,40	16,14	52,90	0,07	3,05	1,15
	slad	0,23	24,96	1,44	15,66	53,11	0,15	3,19	1,27
Francin ¹	ječmen	0,13	23,83	1,40	15,22	54,71	0,08	3,61	1,04
	slad	0,25	24,66	1,55	15,42	53,56	0,14	3,34	1,08
Francin ²	ječmen	0,22	23,68	1,36	16,63	53,43	0,11	3,38	1,19
	slad	0,14	22,22	1,66	14,24	55,49	0,12	4,82	1,31
Laudis 550 ¹	ječmen	0,17	26,09	1,27	14,37	52,76	0,07	3,94	1,32
	slad	0,18	23,16	1,69	11,34	56,38	0,19	5,45	1,60
Laudis 550 ²	ječmen	0,32	26,28	1,55	15,86	51,14	0,11	3,21	1,53
	slad	0,18	25,38	4,35	11,21	52,93	0,12	4,77	1,06
LG Ester ¹	ječmen	0,23	25,38	1,17	15,09	53,53	0,09	3,28	1,24
	slad	0,25	22,74	1,56	12,52	56,25	0,21	4,89	1,57
LG Ester ²	ječmen	0,11	24,22	1,21	14,25	54,77	0,10	4,06	1,28
	slad	0,22	22,25	1,49	11,69	57,23	0,21	5,43	1,49
LG Stamgast ¹	ječmen	0,15	24,11	1,51	14,71	54,83	0,14	2,79	1,75
	slad	0,21	22,51	4,04	11,88	54,90	0,20	4,94	1,32
LG Stamgast ²	ječmen	0,28	27,18	1,36	15,08	51,92	0,09	3,28	0,82
	slad	0,16	23,38	1,74	12,87	55,86	0,12	4,85	1,02
Malz ¹	ječmen	0,24	24,82	1,51	15,40	53,41	0,16	3,47	0,99
	slad	0,09	20,12	2,06	12,20	58,46	0,23	5,48	1,36
Malz ²	ječmen	0,11	23,53	1,48	14,74	55,21	0,11	3,51	1,30
	slad	0,13	20,92	4,19	11,71	55,72	0,28	5,97	1,09
Manta ¹	ječmen	0,26	24,60	1,47	15,67	53,51	0,13	3,32	1,05
	slad	0,17	22,91	1,83	13,54	55,69	0,15	4,45	1,26
Manta ²	ječmen	0,18	25,74	1,49	15,06	52,90	0,13	2,89	1,62
	slad	0,25	25,09	1,42	15,57	53,26	0,15	3,18	1,08

Obsah **kyseliny myristové** se u vzorků ječmene pohyboval v rozmezí 0,11–0,32 %. Nejnižší obsah této kyseliny vykazovala odrůda ječmene Malz², nejvyšší obsah poté odrůda Laudis 550². Kyselina myristová byla označena jako kyselina, jejíž obsah je velmi ovlivněn zeměpisným původem a odrůdou ječmene [16]. Dvojice zástupců odrůd se v obsahu této kyseliny lehce lišily. Identický obsah byl zaznamenán pouze u odrůdy Bojos, kde v obou vzorcích, které byly vypěstovány ve stejném okrese, tvořil obsah kyseliny myristové 0,15 %. Největší rozdíl byl zaznamenán u odrůdy Laudis 550, kde lze rozdílný obsah této minoritně zastoupené MK připisovat původu ječmene, kdy Laudis 550¹ byl vypěstován v okrese Olomouc, zatímco Laudis 550² v okrese Kolín. U odrůdy LG Ester, jejíž zástupci byli vypěstováni v okresech Bruntál a Hradec Králové nebyl zaznamenán tak velký rozdíl jako u odrůdy Laudis 550. Z tohoto důvodu nelze z dosažených výsledků jednoznačně potvrdit závislost této kyseliny na zeměpisném původu a odrůdě. U vzorků sladu se obsah kyseliny myristové pohyboval v rozmezí 0,09–0,25 %. Nejnižší obsah této kyseliny vykazoval slad odrůdy Malz¹, nejvyšší obsah vykazovaly slady odrůd Francin¹, LG Ester¹ a Manta².

Kyselina palmitová byla ve vzorcích ječmene v relativním zastoupení 23,53–27,18 %. Nejnižší obsah této kyseliny vykazovala odrůda ječmene Malz², nejvyšší obsah odrůda LG Stamgast². Podobné obsahy kyseliny palmitové vykazovali oba zástupci odrůdy Francin – Francin¹ 23,83 %, Francin² 23,68 %. Nejvíce se v obsahu kyseliny palmitové lišily vzorky odrůdy LG Stamgast, kdy odrůda LG Stamgast¹ obsahovala 24,11 % a odrůda LG Stamgast² obsahovala 27,18 % této kyseliny. Ve vzorcích sladu se její obsah pohyboval v rozmezí 20,12–25,38 %. Nejméně byla kyselina palmitová zastoupena ve sladu odrůdy Malz¹, nejvíce poté ve sladu odrůdy Laudis².

Obsah **kyseliny stearové** se ve vzorcích ječmene pohyboval v rozmezí 1,17–1,55 %. Nejnižší obsah vykazovala odrůda ječmene LG Ester¹, nejvyšší obsah odrůda Laudis 550². Dvojice zástupců odrůd se v obsahu této kyseliny lišily jen nepatrně, větší rozdíl byl zaznamenán pouze u zástupců odrůdy Laudis 550. U vzorků sladu se obsah kyseliny stearové pohyboval v rozmezí 1,42–4,35 %. Největší rozdíl v obsahu této kyseliny (2,66 %) byl zaznamenán opět u dvojice sladů odrůdy Laudis 550. Obzvláště vysokým obsahem kyseliny stearové ve sladu se vyznačovaly odrůdy Laudis 550² (4,35 %), LG Stamgast¹ (4,04 %) a Malz² (4,19 %).

V zastoupení 14,25–16,63 % byla ve vzorcích ječmene stanovena **kyselina olejová**. Nejnižší obsah vykazovala odrůda ječmene LG Ester², nejvyšší obsah odrůda Francin². Ve vzorcích sladu bylo zastoupení této kyseliny v rozmezí 11,21–15,66 %. Nejméně byla kyselina olejová zastoupena ve sladu odrůdy Laudis 550², vysoký obsah olejové kyseliny vykazovaly slady odrůd Bojos², Francin¹ a Manta². Největší rozdíl v obsahu kyseliny olejové ve sladu byl zaznamenán u zástupců odrůdy Bojos, kde rozdíl v obsahu této kyseliny představoval 3,86 %.

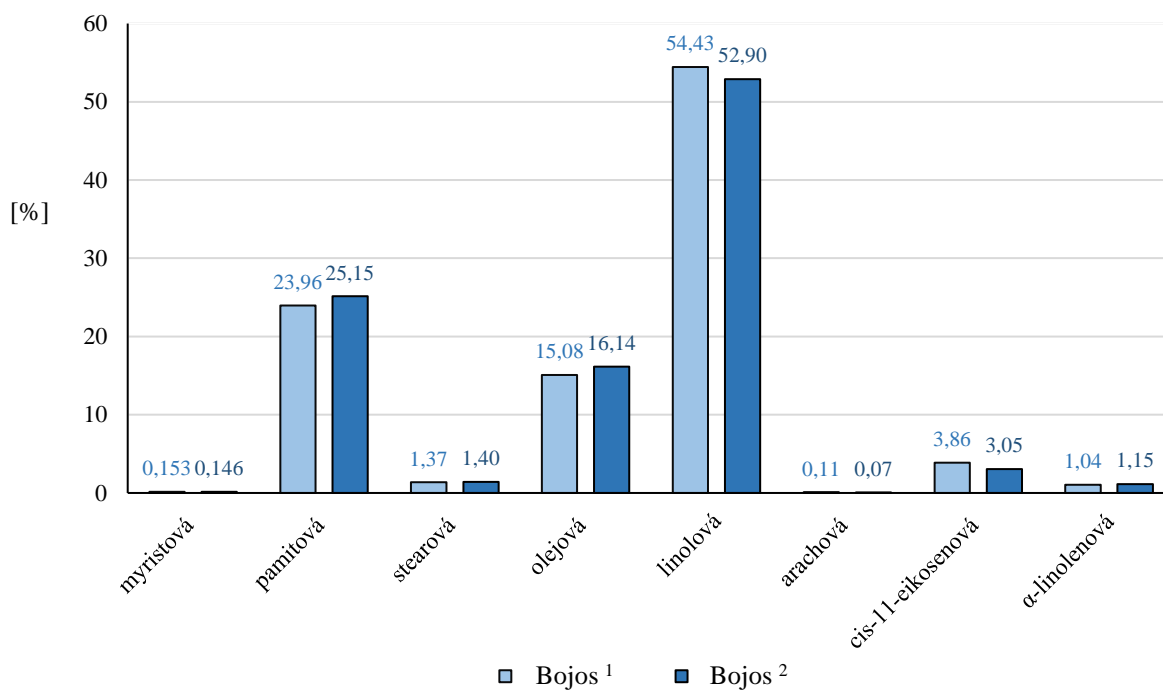
Obsah **kyseliny linolové** se v ječmeni pohyboval v rozmezí 51,14–55,21 %. Nejnižší obsah této kyseliny byl zaznamenán u odrůdy ječmene Laudis 550², nejvyšší obsah u odrůdy Malz². Nejvíce se v obsahu kyseliny linolové lišili zástupci odrůdy LG Stamgast, kde rozdíl představoval 2,92 % obsahu, ale vzhledem k majoritnímu zastoupení této MK je jeho hodnota zanedbatelná. Ve vzorcích sladu se obsah kyseliny linolové pohyboval v rozmezí 52,93–58,46 %. Zajímavé výsledky poskytuje opět odrůda LG Stamgast, kdy v případě sladu byl ve vzorcích zaznamenán naopak nejmenší rozdíl v obsahu této kyseliny.

Kyselina arachová představovala se svým 0,07–0,16% obsahem v ječmeni minoritně zastoupenou MK. Nejmenší obsah vykazovaly odrůdy ječmene Bojos² a Laudis 550¹, největší obsah poté odrůda ječmene Malz¹. Dvojice zástupců odrůd se v obsahu této kyseliny nepatrně lišily. Identický obsah byl zaznamenán pouze u odrůdy Manta, kde v obou vzorcích tvořil obsah kyseliny arachové 0,13 %. Vzorke sladu obsahovaly kyselinu arachovou v rozmezí 0,12–0,28 %. Po sladování se dvojice zástupců odrůd, stejně jako v případě ječmene, lišily v obsahu této kyseliny jen nepatrně.

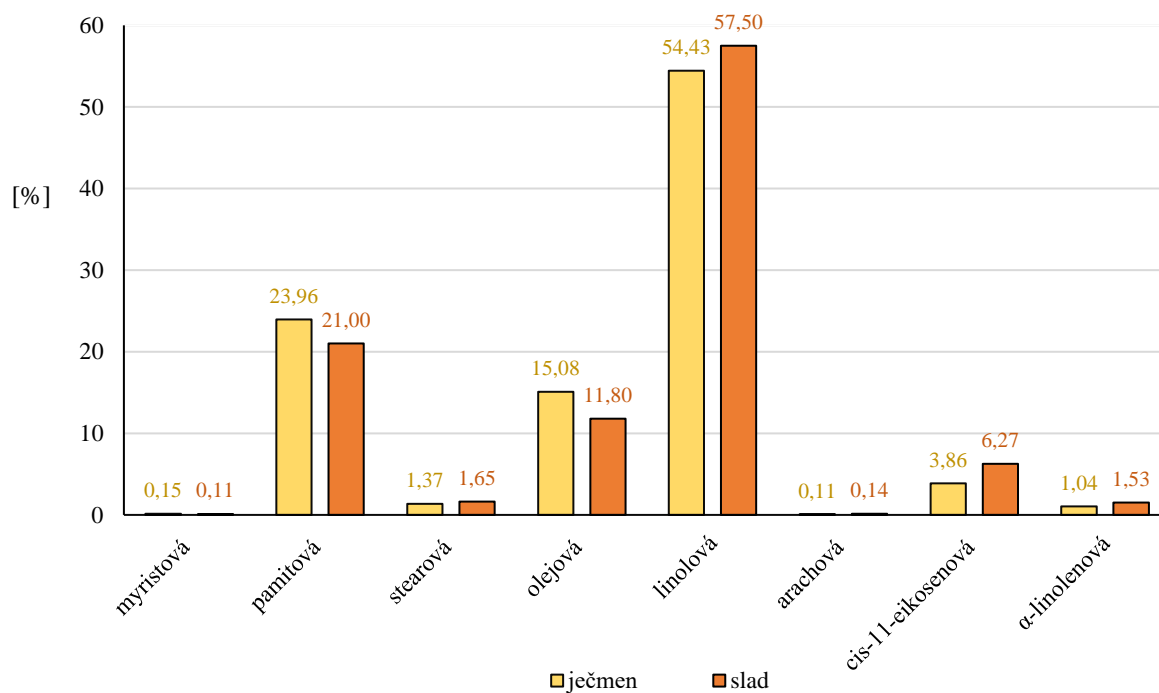
Obsah **kyseliny cis-11-eikosenové** se v ječmeni pohyboval v rozmezí 2,79–4,06 %. Nejnížší obsah této kyseliny byl zaznamenán u ječmene odrůdy LG Stamgast¹, nejvyšší obsah u ječmene odrůdy LG Ester². Ve vzorcích sladu bylo zastoupení této kyseliny 3,18–6,27 %. Nejméně byla kyselina cis-11-eikosenová zastoupena ve sladu odrůd Bojos², Francin¹ a Manta². Největší rozdíl v obsahu kyseliny cis-11-eikosenové ve sladu byl zaznamenán u zástupců odrůdy Bojos, kde rozdíl v obsahu této kyseliny představoval 3,08 %.

V zastoupení 0,82–1,75 % byla ve vzorcích ječmene stanovena **kyselina α -linolenová**. Stejně jako v případě kyseliny linolové se v obsahu kyseliny α -linolenové nejvíce lišili zástupci ječmene odrůdy LG Stamgast, kde rozdíl představoval 0,93 % obsahu. Tato hodnota přímo odpovídá rozdílu mezi nejnížším a nejvyšším zjištěným obsahem této kyseliny ve vzorcích ječmene. V případě sladu byla tato kyselina v 1,02–1,60% zastoupení. Její nejnížší obsah byl naměřen ve vzorku sladu odrůdy LG Stamgast², nejvyšší obsah poté ve vzorku sladu odrůdy Laudis 550¹.

Je uvedena ukázka naměřených dat – grafické porovnání obsahu mastných kyselin dvou zástupců ječmene odrůdy Bojos (Graf 4) a grafické porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích ječmene a sladu odrůdy Bojos¹ (Graf 5).



Graf 4 Porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích ječmene odrůdy Bojos¹ a Bojos²



Graf 5 Porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích ječmene a sladu odrůdy Bojos¹

4.6.1 Změny relativního zastoupení mastných kyselin způsobené procesem sladování

V důsledku procesu sladování byly zaznamenány změny v procentuálním obsahu jednotlivých mastných kyselin. Grafické porovnání obsahu mastných kyselin ve všech odrůdách ječmene a z něj vyrobeného sladu je uvedeno v Příloha 3.

U **kyseliny palmitové** byl zaznamenán pokles v případě 13 vzorků, pouze u odrůdy Francin¹ došlo k nárůstu procentuálního obsahu této kyseliny o 3,5 %. Bylo zaznamenáno vyšší procentuální zastoupení **kyseliny stearové** ve sladu, opět se jednalo o 13 vzorků, pouze u odrůdy Manta² bylo ve sladu zaznamenáno snížení obsahu této kyseliny o 4,7 %. Obsah **kyseliny linolové** se sladováním zvyšoval u 13 vzorků, odrůda Francin¹ opět vykazovala opačný trend a kyselina linolová byla ve sladu odrůdy Francin¹ v nižším zastoupení. Obsah **kyseliny olejové** se sladováním snižoval, tomuto trendu neodpovídaly pouze odrůdy Francin¹ a Manta². V průběhu sladování, které probíhalo za téměř totožných podmínek, jaké jsou uvedeny v Tabulka 1, zaznamenali Özcan et al. [63] a Bravi et al. [18] procentuální nárůst kyseliny linolové a stearové a pokles v zastoupení kyseliny olejové a palmitové. Kaukovirta-Norja et al. [27] uvádí nárůst procentuálního obsahu kyseliny linolové a pokles procentuálního obsahu kyseliny olejové, palmitové a stearové – tato studie ale neuvádí teploty klíčení ječmene a hvozdění sladu, takže není vhodná pro porovnání dosažených výsledků. Změny v obsahu kyseliny palmitové, olejové a linolové ve vzorcích ječmene a sladu odrůdy Francin¹ neodpovídaly údajům uvedeným v těchto studiích. Totéž platí pro změny v obsahu stearové a olejové kyseliny u vzorků ječmene a sladu odrůdy Manta². Ostatní odrůdy vykazovaly stejné změny uvedených MK, jako udávají studie [18; 63].

U **kyseliny arachové** byl zaznamenán jednotný trend nárůstu procentuálního obsahu v důsledku sladovacího procesu. Také Özcan et al. [63] pozorovali nárůst procentuálního obsahu této kyseliny. Procentuální obsah **kyseliny cis-11-eikosenové** se sladováním zvýšil, tomuto trendu neodpovídala pouze odrůda Francin¹. Bravi et al. [18] zaznamenali stejný procentuální obsah nebo mírný nárůst procentuálního obsahu této kyseliny. U **kyseliny α -linolenové** byl zaznamenán spíše nárůst procentuálního zastoupení, pouze 4 vzorky vykazovaly pokles v obsahu této kyseliny. Dostupné zdroje se ve změnách obsahu α -linolenové kyseliny neshodují. Kaukovirta-Norja et al. [27] nepozorovali během procesu sladování žádné změny, Bravi et al. [18] zaznamenali pokles i nárůst obsahu, Anness [28] a Özcan et al. [63] pozorovali snížení obsahu a Olšovská et al. [16] zaznamenali výrazný nárůst koncentrace α -linolenové kyseliny. **Kyselina myristová** jako jediná detekovaná MK nevykazovala převážně jednotný trend ve změně relativního obsahu, 6 vzorků vykazovalo pokles a 8 vzorků nárůst procentuálního obsahu této kyseliny. Literatura [18; 63] udává téměř totožné zastoupení kyseliny myristové v ječmeni a sladu.

Ighwela [64] uvádí jako majoritní kyseliny přítomné v ječmeni a sladu kyselinu γ -linolenovou a linolelaidovou (*trans*). V ječmeni nedetekoval kyselinu stearovou, zatímco ve sladu její zastoupení představovalo 18,47 %. Výsledky se v porovnání s jinými autory zcela liší. Byly aplikovány jiné podmínky sladování, kdy klíčení probíhalo při vyšších teplotách (28 °C) oproti obvyklým 14–16 °C a sušení sladu probíhalo pouze při 45 °C bez aplikace dotahovacích teplot. Porovnáním výsledků této studie s dosaženými výsledky a údaji, které poskytují studie [18; 27; 63] se zdá, že podmínky sladování mohou ovlivňovat profil MK sladu.

Kaukovirta-Norja et al. [27] ale uvádí, že změny lipidů v průběhu sladování jsou pravděpodobně v porovnání s odlišností odrůd a místem pěstování zanedbatelné.

Vzhledem k nevelkému významu lipidů při výrobě piva nejsou dostupné výsledky analýz profilu MK odrůd ječmene analyzovaných v mé práci, a tak nelze dosažené výsledky porovnat. Všechny vzorky ječmene byly sladovány stejným postupem za definovaných podmínek. Přesto byly u dvou vzorků ječmene a z něj vyrobeného sladu odlišných odrůd pozorovány změny v relativním obsahu některých MK, které u ostatní analyzovaných vzorků nenastaly.

Protože jsou obsahy MK udávány v relativním zastoupení, nelze určit, zda množství konkrétní MK v průběhu sladování stoupá či naopak klesá. Zajímavý je i nárůst relativního obsahu kyseliny linolové případně linolenové, které by s přihlédnutím k jejich struktuře a poznatkům uvedeným v literatuře měly podléhat oxidačním reakcím katalyzovaným přítomností kyslíku nebo účinkem lipoxygenas a jejich obsah by tak měl v průběhu sladování klesat. Proto byly pomocí rovnic (3-7) vypočteny hmotnostní koncentrace mastných kyselin v mg/g vyextrahovaného tuku. Vypočtené hodnoty udává Tabulka 13.

Ani vypočtené hodnoty v mg/g vyextrahovaného tuku nevykazovaly jednotný trend poklesu/nárůstu jednotlivých MK. Proto lze usuzovat na složitost dějů, které při sladování mohou probíhat. Jedná se například o metabolické pochody v obilkách při klíčení (syntéza a β -oxidace MK), ale i řadu degradačních reakcí MK způsobených jejich oxidací nebo působením vyšších teplot při hvozdění. V důsledku působení lipas dochází při klíčení k uvolňování MK, které jsou postupně odbourávány. Lze předpokládat odbourání až na acetyl-CoA, jelikož ve vzorcích sladu nebyly detekovány MK s nižším počtem atomů uhlíku v molekule, než má kyselina myristová. Pokud v průběhu klíčení docházelo k odbourávání vyšších MK na MK s kratším uhlíkatým řetězcem, mohly být tyto následně prodýchány, konvertovány na jiné sloučeniny nebo degradovány v průběhu hvozdění v důsledku působení vyšších teplot.

Nelze opomenout také probíhající enzymatické pochody. V průběhu hvozdění při teplotách do 60 °C totiž ještě probíhají enzymatické reakce, které mohou zapříčinit ztráty lipidů a MK [27], změny v profilu mastných kyselin proto mohou nastávat i tady. Jelikož teplota hvozdění nepřesáhla 80 °C, lze v hotovém sladu předpokládat výskyt lipoxygenas, které mohly být v průběhu uskladnění sladu aktivní, a tudíž mohlo dojít ke změnám profilu MK nejen v průběhu sladování, ale i v průběhu uskladnění hotového výrobku. Pro detailnější popis dějů, které při procesu sladování probíhají, by bylo nutné sledovat profil MK v průběhu sladování, případně měřit i aktivitu lipoxygenas.

Tabulka 13 Průměrná koncentrace jednotlivých mastných kyselin ve vyextrahovaných lipidech analyzovaných odrůd ječmene a sladu

Odrůda		MK [mg/g tuku]							
		C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 Δ^9	C18:2 $\Delta^{9,12}$	C20:0	C20:1 Δ^{11}	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$
Bojos ¹	ječmen	1,85	144,68	5,61	108,69	387,10	3,33	40,31	9,04
	slad	1,65	104,02	5,70	70,75	331,50	3,74	52,47	10,73
Bojos ²	ječmen	1,52	103,67	4,25	79,75	255,32	2,77	22,93	7,18
	slad	2,62	163,98	6,51	122,91	410,59	4,32	37,11	11,82
Francin ¹	ječmen	1,65	147,55	5,75	112,32	399,42	2,95	38,61	9,13
	slad	2,73	170,63	7,07	127,29	436,77	4,11	40,41	10,72
Francin ²	ječmen	2,12	134,53	5,27	112,36	357,33	3,16	33,57	9,52
	slad	1,39	75,56	4,14	58,38	218,77	2,95	28,71	6,82
Laudis 550 ¹	ječmen	1,72	121,05	4,35	80,26	287,51	2,90	32,14	8,86
	slad	2,08	116,10	5,98	69,37	329,44	4,38	46,93	11,45
Laudis 550 ²	ječmen	2,19	112,34	4,61	81,26	256,99	2,83	24,58	9,19
	slad	1,65	98,44	10,11	53,37	239,92	3,14	32,35	6,53
LG Ester ¹	ječmen	1,57	82,49	3,08	59,14	203,09	2,53	19,52	6,17
	slad	2,22	102,64	5,15	68,56	295,43	4,16	38,41	10,23
LG Ester ²	ječmen	1,58	147,35	5,10	103,61	392,75	3,20	42,43	10,77
	slad	2,20	111,54	5,39	71,17	334,24	4,34	46,68	10,71
LG Stamgast ¹	ječmen	1,52	102,23	4,54	74,88	272,25	3,10	21,66	10,24
	slad	1,95	109,47	11,55	69,84	312,57	3,72	41,13	9,18
LG Stamgast ²	ječmen	1,73	90,57	3,48	60,70	202,62	2,55	20,00	4,72
	slad	1,55	80,85	4,45	54,23	223,88	3,14	29,51	5,89
Malz ¹	ječmen	2,28	144,02	5,83	106,69	365,15	3,60	35,11	8,42
	slad	1,77	138,82	8,98	100,94	472,34	5,14	63,70	12,94
Malz ²	ječmen	1,36	100,78	4,53	75,76	276,65	3,02	26,77	8,13
	slad	1,97	161,15	18,42	108,06	505,32	5,58	76,82	11,72
Manta ¹	ječmen	2,16	126,79	5,06	95,15	325,06	3,09	30,35	8,44
	slad	1,62	84,77	4,85	60,70	239,22	3,32	29,10	7,19
Manta ²	ječmen	1,67	124,82	4,90	87,38	302,15	2,98	25,06	10,65
	slad	2,22	132,66	5,20	98,44	331,32	3,49	29,87	8,37

4.6.2 Porovnání metody alkalické a kyselé esterifikace pro přípravu FAME

V rámci stanovení zastoupení mastných kyselin v analyzovaných vzorcích byly porovnány dvě metody přípravy methylesterů mastných kyselin. Byla provedena alkalická a kyselá esterifikace, vždy pro 4 navážky vyextrahovaného tuku ze vzorku ječmene č. 13 (Manta¹). Průměrný procentuální obsah jednotlivých mastných kyselin, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky udává Tabulka 14.

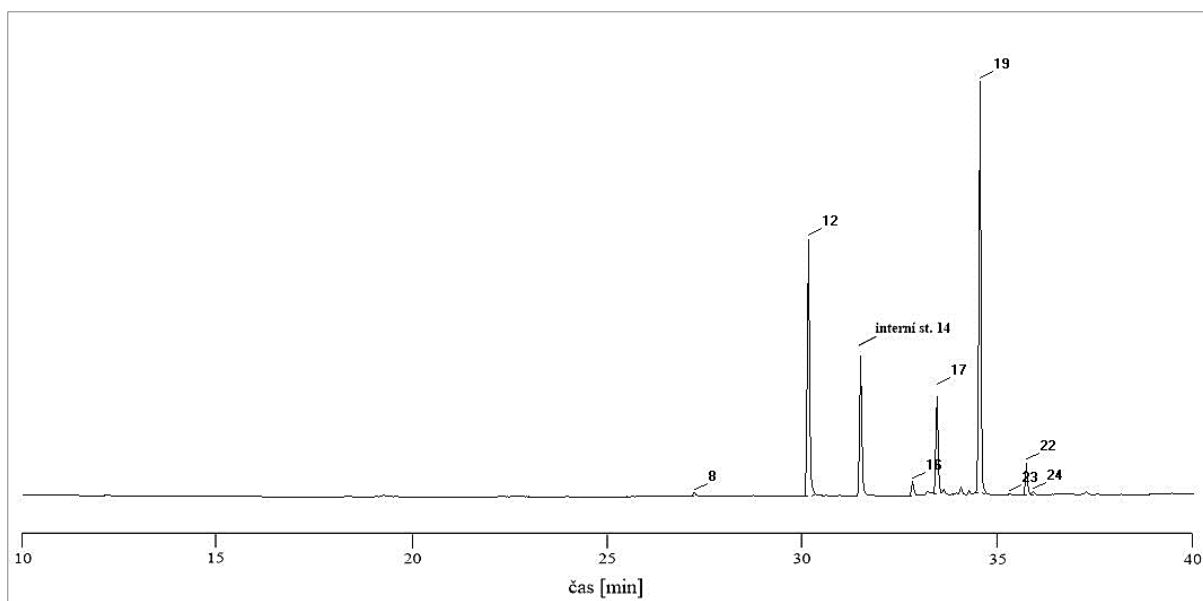
Tabulka 14 Výsledky porovnání alkalické a kyselé esterifikace

kyselá esterifikace vyextrahovaných lipidů								
	zastoupení MK (FAME) [%]							
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 Δ^9	C18:2 $\Delta^{9,12}$	C20:0	C20:1 Δ^{11}	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$
průměr [%]	0,63	30,10	1,86	12,60	50,33	0,13	3,89	0,47
U [%]	0,12	5,16	0,31	0,59	4,67	0,03	0,66	0,11
RSD [%]	19,05	17,15	16,83	4,65	9,27	24,67	17,01	24,36
alkalická esterifikace vyextrahovaných lipidů								
	Zastoupení MK (FAME) [%]							
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 Δ^9	C18:2 $\Delta^{9,12}$	C20:0	C20:1 Δ^{11}	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$
průměr [%]	0,27	24,59	1,46	15,45	53,55	0,15	3,43	1,10
U [%]	0,02	0,23	0,12	0,31	0,10	0,04	0,29	0,13
RSD [%]	6,12	0,95	8,11	2,01	0,19	24,21	8,49	11,67

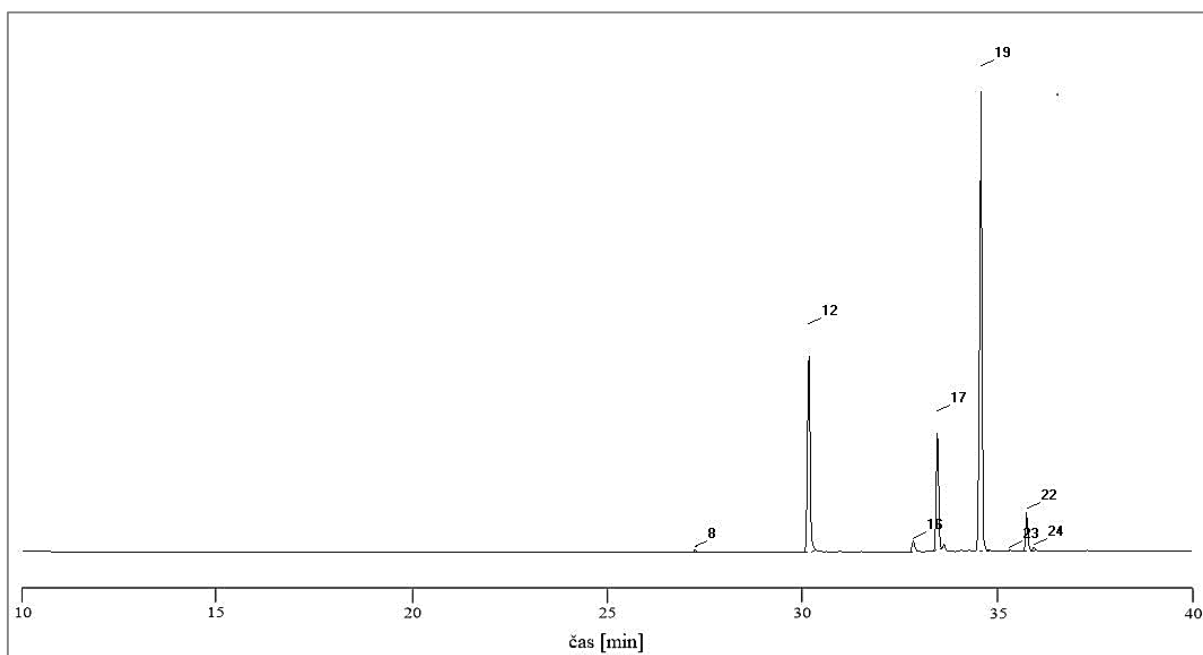
Byly identifikovány stejné mastné kyseliny (viz Obrázek 7 a Obrázek 8) ve srovnatelných poměrech s drobnými odchylkami. Rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých mastných kyselin mohly být způsobeny typem použité esterifikace, kdy při kyselé katalýze dochází jak k esterifikaci volných MK, tak i k transesterifikaci vázaných MK, zatímco při alkalické katalýze jsou transesterifikovány pouze vázané mastné kyseliny.

Olšovská et al. [16] provedli dvě metody esterifikace, aby pokryli esterifikaci jak volných, tak vázaných MK ve vzorcích ječmene. V obou případech aplikovali esterifikaci za použití methanolického roztoku BF₃. U kombinované metody esterifikace byl před kyselou katalýzou BF₃ aplikován přídavek methanolického roztoku KOH. Pokud byl zařazen krok s přídávkem methanolického roztoku KOH, některé minoritní MK vykazovaly významný procentuální nárůst. Jednalo se o MK, které v mé práci nebyly detekovány. U majoritně zastoupených MK nebyly při porovnání těchto dvou metod pozorovány významné rozdíly v jejich relativním zastoupení.

Z dosažených výsledků a poznatků článku [16] vyplývá, že obě použité metody jsou vhodné pro stanovení profilu mastných kyselin v obilkách ječmene a sladu.



Obrázek 7 Chromatogram vzorku ječmene č. 13, kyselá esterifikace



Obrázek 8 Chromatogram vzorku ječmene č. 13, alkalická esterifikace

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv odrůdy ječmene a z něj vyrobeného sladu na obsah lipidů a profil mastných kyselin.

Lipidy a mastné kyseliny v obilce ječmene a následně ve sladu mohou představovat zdroj mnohých sensoricky aktivních látek v pivu. Jednou z nežádoucích aromatických látek je aldehyd (2*E*)-non-2-enal, jehož zvýšená hladina způsobená oxidací linolové kyseliny je odpovědná za starou chuť piva, která se projevuje jako chuť a vůně po kartonu a lepence.

Byly analyzovány vzorky sladovnického ječmene odrůd doporučených VÚPS, a.s. pro výrobu piva s chráněným zeměpisným označením „České pivo“. Jednalo se o ječmen jarní vypěstovaný v České republice v roce 2022, ze kterého byly ve VÚPS, a.s. v mikroskladově za standardních podmínek vyrobeny slady. Celkem bylo analyzováno 7 odrůd, každá po dvou zástupcích různého zeměpisného původu.

Před stanovením profilu mastných kyselin byla provedena extrakce lipidů z obilek na fluidním loži přístrojem fexIKA® dive-in control. Nejnižší obsah lipidů v sušině ječmene i sladu byl naměřen u odrůdy Laudis 550 vypěstované v roce 2022 v okrese Olomouc.

U všech vzorků byl pozorován úbytek lipidů ve sladu oproti ječmeni, který představoval 12–32 % v závislosti na odrůdě. Tento úbytek je přisuzován degradaci lipidů během sladování a odstranění klíčku, který je na lipidy bohatý. Největší úbytek způsobený sladováním byl zaznamenán u odrůdy LG Ester vypěstované v okrese Bruntál.

Po derivatizaci vyextrahovaných lipidů bazicky katalyzovanou esterifikací následovala analýza methylesterů příslušných mastných kyselin metodou GC-FID s použitím kapilární kolony SLB-IL 100 (60 m x 0,25 mm x 0,2 μm). Ve vzorcích ječmene a sladu byly identifikovány a kvantifikovány kyseliny myristová, palmitová, stearová, olejová, linolová, *cis*-11-eikosenová, arachová a α -linolenová.

V bakalářské práci byly porovnány dvě metody přípravy methylesterů mastných kyselin. Obě byly vyhodnoceny jako vhodné pro stanovení profilu mastných kyselin v obilkách ječmene a sladu.

Nejhojněji zastoupenou mastnou kyselinou v ječmeni i sladu byla kyselina linolová, která tvořila až 58,5 % z celkového obsahu mastných kyselin. Byla následovaná kyselinou palmitovou a olejovou. V důsledku procesu sladování byly pozorovány změny v procentuálním obsahu jednotlivých mastných kyselin. Obecně byl zaznamenán pokles relativního zastoupení kyseliny palmitové a olejové ve sladu oproti ječmeni, zatímco relativní obsah kyseliny stearové, linolové a *cis*-11-eikosenové se sladováním zvyšoval. Zastoupení kyseliny α -linolenové, myristové a arachové v obilkách ječmene bylo velmi podobné profilu těchto mastných kyselin ve sladu.

U dvou vzorků ječmene a z něj vyrobeného sladu odlišných odrůd nebyly pozorovány výše uvedené změny relativního obsahu zmíněných mastných kyselin. Pro objasnění těchto rozdílů by bylo nutné sledovat, jak se mění profil mastných kyselin v průběhu sladování, případně měřit i aktivitu lipoxygenas.

Nebyla pozorována závislost obsahu lipidů a mastných kyselin na odrůdě ječmene, rozdíly v obsahu lipidů a profilu mastných kyselin pravděpodobně souvisí se zeměpisným původem a podmínkami v místě pěstování.

Na základě výsledků byla jako nejvhodnější pro výrobu piva vybrána odrůda Laudis 550 vypěstovaná v roce 2022 v okrese Kolín. Slad vyrobený z této odrůdy ječmene vykazoval ze všech analyzovaných vzorků nejnižší relativní zastoupení kyseliny linolové, ze které mohou oxidativní degradací, především za přítomnosti enzymu lipoxygenasy, vznikat sensoricky nežádoucí látky. Slad této odrůdy se vyznačoval také nejnižším relativním zastoupením kyseliny olejové a nízkým relativním zastoupením kyseliny linolenové, které mohou vzhledem ke své struktuře rovněž podléhat oxidačním reakcím a negativně ovlivňovat kvalitu piva.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
- [2] SOFROVÁ, Danuše. *Biochemie: základní kurz*. 4. vyd. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1678-0.
- [3] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2000. ISBN 80-86369-00-5.
- [4] BAMFORTH, Charlie. A Brewer's Biochemistry. *The Brewer International: Part 3: Lipids*. 2001, **1**(7), 12-15.
- [5] OHLROGGE, John a John BROWSE. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*. 1995, **7**(7), 957-970. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.7.7.957
- [6] SCHMID, Katherine a John OHLROGGE. CHAPTER 4 - Lipid metabolism in plants. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, 2008, 97-130. ISBN 9780444532190. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044453219-0.50006-4
- [7] DELKER, C., I. STENZEL, B. HAUSE, O. MIERSCH, I. FEUSSNER a C. WASTERNAK. Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. *Plant Biology* [online]. 2006, **8**(3), 297-306 [cit. 2023-02-12]. ISSN 1435-8603. Dostupné z: doi:10.1055/s-2006-923935
- [8] AID, Fatiha. Plant Lipid Metabolism. *Advances in Lipid Metabolism* [online]. IntechOpen, 2020 [cit. 2023-02-13]. ISBN 978-1-78984-458-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.81355
- [9] YANG, Yang a Christoph BENNING. Functions of triacylglycerols during plant development and stress. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **49**, 191-198 [cit. 2023-02-12]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.09.003
- [10] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [11] SVOBODA, Zdeněk, Renata MIKULÍKOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Karolína BENEŠOVÁ a Zdeněk NESVADBA. Determination of lipid content and fatty acid representation in barley caryopses and malt. *Kvasný Průmysl* [online]. 2009, **55**(11-12), 315-320 [cit. 2022-04-04]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2009026
- [12] GORDON, Russell, Aoife POWER, James CHAPMAN, Shaneel CHANDRA a Daniel COZZOLINO. A Review on the Source of Lipids and Their Interactions during Beer Fermentation that Affect Beer Quality. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(4) [cit. 2023-02-07]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation4040089
- [13] BASAŘOVÁ, Gabriela a Jaroslav ČEPIČKA. *Sladařství a pivovarství*. Praha: SNTL, 1985.

- [14] KOSAŘ, Karel a Stanislav PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [15] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ, Pavlína BASAŘOVÁ a Adam BROŽ. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vydání druhé, přepracované, doplněné a aktualizované. Praha: Havlíček Brain Team, 2021. ISBN 978-80-87109-71-7.
- [16] OLŠOVSKÁ, Jana, Tomáš VRZAL, Karel ŠTĚRBA, Pavel ČEJKA a Alexandr MIKYŠKA. The relation between fatty acids' chemical profile and chemotaxonomy of Czech barley (*Hordeum vulgare*) varieties, geographical origin and malting process. *KVASNY PRUMYSL* [online]. 2019, **65**(3), 111-119 [cit. 2022-04-6]. ISSN 2570-8619. Dostupné z: doi:10.18832/kp2019.65.111
- [17] DE MAN, Walter a Pieter DONDEYNE. Effect of nitrogen fertilisation on protein content, total fatty acid content and composition of barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 1985, **36**(3), 186-190 [cit. 2022-04-09]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.2740360309
- [18] BRAVI, Elisabetta, Ombretta MARCONI, Giuseppe PERRETTI a Paolo FANTOZZI. Influence of barley variety and malting process on lipid content of malt. *Food chemistry* [online]. 2012, **135**(3), 1112-1117 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.041
- [19] BRAVI, Elisabetta, Giuseppe PERRETTI, Pietro BUZZINI, Rolando DELLA SERA a Paolo FANTOZZI. Technological Steps and Yeast Biomass as Factors Affecting the Lipid Content of Beer during the Brewing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, **57**(14), 6279-6284 [cit. 2023-02-17]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf9007423
- [20] KOBAYASHI, Naoyuki, Hirotaka KANEDA, Yukinobu KANO a Shouhei KOSHINO. Determination of fatty acid hydroperoxides produced during the production of wort. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1993, **99**(2), 143-146 [cit. 2023-03-5]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1993.tb01156.x
- [21] JAMIESON, A.M. a J.E.A. VAN GHELUWE. Identification of a Compound Responsible for Cardboard Flavor in Beer. In: *American Society of Brewing Chemists* [online]. 1970, **28**(1), s. 192-197 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.1080/00960845.1970.12006980
- [22] ČEJKA, P. Factors Influencing Sensory Properties of Beer. *Kvasny Prumysl* [online]. 1997, **43**(6), 167-173 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1997012
- [23] LOISEAU, Jacques, Benoît LY VU, Marie-hélène MACHEREL a Yvon DEUNFF. Seed lipoxygenases: occurrence and functions. *Seed science research* [online]. 2001, **11**(3), 199-211 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0960-2585. Dostupné z: doi:10.1079/SSR200176

- [24] HAVLOVÁ, Pavla. *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu: (studijní zpráva)*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999. Studijní informace. ISBN 80-7271-040-0.
- [25] YANG, Guoshen a Paul SCHWARZ. Activity of Lipoxygenase Isoenzymes During Malting and Mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, **53**(2), 45-49 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-53-0045
- [26] GUIDO, Luis, Patrick BOIVIN, Nizar BENISMAIL, Cristina GONÇALVES a Aquiles BARROS. An early development of the nonenal potential in the malting process. *European Food Research and Technology* [online]. 2005, **220**(2), 200-206 [cit. 2023-04-27]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-004-1079-y
- [27] KAUKOVIRTA-NORJA, Anu, Simo LAAKSO, Pekka REINIKAINEN a Juhani OLKKU. Lipolytic and oxidative changes of barley lipids during malting and mashing. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1993, **99**(5), 395-403 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0046-9750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1993.tb01179.x
- [28] ANNESS, B. J. Lipids od barley, malt and adjuncts. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1984, **90**(5), 315-318 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0046-9750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1984.tb04282.x
- [29] COZZOLINO, D., S. ROUMELIOTIS a J.K. EGLINTON. The role of total lipids and fatty acids profile on the water uptake of barley grain during steeping. *Food Chemistry* [online]. 2014, **151**, 231-235 [cit. 2023-02-07]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.073
- [30] KOBAYASHI, Naoyuki, Shuich SEGAWA, Shingo UMEMOTO, Hisao KURODA, Hirotaka KANEDA, Yutaka MITANI, Junji WATARI a Masachika TAKASHIO. A New Method for Evaluating Foam-Damaging Effect by Free Fatty Acids. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, **60**(1), 37-41 [cit. 2023-02-05]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-60-0037
- [31] WILDE, P., F. HUSBAND, D. COOPER, M. RIDOUT, R. MULLER a E. MILLS. Destabilization of Beer Foam by Lipids: Structural and Interfacial Effects. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, **61**(4), 196-202 [cit. 2023-02-17]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-61-0196
- [32] LEISEGANG, R. a U. STAHL. Alteration in proteinase sensitivity of foam protein during the malting and brewing process. In: *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*. Prague, 2005, s. 642-645. ISBN 90-70143-23-2.
- [33] KOBAYASHI, Naoyuki, Hirotaka KANEDA, Hisao KURODA, Junji WATARI, Toshio KURIHARA a Ken SHINOTSUKA. Behavior of Mono-, Di-, and Trihydroxyoctadecenoic Acids during Mashing and Methods of Controlling Their Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2000, **90**(1), 69-73 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1347-4421. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.90.69

- [34] KOBAYASHI, Naoyuki, Hirotaka KANEDA, Hisao KURODA, Minoru KOBAYASHI, Toshio KURIHARA, Junji WATARI a Ken SHINOTSUKA. Simultaneous Determination of Mono-, Di-, and Trihydroxyoctadecenoic Acids in Beer and Wort. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2000, **106**(2), 107-110 [cit. 2023-02-25]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2000.tb00046.x
- [35] CARRASCO-PANCORBO, Alegría, Natalia NAVAS-IGLESIAS a Luis CUADROS-RODRÍGUEZ. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, **28**(3), 263-278 [cit. 2022-06-13]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.12.005
- [36] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7647-6.
- [37] HEWAVITHARANA, Geeth, Dilini PERERA, S.B. NAVARATNE a I. WICKRAMASINGHE. Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2020, **13**(8), 6865-6875 [cit. 2023-02-25]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2020.06.039
- [38] Extraction methods in fat analysis. In: *www.gerhardt.de* [online]. [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://www.gerhardt.de/en/know-how/analytical-methods/extraction-methods-in-fat-analysis/>
- [39] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [40] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1991, 224 s. ISBN 80-227-0374-5.
- [41] PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902-4329-0.
- [42] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-864-9402-0.
- [43] LUQUE DE CASTRO, M.D. a F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(16), 2383-2389 [cit. 2022-06-13]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.11.027
- [44] ŠTĚRBA, Karel, Pavel ČEJKA, Jiří ČULÍK, Marie JURKOVÁ, Karel KROFTA, Martin PAVLOVIČ, Alexander MIKYŠKA a Jana OLŠOVSKÁ. Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Detection. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2015, **73**(2), 151-158 [cit. 2022-06-13]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2015-0406-01
- [45] HORÁK, Tomáš, Jiří ČULÍK, Marie JURKOVÁ, Pavel ČEJKA a Jana OLŠOVSKÁ. Determination of fatty acids in beer by fast routine analyse. *Kvasny Prumysl* [online]. 2013, **59**(3), 58-62 [cit. 2022-06-13]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2013006

- [46] RUIZ-GUTIÉRREZ, V a M.C PÉREZ-CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **885**(1-2), 321-341 [cit. 2022-06-12]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00181-3
- [47] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [48] EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1995, **671**(1-2), 113-131 [cit. 2023-02-26]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(95)00142-6
- [49] BRAVI, Elisabetta, Giuseppe PERRETTI a Luigi MONTANARI. Fatty acids by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detector. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1134**(1-2), 210-214 [cit. 2023-02-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.09.007
- [50] CLEMENT, Ray E. *Gas chromatography: biochemical, biomedical, and clinical applications*. New York: John Wiley and Sons, 1990. ISBN 0-471-01048-0.
- [51] CHRISTIE, W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in lipid methodology*. Dundee: Oily Press, 1993, **2**(69), 69-111.
- [52] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [53] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [54] STUART, Brian. *Gas chromatography*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. ISBN 08-540-4478-7.
- [55] SKOOG, Douglas, Donald WEST, F. HOLLER a Stanley CROUCH. *Analytická chemie*. Přeložili Karel NESMĚŘÁK, Václav ČERVENÝ, Tomáš KRÍŽEK, Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [56] SMOLKOVÁ, Eva a Ladislav FELTL. *Analýza látek v plynném stavu*. Praha: SNTL, 1991. ISBN 80-03-00604-X.
- [57] SKOOG, Douglas a James LEARY. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, 1992. ISBN 0-03-075398-8.
- [58] HIGSON, Séamus P.J. *Analytical chemistry*. 1st ed. New York: Oxford University Press, 2004, 453 s. ISBN 978-0-19-850289-0.
- [59] FRANK, David, Sandra PAT a Allen VICKERS. Column selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters: Application. In: *Agilent* [online]. 2005 [cit. 2023-03-04]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/Library/applications/5989-3760EN.pdf>
- [60] BAREK, J. Nomenklatura a terminologie: Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. 2000, **94**(7), 439-444. ISSN 1213-7103.

- [61] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [62] HENDL, Jan. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. Praha: Portál, 2004. ISBN 80-7178-820-1.
- [63] ÖZCAN, Mehmet, Fahad ALJUHAIMI a Nurhan USLU. Effect of malt process steps on bioactive properties and fatty acid composition of barley, green malt and malt grains. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2018, **55**(1), 226-232 [cit. 2023-04-14]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-017-2920-1
- [64] IGHWELA, Keri Alhadi. Comparison of Lipid Content and Fatty Acid Composition of Malted and Non-Malted Barley. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)*. 2015, **2**(1), 10-13. ISSN 2349-6495.
- [65] LORDAN, Ronan, Eoin O'KEEFFE, Alexandros TSOUPRAS a Ioannis ZABETAKIS. Total, Neutral, and Polar Lipids of Brewing Ingredients, By-Products and Beer: Evaluation of Antithrombotic Activities. *Foods* [online]. 2019, **8**(5) [cit. 2023-04-16]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8050171
- [66] OSMAN, R., F. EL-GELIL, H. EL-NOAMANY a M. DAWOOD. Oil content and fatty acid composition of some varieties of barley and sorghum grains. *Grasas y Aceites* [online]. 2000, **51**(3), 157-162 [cit. 2023-04-03]. ISSN 1988-4214. Dostupné z: doi:10.3989/gya.2000.v51.i3.472
- [67] WIJEKOON, Champa, Thomas NETTICADAN, Ali SABRA, Liping YU, Chamali KODIKARA a Ana BADEA. Analyses of Fatty Acids, Proteins, Ascorbic Acid, Bioactive Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Canadian Barley Cultivars and Elite Germplasm. *Molecules* [online]. 2022, **27**(22) [cit. 2023-04-17]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27227852

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

LOX	lipoxygenasa
MK	mastná kyselina
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (Mono Unsaturated Fatty Acids)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (Poly Unsaturated Fatty Acids)
SFE	superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction)
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid-phase Extraction)
FBE	extrakce na fluidním loži (Fluidized-bed Extraction)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
FID	plamenově-ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
FAME	methylestery mastných kyselin (Fatty Acid Methyl Esters)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance Liquid Chromatography)
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
OTC	otevřená kapilární kolona (Open Tubular Column)
WCOT	kolona s kapalnou stacionární fází zakotvenou na stěnách kapilární trubice (Wall Coated Open Tubular)
SCOT	kolona s kapalnou stacionární fází zakotvenou pomocí pevného nosiče (Support Coated Open Tubular)
PLOT	kolona s pevnou vrstvou naneseného sorbentu na stěnách kapilární trubice (Porous Layer Open Tubular)
PEG	polyethylenglykol
TCD	tepelně vodivostní detektor (Thermal Conductivity Detector)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Gas Chromatography with Mass Spectrometry)
PTV	teplotně programovatelný nástřík (Programmable Temperature Vaporization)
GC-FID	plynová chromatografie s detekcí plamenovou ionizací (Gas Chromatography With Flame Ionization Detection)
LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
RSD	relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)

8 SEZNAM PŘÍLOH

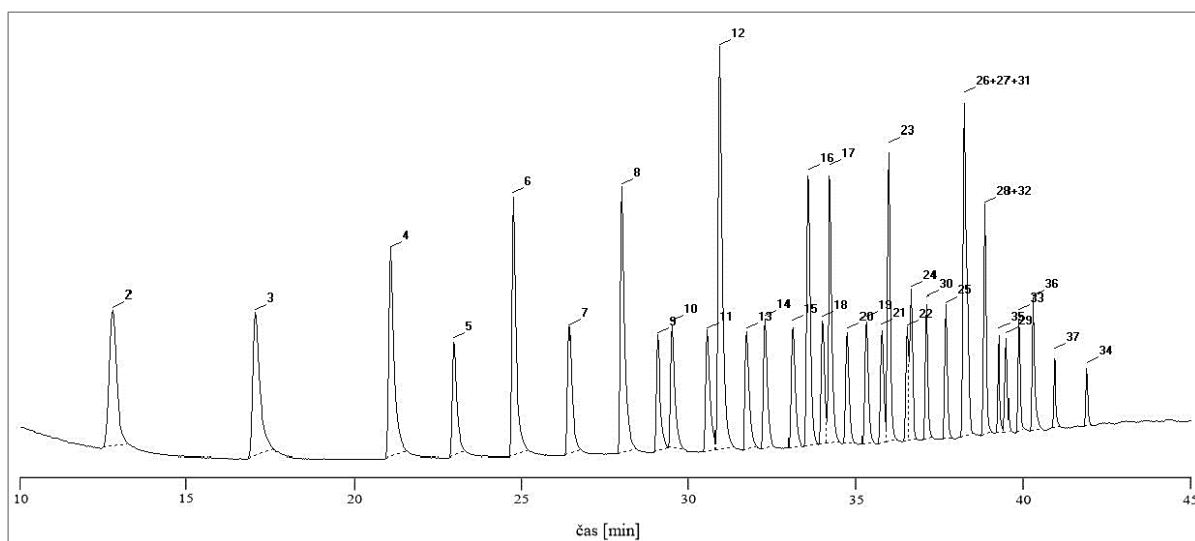
- Příloha 1 *Seznam mastných kyselin, jejichž methylestery jsou obsaženy ve standardu Supelco 37 Component FAME mix*
- Příloha 2 *Chromatogram standardu Supelco 37 Component FAME mix*
- Příloha 3 *Grafické porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích ječmene a sladu stejné odrůdy*

9 PŘÍLOHY

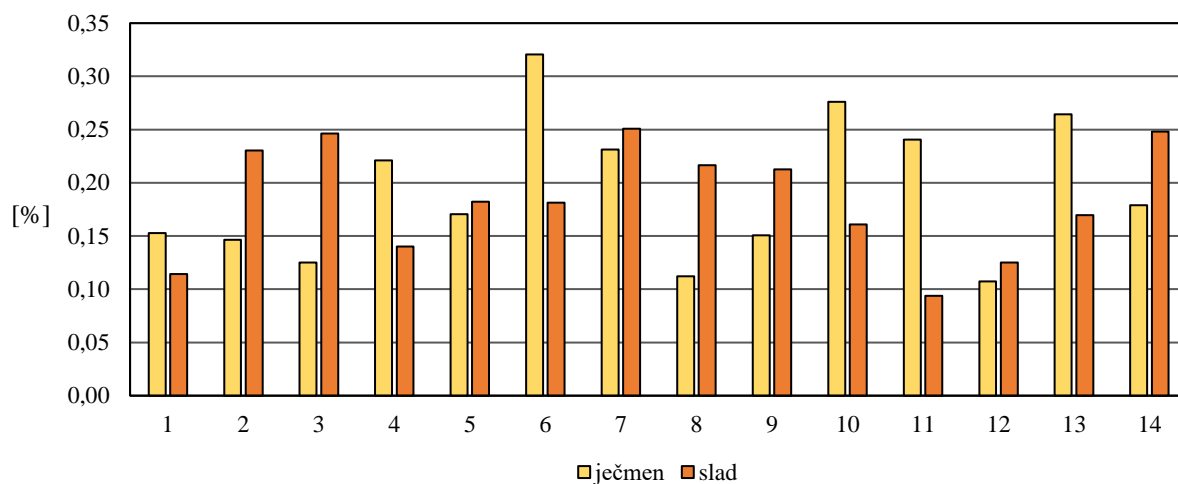
*Příloha 1 Seznam mastných kyselin, jejichž methylestery jsou obsaženy ve standardu
Supelco 37 Component FAME mix*

eluční pořadí	identifikační číslo	mastná kyselina	popis molekuly	retenční čas [min]
1	1	máselná	C4:0	–
2	2	kapronová	C6:0	12,75
3	3	kaprylová	C8:0	17,01
4	4	kaprinová	C10:0	21,05
5	5	undekanová	C11:0	22,93
6	6	laurová	C12:0	24,70
7	7	tridekanová	C13:0	26,38
8	8	myristová	C14:0	27,96
9	9	myristoolejová	C14:1	29,02
10	10	pentadekanová	C15:0	29,46
11	11	<i>cis</i> -10-pentadecenová	C15:1	30,52
12	12	palmitová	C16:0	30,88
13	13	palmitoolejová	C16:1	31,69
14	14	heptadekanová	C17:0	32,24
15	15	<i>cis</i> -10-heptadecenová	C17:1	33,05
16	16	stearová	C18:0	33,53
17	18	elaidová	C:18:1n9t	33,95
18	17	olejová	C:18:1n9c	34,18
19	20	linolelaidová	C18:2n6t	34,70
20	19	linolová	C:18:2n6c	35,27
21	21	γ -linolenová	C18:3n6	35,72
22	23	arachová	C20:0	35,95
23	22	<i>cis</i> -11-eikosenová	C20:1n9	36,49
24	24	α -linolenová	C18:3n3	36,61
25	30	<i>cis</i> -11,14-eikosadienová	C20:2	37,08
26	25	<i>cis</i> -8,11,14-eikosatrienová	C20:3n6	37,65
27	26, 27, 31	<i>cis</i> -11,14,17-eikosatrienová	C20:3n3	38,19
28		arachidonová	C20:4n6	
29		<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eikosapentaenová	C20:5n3	
30	28, 32	heneikosanová	C21:0	38,82
31		behenová	C22:0	
32	35	eruková	C22:1n9	39,23
33	29	<i>cis</i> -13,16-dokosadienová	C22:2	39,46
34	33	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	C22:6n3	39,82
35	36	trikosanová	C23:0	40,26
36	37	lignocerová	C24:0	40,90
37	34	nervonová	C24:1n9	41,86

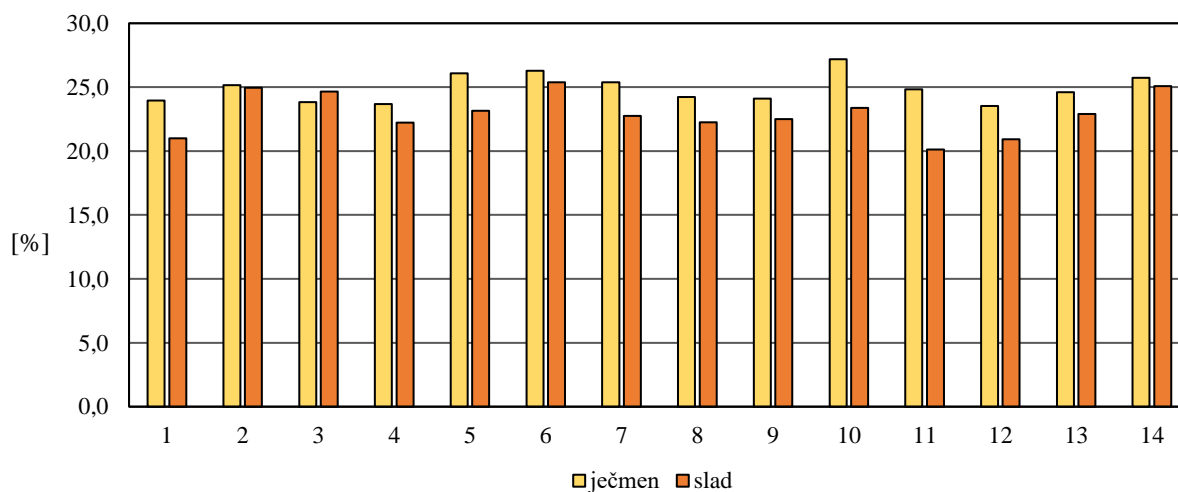
Příloha 2 Chromatogram standardu Supelco 37 Component FAME mix



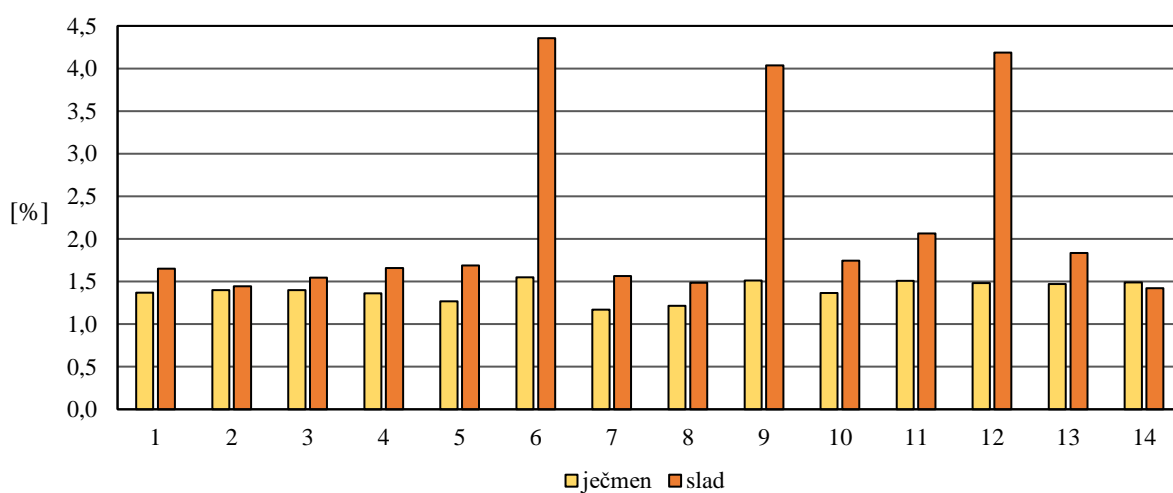
Příloha 3 Grafické porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích ječmene a sladu stejné odrůdy



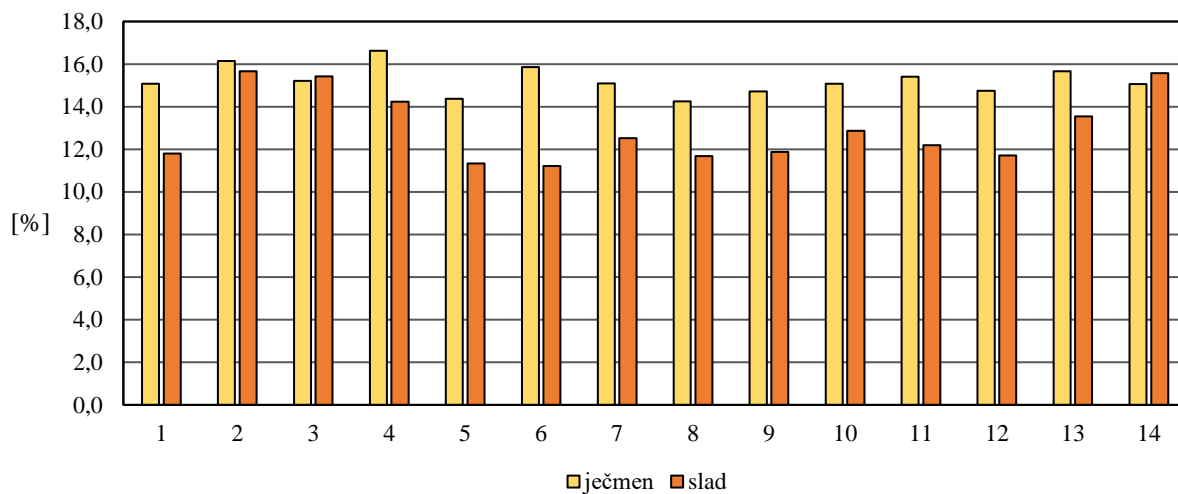
Graf 6 Procentuální zastoupení kyseliny myristové



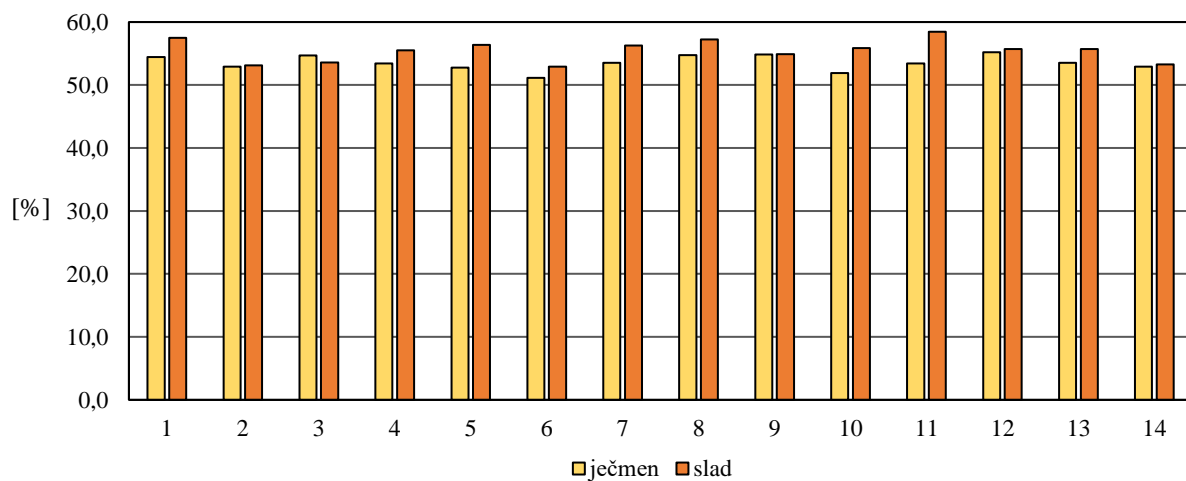
Graf 7 Procentuální zastoupení kyseliny palmitové



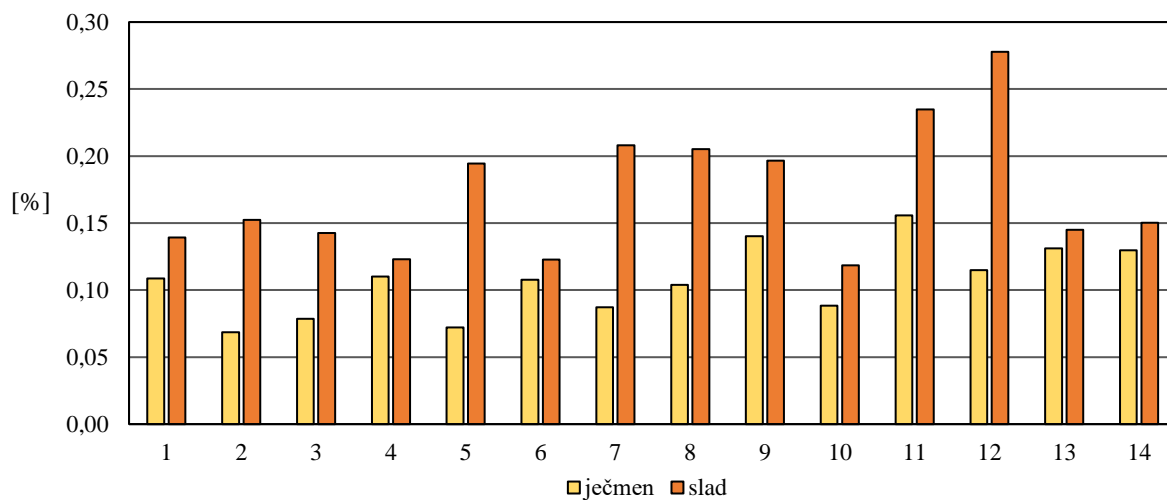
Graf 8 Procentuální zastoupení kyseliny stearové



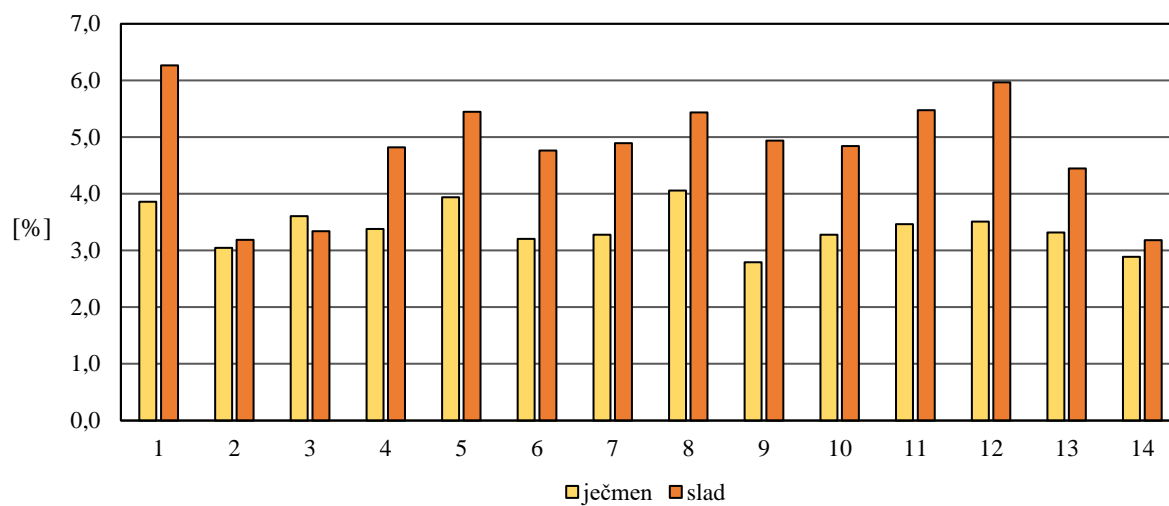
Graf 9 Procentuální zastoupení kyseliny olejové



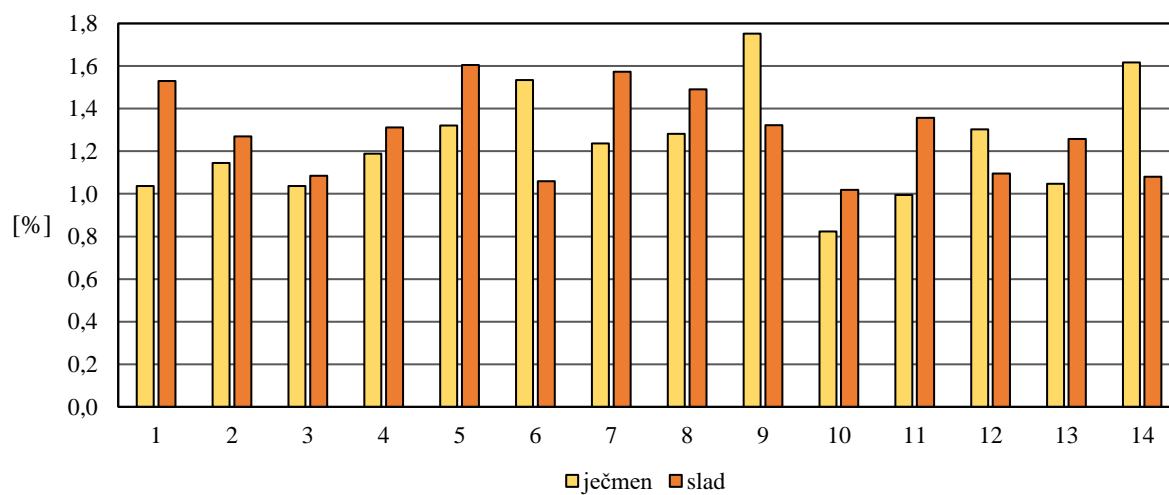
Graf 10 Procentuální zastoupení kyseliny linolové



Graf 11 Procentuální zastoupení kyseliny arachové



Graf 12 Procentuální zastoupení kyseliny cis-11-eikosenové



Graf 13 Procentuální zastoupení kyseliny α -linolenové