

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

Petra Mimochoďková

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav technologie potravin



**Moderní analytické metody při analýze pivovarských
produktů a meziproduktů**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Ing. Tomáš Gregor, Ph.D.

Vypracovala:

Petra MIMOCHODKOVÁ

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Moderní analytické metody při analýze pivovarských produktů a meziproduktů vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat panu Ing. Tomáši Gregorovi, PhD za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytoval během zpracování bakalářské práce a zároveň za čas, který věnoval konzultacím.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na použití analytických metod ve vztahu ke stanovování jednotlivých vlastností a komponent pivovarských meziproductů a produktů. Nejprve byly popsány základní principy výroby piva. Další kapitola se zabývá problematikou konvenčních analytických metod, které jsou dodnes využívány v praxi. Na závěr jsou popsány vybrané novodobé metody používané v pivovarsko – sladařské analytice.

Klíčová slova: chromatografie, pivo, analýza

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the application of analytical methods in relation to the determination of individual properties and components of brewing intermediates and products. First of all were be described the basic principles of the production of beer. The next chapter discusses the problems of the conventional analytical methods, which are still used in practice. In conclusion are described selected modern methods used in the brewery – malting analyst.

Key words: chromatography, beer, analysis

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	CÍL PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Základní principy výroby piva	3
3.1.1	Výroba mladiny	3
3.1.2	Výroba piva	6
3.2	Pivovarské meziprodukty a produkty.....	8
3.2.1	Sladina	8
3.2.2	Mladina	8
3.2.3	Mladé pivo	8
3.2.4	Pivo	9
3.2.5	Produkty Maillardovy reakce a enzymatického hnědnutí.....	9
3.3	Konvenční analytické metody.....	10
3.3.1	Odběr vzorků mladiny a piva.....	10
3.3.2	Metody pro stanovení extraktu	11
3.3.3	Metoda podle Windische a metoda spektrofotometrická (jodová hodnota)	12
3.3.4	Metoda kvasného válce.....	12
3.3.5	Metody pro stanovení dusíkatých látek	13
3.3.6	Metody pro stanovení sacharidů a polysacharidů.....	14
3.3.7	Metody stanovení hořkých látek.....	16
3.3.9	Metoda vážková pro stanovení celkových lipidů	17
3.3.10	Metoda elektrochemická – stanovení rozpuštěného kyslíku	17
3.3.11	Metody stanovení oxidu uhličitého	17
3.3.12	Metody stanovení pěnivosti piva.....	18
3.3.13	Měření čirosti.....	19

3. 3. 14	Metoda podle Essera.....	19
3. 3. 15	Kontrola pasterace	19
3. 3. 16	Metody stanovení vedlejších kvasných produktů.....	19
3. 3. 17	Metody pro stanovení dusitanů a dusičnanů.....	20
3.4	Moderní analytické metody.....	20
3.4.4	Příprava vzorků.....	20
3.4.5	Chromatografické metody v kombinaci s hmotnostní spektrometrií	23
3.4.3	Metody molekulové spektroskopie.....	27
4	ZÁVĚR.....	30
5	SEZNAM LITERATURY.....	31
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	37

1 ÚVOD

Pivo již několik století bezesporu patří k naší historii a jeho obliba stále stoupá. V návaznosti na tento aspekt roste i jeho spotřeba, ve které si Česká Republika drží už několik let prvenství. Díky takové popularitě a neustálé snaze pivovarů vyrábět kvalitnější a chutnější produkty je potřeba stále vyspělejších analytických a moderních metod k jeho analýze. Právě této problematice se věnuje má bakalářská práce. Zaměřila jsem se především na zmapování stávajících osvědčených metod v porovnání s nejnovějšími možnostmi stanovení pivovarských produktů a meziproductů.

Téma bakalářské práce jsem si vybrala na základě absolvování bakalářské praxe v jednom z největších pivovarů u nás. Nejvíce mě zaujaly moderních technologie na základě chromatografických metod ve spojení s hmotnostní spektrometrií a nové možnosti přípravy vzorků.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je komplexní literární přehled analytických metod využívaných v pivovarnictví. Je zaměřena především na moderní instrumentální metody v porovnání s klasickými laboratorními metodami.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Základní principy výroby piva

Pivo je slabě alkoholický nápoj, který se vyrábí ze tří základních surovin – obilného sladu, vody a chmele. Proces výroby piva probíhá v pivovaru a skládá se z přípravy mladiny, hlavního kvašení, dokvašování a zrání piva. Poté následují závěrečné úpravy piva, jako je filtrace, pasterace a stabilizace piva, a stáčení piva do transportních nádob. (BASAROVÁ et. al., 2011)

3.1.1 Výroba mladiny

Technologie výroby mladiny se sestává z následujících kroků – šrotování sladu, vystírání sladového šrotu do vody, rmutování, scezování sladiny a vyslazování sladového mláta, chmelovaru a chlazení mladiny. Vše pobíhá ve varně, která je srdcem pivovaru a její technické zařízení je vyrobeno buď z mědi, nebo z nerezové oceli. (BASAROVÁ, 2011)

Nejprve je potřeba převést obsahové látky sladu, především škrob, do roztoku. Poté je sladové enzymy mohou snadno převést ve směs nízemolekulárních sacharidů, které jsou v dalším technologickém úseku pivovarskými kvasinkami zkvašeny na ethanol a oxid uhličitý.

Slad je rozšrotován a smíchán s vodou při tzv. vystírání. Vystírací teplota se u dobře rozluštěných sladů pohybuje kolem 35 až 38 °C. Navazuje rmutování, kdy se celý objem zahřívá na vyšší teploty, které jsou optimální pro činnost enzymů. Rozdělujeme dekokční a infuzní rmutování. Infuzní rmutování je nejjednodušší způsob výroby sladiny vzhledem k tomu, že je možné ho provádět pouze v jedné vyhřívané nádobě a to tak, že se používá nejvyšší odrmutovací teplota a část díla se nepovažuje. Zatímco dekokční způsob rmutování, který je v našich pivovarech nejběžnější, využívá dvě nádoby, kde jedna z nich je vyhřívaná a rmuty se v konečné fázi považují. (BASAROVÁ, 2010; DANĚK et. al. 1982)

V našich pivovarech je nejčastěji využívaný způsob vaření piva na dva rmuty, existuje i třírmutový nebo jednormutový postup. Objem všech dílčích rmutů se vždy volí tak, aby po jejich spuštění do zbytku vystírky stoupla teplota na teplotu požadovanou.

Enzymy způsobují rozštěpení a převedení extraktu do roztoku, nejpodstatnější je činnost amylolytických, proteolytických a kyselinotvorných enzymů. První, menší podíl extraktu

přechází do roztoku už při vystírání, druhý až při rmutování, kdy se vystírka postupně vyhřívá na teploty vhodné pro činnost jednotlivých skupin enzymů, podle nichž jsou jednotlivé teploty pojmenovány:

- 35 až 38 °C - kyselinotvorná teplota
- 48 až 52 °C - peptonizační teplota
- 60 až 65 °C - nižší cukrotvorná teplota
- 70 až 75 °C - vyšší cukrotvorná teplota
- 78 °C – odrmutovací teplota

Nejdůležitější operací je převedení škrobu na nízemolekulární cukry, především glukosu, maltosu a dextriny. K rozštěpení škrobu dochází ve třech fázích – bobtnání a zmazovnění škrobu, ztekucení a zcukření škrobu. (PELIKÁN et. al. 2004)

Jestliže škrobovou emulzi zahříváme, dojde nejprve k bobtnání a zmazovnění. Tímto fyzikálně chemickým procesem se mění škrob na viskózní kapalinu a přechází tak do roztoku. Optimální teplota u sladového škrobu je 50 – 57 °C. V další fázi dochází působením

α -amylasy k ztekucení škrobu a vzniká rozpustný amyloextrin při teplotách 65 až 75 °C a pH 4,6. Enzym α - amylasa se inaktivuje při teplotě 80 °C. (ČEPIČKA, 1995)

V konečné fázi dochází k zcukření, tedy úplnému rozštěpení makromolekul škrobu na jednodušší cukry a dextriny, a to díky enzymům α - amylasy a β - amylázy. Optimální teplota pro zcukření je pro β – amylasu 60 – 65 °C a pH 4,5, při teplotě 75 °C se inaktivuje. Zkrácením či prodlužováním časového intervalu k dosažení optimálních teplot pro dextrinotvornou α - amylasu nebo cukrotvornou β - amylasu lze ovlivnit složení výsledného extraktu. Celý průběh štěpení škrobu se během výroby kontroluje jodovou zkouškou. (ČEPIČKA, 1995)

Vedle štěpení škrobu je při rmutování technologicky důležité i štěpení vysokomolekulárních bílkovin. Bílkoviny mají vliv na pěnovost piva, plnost jeho chuti a především jsou důležité aminokyseliny, které vznikají jejich štěpením a jsou nezbytné pro správné prokvašení piva. Jejich obsah se však musí kontrolovat, protože nadměrné množství způsobuje horší stabilitu a trvanlivost piva. (ČEPIČKA, 1995)

Proteolytické enzymy štěpící bílkoviny jsou neaktivnější při tzv. peptonizační teplotě 50°C. Vzniklé aminokyseliny snižují spolu s kyselinou fosforečnou, která vzniká rozkladem fosforu kyselinotvornými enzymy, pH roztoku a vytváří tak potřebnou kyselou reakci rmutů, která je důležitá pro další činnost enzymů. (THOMPSON, 2012)

Po ukončení procesu rmutování je nutné rozdělit vzniklé dílo na dvě fáze – kapalnou a pevnou. Kapalná fáze se nazývá sladina a pevná mláto. Činí se tak na scezovací kádi, kam je dílo převedeno z vystírací kádě nebo jiné nádoby. Po určité době se začne tvořit na dně kádě sediment z mláta a vytvoří vrstvu o výšce 20 – 30 cm. Vzniklou vrstvou začne protékat sladina, která je zprvu kalná, proto se tato část vrací potrubím zpět nad vrstvu mláta a cedí se znovu. Zařízení kontroluje čirost a stupňovitost sladiny, která se nazývá předek až do požadované čirosti. Poté se předek převede do mladinové pánve a začne vyslazování mláta. Mláto se prolévá horkou vodou, aby se z něj dostalo co nejvíce extraktu, který zde po oddělení předku zbývá, vzniká tzv. výstřelek. Proces se opakuje až do požadované stupňovitosti posledního výstřelku, což bývá 1 %. Poslední výstřelky se nazývají patoky, mají nejnižší stupňovitost a vedou se nejčastěji do odpadu. Ostatní jsou přečerpány do mladinové pánve, smíchány s předkem, je změřena stupňovitost a přivede se vše k varu. Vyslazené mláto se ze scezovací kádě vyhrne a dopraví do zásobníku, odkud je buď rychle odváženo pro krmné účely, anebo usušeno, protože se rychle kazí. (CHLÁDEK, 2007)

Nastává chmelovar – vaření sladiny spolu s chmelem, nejčastěji chmelovým granulátem, často smíchaným s chmelovým extraktem. Cílem chmelovaru je převedení hořkých látek chmele do mladiny, její sterilace, inaktivace enzymů a koagulace bílkovin s polyfenolovými látkami sladu a chmele. Důležité je i odpaření vody tak, aby dosáhla vzniklá mladina požadované stupňovitosti. Celý chmelovar trvá 90 minut a chmelové přípravky se přidávají postupně, nejčastěji nadvakrát. Nejdůležitější chemickými reakcemi při chmelovaru jsou izomerační reakce α - hořkých kyselin a tím vzniká iso - α - hořkých kyselin. Dochází také k Maillardově reakci a vzniku aromatických a barevných látek. Vzniká mladina, jejíž vzorek je potřeba po chmelovaru zkontrolovat, změřit stupňovitost a sledovat tzv. „*mladinový lom*“. Mladinový lom ukazuje, zda koagulace bílkovin při varu proběhla správně a došlo k vytvoření klků – shluky pevných vloček v jinak čiré mladině. (CHLÁDEK, 2007)

Mladina dále prochází vířivými káděmi, usazovacími káděmi, dekantéry nebo odstředivkami, aby byly odstraněny hrubé kaly. Dochází k roztočení mladiny a za působení

odstředivé síly vzniká ve středu kádě tzv. koláč z těžších kalů. Mladina je otvory v kádi odčerpávána do chladiče mladiny, kde je dochlazena z původních 98 °C po chmelovaru na zákvasnou teplotu 5 až 7 °C. Pro tento účel jsou použity jedno- až dvoustupňové chladiče mladiny. Dále se mladina musí provzdušnit kyslíkem nebo sterilním vzduchem, aby v procesu kvašení měly kvasinky vhodné prostředí pro množení. Je důležité, aby vyrobená mladina odpovídala svou koncentrací extraktivních látek vyráběnému typu piva, takže například při výrobě 12 % piva musí obsahovat 12 % hmotnostních extraktivních látek. (BASAŘOVÁ, 2010)

3.1.2 Výroba piva

Výroba piva zahrnuje hlavní kvašení piva, dokvašování, řezání piva, stabilizaci piva a jeho balení.

Je třeba co nejdříve zchlazenou a provzdušněnou mladinu zakvasit kulturními várečnými kvasnicemi, aby nebyla napadena nežádoucími mikroorganismy. Důležitá je správná dávka kvasnic a jejich rozptýlení do mladiny. Zpravidla je dáváno půl litru vypraných kvasnic na sto litrů mladiny. Jsou přidávány postupně speciálním dávkovacím zařízením rovnou do proudící mladiny. (CHLÁDEK, 2007) Mladina zakvašená tímto způsobem obsahuje zhruba 10 milionů buněk v jednom ml. (BASAŘOVÁ, 2011) Pro zakvašení mladiny se používá dvojích kmenů kvasinek – svrchních pivovarských kvasinek r. *Saccharomyces cerevisiae* a spodních r. *Saccharomyces uvarum*. Teplota zakvašení u prvního rodu kvasinek je v rozmezí 18 - 22 °C a u druhého 5 – 17 °C. Technologicky je kvašení rozděleno na hlavní kvašení a dokvašování. (BASAŘOVÁ, 2010)

Hlavní kvašení má za úkol převést extrakt na alkohol a oxid uhlíčitý, které vznikají při přeměně zkvasitelných cukrů glukosy, maltotriosy a maltosy anaerobním kvašením. V malé míře dochází ke vzniku ostatních kvasných produktů: aldehydy, diketony, alifatické alkoholy, estery a mastné kyseliny. (ALBL, 1990; THOMPSON, 2012) Tyto látky se podílí na tvorbě aroma a chuti piva. Hlavní kvašení dříve probíhalo v otevřených kvasných kádích, v našich pivovarech převážně spodními pivovarskými kvasinkami, v chlazených místnostech tzv. spilkách, v poslední době se využívá spíše velkých, uzavřených, nerezových kvasných nádob, tzv. CKT – cylindrokonických tanků. Brzy po zakvašení se na povrchu mladiny objevuje první bílá pěna, tomuto jevu se říká zaprašování. Dále pěna houstne až do smetanové konzistence a tvoří nízké až vysoké bílé kroužky, které signalizují nejintenzivnější stádium

kvašení a maximální vývin CO₂. Po poklesu pH až na 4,4 jsou na povrchu vysoké hnědé kroužky, což se děje třetí až pátý den kvašení. Posledním stádiem hlavního kvašení je propadání deky, kdy dochází k sedimentaci a aglutinaci kvasnic. Deky se z piva sbírá při výšce 3 cm, aby nedošlo k zhoršení chuti piva. Vzniká mladé pivo a kvasinky se musí po stáhnutí piva ze dna kvasné kádě sbírat. Použité kvasnice se properou studenou vodou a dále se používají. Celý proces trvá 6 až 8 dní, dle druhu vyráběného piva. (ČEPIČKA, 1995, BASAŘOVÁ, 2010)

Mladé pivo je zchlazeno na zhruba 5 °C a převedeno do ležáckých tanků, které jsou umístěny v podzemních sklepech. Při dokvašování se klade důraz na pomalé zkvašování sacharidů za nízkých teplot blízkých nule. Pivo se zde také sytí oxidem uhličitým, čiří se a zajišťuje se jeho organoleptická zralost. Oxid uhličitý se v pivu rozpouští a dochází ke vzniku disociované kyseliny uličité, která na sebe váže bílkoviny. Celková doba ležení se většinou pohybuje u běžných piv kolem 3 týdnů, u speciálních může být až několik měsíců. (ČEPIČKA, 1995)

Dlouhodobou trvanlivost piva, až 1 rok, a to i s chuťovou a koloidní stabilitou zajišťuje stabilizace piva. Stabilizační prostředky sráží, adsorbují nebo štěpí polyfenoly piva, vysokomolekulární dusíkaté látky a jiné působí jako antioxidanty. Přídavek stabilizátorů je většinou koncem dokvašování, někdy se však přidávají už při filtraci piva. (PELIKÁN et. al., 2004)

Součástí stabilizace piva je jeho filtrace. Používá se křemelinové filtrace: deskové, síťové nebo svíčkové. Filtrace se obvykle provádí přes dvě vrstvy, kdy se kombinuje hrubší a jemnější křemelina. Modernější metodou je filtrace přes membránové filtry, kde se průchodnost membrán udržuje příčnou cirkulací piva. (BASAŘOVÁ, 2010)

Dalším krokem je pasterace piva pro zvýšení jeho biologické stability. Pasteruje se přímo v naplněných láhvích procházejících tunelovým pastérem. Láhve se sprchují vodou o teplotě kolem 62 °C na 15 - 20 minut a pak se pivo opět chladí. Dalším šetrnějším způsobem je průtoková pasterace. Pivo se zahřívá na teplotu 72 °C jen na 30 sekund. Tato pasterace je šetrnější i ekonomičtější, pivo má lepší chuť, vůni a ušetří se energie, ale stupeň jistoty je nižší. Proto musí být zaručena vysoká mikrobiální čistota všech pivních cest i použitých obalů. (BASAŘOVÁ, 2010)

Závěrečnou fází výroby piva je jeho stáčení do obalů. Pivo se plní nejčastěji do skleněných vratných láhví, dále do plechovek a do plastových obalů, nejčastěji PET láhví. Pro balení s větším objemem se využívají nerezové KEG sudy, které jsou uzpůsobeny k přístupu tlačného plynu a výstupu piva při stáčení a jsou vratné. Nejnověji se pivo do restaurací a hospod dováží v cisternách, kde se přečerpává do zásobních tanků, které jsou nejčastěji vybaveny plastovými pytli omezujícími kontaminaci a přístup kyslíku. (THOMSON, 2012; PELIKÁN et.al., 2004)

3.2 Pivovarské meziprodukty a produkty

Do skupiny pivovarských meziproduktů a produktů patří sladina, mladina, mladé neboli zelené pivo a pivo.

3.2.1 Sladina

Jedná se o extrakt, který je vyroben z vody a mletého sladu, rmutovaný a zbavený mláta a používá se k výrobě piva. Sladina je při výrobě piva vařena z několika účelů. Zatímco oddělením extraktu od plev se výsledná sladina zředí, tak přivedením k varu její hustota stoupá. Hustota udává poměr přítomných cukrů a dalších rozpuštěných látek a vody. Je vyjádřena ve stupních Bellingových (B) nebo v hmotnostních procentech (% hm). Vyjadřuje i množství nezkvašených extraktu v pivu. U průměrného piva plzeňského typu je obsah přítomných cukrů ve sladině zhruba 12 gramů na 100 gramů sladinu. (VERHOEF,2004)

3.2.2 Mladina

Mladina je meziprodukt výroby piva, který vzniká povařením sladinu s chmelem nebo chmelovými výrobky. Je to tedy výstupní produkt chmelovaru ve stádiu před kvašením. (VERHOEF,1998) Jednotlivé zastoupení složek v mladině se odvíjí od použité výrobní technologie a výchozích surovin, mělo by však vždy odpovídat vyráběnému druhu piva. Veškeré technologické kroky výroby probíhají na tzv. mladinové lince. (KOŠAŘ, 2000)

3.2.3 Mladé pivo

Mladé pivo je prvním stupněm při výrobě piva. Vzniká po zakvašení zchlazené mladiny pivovarskými kvasnicemi během procesu hlavního kvašení, kdy dochází k využití velké části zkvasitelného extraktu metabolismem kvasnic. Po ukončení této fáze je mladé pivo sudováno anebo převáděno do ležáckých tanků, aby mohlo proběhnout tzv. dokvašování a zrání piva. (THOMSON, 2012)

3.2.4 Pivo

Dle vyhlášky č. 335/1997 Sb., kterou se provádí zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách, je „pivem pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, který vedle kvasným procesem vzniklého alkoholu (ethylalkoholu) a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu; slad lze do výše jedné třetiny hmotnosti celkového extraktu původní mladiny nahradit extraktem, zejména cukru, obilného škrobu, ječmene, pšenice nebo rýže; u piv ochucených může být obsah alkoholu zvýšen přidávkem lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů“. (Vyhláška 335/1997 Sb.)

3.2.5 Produkty Maillardovy reakce a enzymatického hnědnutí

Mezi nejběžnější a nejdůležitější chemické reakce probíhající během výroby a skladování piva patří reakce redukujících sacharidů s aminosloučeninami. Během těchto reakcí dochází ke vzniku mnoha velmi reaktivních karbonylových sloučenin, které vstupují do vzájemných reakcí stejně tak jako do reakcí s přítomnými aminosloučeninami. Soubor těchto reakcí se nazývá souhrnně Maillardova reakce. Také se těmito reakcím říká neenzymové hnědnutí a to díky vzniku hnědých pigmentů, melanoidů. (VELÍŠEK et. al., 2009)

Produkty Maillardovy reakce jsou v počáteční fázi převážně glykosilaminy – Amadoriho produkty, až imin - Schiffova báze. Ve střední fázi dochází ke vzniku aktivních aldehydů a amoniaku. Streckerovy aldehydy se spolu s α - aminokarbonylovými sloučeninami významnou měrou podílejí na tvorbě mnoha heterocyklických sloučenin a hnědých pigmentů, melanoidinů. Jedná se převážně o premelanoidy neboli bezbarvé látky, ze kterých se barevné stávají až v poslední fázi reakce. Významnými vonnými a chuťovými látkami jsou cykloten, furaneol, 3-methylbutanal, methional, dimethylsulfid, 5-methylfuran-2-karbaldehyd, S-methyl- L -methionin a další. (VELÍŠEK, 2014)

Jedna z nejdůležitějších reakcí ovlivňujících barvu výsledného produktu je enzymové hnědnutí. (VELÍŠEK, 1999) V tomto případě se jedná o proces, který je žádoucí, kdy se utváří konečný vzhled vyráběného piva. K reakci dochází při mechanickém poškození buněk, kdy se k polyfenolovému substrátu obsaženému v buňkách dostává vzdušný molekulový kyslík. Jedná se o oxidační, respektive dehydrogenační reakci polyfenolů katalyzované enzymy. (MARSHALL, 2000) Při těchto reakcích jsou nejčastějšími donory vodíku sloučeniny, které obsahují funkční skupinu dihydroxybenzenu, neboli o-difenolu. Enzymově katalyzované

dehydrogenace těchto látek jsou obvykle velmi rychlé a vznikají při nich o-chinony, typické svým hnědým zbarvením. Velice snadno polymerují. (VELÍŠEK et. al. 2009)

3.3 Konvenční analytické metody

Následující kapitola je věnována vybraným osvědčeným analytickým metodám, které se v pivovarské analytice úspěšně využívají již řadu let.

3.3.1 Odběr vzorků mladiny a piva

3.3.1.1 Mladiny

Každý vzorek mladiny určený k analýze musí reprezentovat hodnotu rozpuštěného extraktu společně s nerozpustnými částicemi např. kaly, kvalitu celého kontrolovatelného množství, obvykle jedné várky. Pro odběr se používají skleněné láhve s kvalitním uzávěrem a plní se až po okraj. Je potřeba vzorky před odebráním nejprve důkladně promíchat, je-li to technologicky možné. Odebrané vzorky mladin mají nízkou trvanlivost, proto se musí urychleně zpracovat. (BASAROVÁ, 1993)

3.3.1.2 Nefiltrované pivo

Pro fyzikálně chemický rozbor se odebírají během výroby vzorky mladého piva, piva v ležáckých tancích a před filtrem, tedy nefiltrovaného piva, a to tak aby reprezentovaly výrobní partii. Běžně se používají vzorkovací láhve půllitrové nebo litrové. Vzorky se odebírají z tanků, ležáckých sudů a velkoobjemových kvasných nádob vzorkovým kohoutem po celou dobu stáčení jedné šarže. Pokud je potřeba zachovat obsah oxidu uhličitého například pro stanovení CO₂, pěnivosti, koloidní stability apod. musí se vzorky odebírat speciálními odběrovými zařízeními. Je potřeba vzorky rychle zpracovat nebo uchovat v chladničce a zanalyzovat je do 24 hodin. (BASAROVÁ, 1993)

3.3.1.3 Stočené pivo

Ke kontrole jakosti a hygienické nezávadnosti jsou vzorky stočeného piva odebírány přímo v závodě ihned po stočení do přepravních nádob nebo ze skladů hotových výrobků.

Základní kontrolovanou jednotkou je zde partie piva. Jedná se o množství piva z jednoho uzavřeného tanku. Odpovídá produkci z jedné směny či pracovního dne. Odběr vzorků má být

v zásadě organizován tak, aby odpovídal vlastnostem a průměrné kvalitě kontrolované partie piva. (BASAROVÁ, 1993)

U lahvového piva se odebírají vzorky v den plnění přímo z pásu za zátkovačkou, ze skladu nebo za pastérem nejpozději druhý den po stočení. Dle normy se bere nejméně 5 lahví, aby byl dostatek pro všechny analýzy a určitá zásoba v případě nutnosti opakovat dané stanovení.

Sudové pivo se vzorkuje suchou, sterilní kovovou jehlou. Nejprve se nechá první podíl odtéct a teprve potom se odebere vzorek. Připravuje se průměrný vzorek smícháním vzorků minimálně ze tří sudů a plní se do sterilních lahví s patentním uzávěrem. U Keg sudů se používá čepovací zařízení s odběrovým kohoutem. V případě přepravních tanků se bere vzorek z každého tanku a to minimálně dvě láhve. (BASAROVÁ, 1993)

3.3.2 Metody pro stanovení extraktu

Destilační a refraktometrickou metodou se stanovuje zdánlivý a skutečný extrakt, alkohol a původní extrakt mladiny. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda destilační

Principem destilační metody je pyknometrické stanovení hustoty destilátu, po vydestilování alkoholu ze vzorku piva, a dle tabulek relativních hustot vodných roztoků ethanolu zjistit hmotnostní zlomek v pivě. Zbytek po oddestilování alkoholu se používá pro stanovení skutečného extraktu a poté se ze získaných údajů vypočítá hmotnostní zlomek konvenčního extraktu. Používají se pykometry typu Reischauer. Destilační metoda není vhodná pro stanovení ethanolu nealkoholických a nízkoalkoholických piv.

U nealkoholických a nízkoalkoholických piv se využívá oxidace ethanolu ve vzorcích na acetaldehyd nikotinamidnukleotidem za přítomnosti alkoholdehydrogenasy. Poté se na základě vzestupu hodnot absorbance měřené při 340 nm stanoví NADH, který vznikl při reakci redukcí NAD^+ . Pro stanovení se používá spektrofotometr a přesnost metody je kontrolována analýzou vodného roztoku ethanolu o koncentraci 0,05 % hm. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda refraktometrická

Refraktometrická metoda, která je rychlejší než destilační, ale méně přesná, využívá zjištěnou refrakci a relativní hustotu piva pro sestavení regresní rovnice či nomogramu, díky kterým lze vypočítat hodnoty alkoholu, extraktu původní mladiny a skutečného extraktu.

Pro stanovení refrakce se používá ponorný refraktometr s přesností plus minus 0,1 refraktometrického stupně anebo průtokový refraktometr. (BASAROVÁ, 1993)

3.3.3 Metoda podle Windische a metoda spektrofotometrická (jodová hodnota)

Vedle klasické jodové zkoušky se obě metody používají pro kontrolu zcukření při rmutování.

Metoda dle Windische

Metoda dle Windische je založena na vysrážení dextrinů sladiny, mladiny nebo piva ethanolem. Po odstředění vzniklé sraženiny se rozpustí v horké vodě a mísí s roztokem jodu a následně se posuzuje zbarvení od žlutého, které značí dokonalé zcukření, přes hnědé, což značí nedokonalé zcukření až po fialové a modré, které je znakem špatného zcukření. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

Metoda spektrofotometrická

Spektrofotometrická metoda je v přípravě vzorku stejná, ale intenzita zbarvení se hodnotí spektrofotometricky. Výsledná jodová hodnota je bezrozměrné číslo, které má dosahovat hodnot menších jak 0,200, Pokud jsou hodnoty vyšší, ukazuje to na nedostatečné rozštěpení škrobu při rmutování. Jestliže hodnoty přesahují 0,700, vyskytují se problémy při čištění a filtraci. (BASAROVÁ, 1993)

3.3.4 Metoda kvasného válce

Metoda se dá použít pro stanovení zdánlivého a dosažitelného stupně prokvašení, jehož hodnota je závislá na obsahu zkvasitelných sacharidů a na podmínkách při kvašení a dokvašování. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

Metoda kvasného válce spočívá v zakvašení mladiny či piva kvasinkami ve válci, který je uzpůsobený k co nejlepšímu míchacímu efektu působením oxidu uličitého, který vzniká při kvašení. Vzorek je prokvašen do 24 hodin a poté se z rozdílu hodnot extraktu před a po

prokvašení spočítá hodnota dosažitelného stupně prokvašení. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

3.3.5 Metody pro stanovení dusíkatých látek

Možnosti stanovení dusíkatých látek především v mladině, ale i pivu jsou široké a liší se dle molekulární struktury jednotlivých sloučenin. Stanovuje se: celkový počet rozpuštěných dusíkatých látek, stanovení varem koagulovatelných dusíkatých látek, vysolitelných síranem hořečnatým, srazitelných kyselinou fosfomolybdenovou, stanovení nízkomolekulárních dusíkatých látek, amonných solí, aminokyselin a dalších. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

Metoda ninhydrinová

Principem je dekarboxylace aminokyseliny ninhydrinem při pH 6,7, kdy dojde k odštěpení amoniaku, oxidu uličitého a vzniku aldehydu. Uvolněný amoniak reaguje se zredukovaným a nezredukovaným ninhydrinem za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení se měří na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. (BASAROVÁ, 1993; KRÜGER et. al., 1976)

Metoda TNBS

Principem je použití kyseliny trinitrobenzensulfonové, která reaguje s volným aminodusíkem za vzniku žlutého zbarvení. Intenzita zbarvení se měří opět spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda formolové titrace

Karboxylové skupiny aminokyselin a nízkomolekulárních peptidů mohou díky blokaci aminoskupin formaldehydem volně disociovat. Vznikají sloučeniny, které lze titrovat hydroxidem sodným jako běžnou kyselinu organického původu. Využívá se potenciometrické titrace k určení bodu ekvivalence, kvůli silnému zbarvení mladiny/ piva. (BASAROVÁ, 1993; KRÜGER et. al, 1976)

Metoda elektrochemická

Elektrochemická metoda se používá pro stanovení amonných solí. Veškerý amoniak je v pivu a mladině disociován, zvýšením pH na 11 dojde k posunutí rovnováhy a potenciál amoniaku se měří elektrodou a následně přepočítává dle Nernstovi rovnice. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda dělení na měničích iontů

Principem metody, která se využívá převážně na stanovení aminokyselin, je zachycení směsi aminokyselin na povrch silně kyselého měniče kationtů a vymytí ostatních látek z kolony díky tak nízkému pH. Postupně se z měniče uvolňují a eluují jednotlivé aminokyseliny gradientem tlumivých roztoků a to ve chvíli, kdy aminokyselina přejde na amfoterní ion. Díky rozdílnosti izoelektrických bodů u každé aminokyseliny je přechod na amfoterní ion časově odlišný. Částice vstupují do reakce s ninhydrinovým činidlem a poté je spektrofotometricky měřena intenzita zbarvení při vlnové délce 570 nm a pro hydroxyprolin a prolin při vlnové délce 440 nm. (BASAROVÁ, 1993; KRÜGER et. al., 1976)

3.3.6 Metody pro stanovení sacharidů a polysacharidů

V pivu i mladině jsou důležitá stanovení celkových sacharidů, zkvasitelných sacharidů jako je glukosa, fruktosa, sacharosa, maltosa a maltotriosa, nezskvasitelných oligosacharidů, které nereagují s jodem a stanovení vyšších dextrinů.

Metoda fenolová

Účinkem kyseliny sírové se sacharidy obsažené v mladině či pivu dehydratují a vznikají tak furalové deriváty. Ve vzorku se po přidavku fenolu vytvoří s deriváty oranžový komplex, jehož zbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 488 nm. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda anthronová

Princip je zpočátku stejný jako u předchozí fenolové metody, avšak furalové deriváty vytvářejí v přítomnosti anthronu modrozelený komplex a jeho intenzita zbarvení se měří při vlnové délce 625 nm. (BASAROVÁ, 1993)

Stanovení celkových cukrů podle EBC

Metoda se používá pro filtrovaná piva, kdy se pivo odplyní a ředí destilovanou vodou, aby vznikl požadovaný rozsah koncentrace cukrů. Dále se využívá principu anthronové metody a podle hodnot absorbance standardních roztoků se vypočítají výsledky. (BASAROVÁ, 1993; Analytica EBC, 1975)

Schoorlova metoda

Používá se pro stanovení redukujících cukrů s volným poloacetalovým hydroxylem. Principem je redukce měďnaté soli (Fehlingova roztoku) redukujícími cukry a to za varu v alkalickém prostředí, vzniká oxid měďný. Jodometricky se poté stanoví přebytek měďnaté soli. (BASAROVÁ, 1993)

Mezinárodní metoda stanovení cukrů technikou HPLC

Principem je deionizace mladiny či piva iontoměničiči, dále se vzorek filtruje a zkoncentruje. Poté se rozdělí chromatograficky a jednotlivé cukry se stanovují pomocí kalibračních standardních roztoků. Používá se chromatogram pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s refraktometrickým detektorem. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda mikrobiálními testy

Díky diferencovanému zkvašování jednotlivých cukrů různými druhy kvasinek můžeme určit zbytkové extrakty a dle nich vypočítat koncentrace daných cukrů v původní mladině nebo pivu. Vyšší dextriny jsou nezkvašeny. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda podle Heidricha

Využívá se pro stanovení α – glukánů. Principem je vysrážení bílkovin a dextrinů etanolem a po separaci jsou rozpuštěny v destilované vodě. Poté se přidá roztok jodu a přítomné α – glukany s ním reagují za vzniku buď červeného komplexu odpovídajícímu větveným α – glukánům, který se měří spektrofotometricky při 452 nm, nebo modrého komplexu odpovídajícímu lineárním α – glukánům a jeho intenzita zbarvení je měřena při 565 nm. (BASAROVÁ, 1993)

Metody pro stanovení β – glukánů

Principem jednoduchého orientačního stanovení je vysrážení β – glukánů síranem amonným. Následně jsou hydrolyzovány kyselinou sírovou a sacharidy, které se uvolnily, jsou stanoveny spektrofotometricky reakcí s kyselinou fenolsírovou, či enzymovým testem Bio-La-Test. (BASAROVÁ, 1993)

Další možné stanovení je enzymové, kde se β – glukany také vysrážejí síranem amonným, vzniklá sraženina se promyje a hydrolyzuje čistými enzymy lichenasou a β – glukosidasou a dále se uvolněný sacharid stanovuje enzymově. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda podle Jägera

Metodou se stanovují pentosany v pivu i mladině. Z pentosanů působením zředěné kyseliny chlorovodíkové je získán 2 – Furaldehyd. Ten je oddestilován a vysrážen kyselinou barbiturovou a stanoven vážkově. (BASAŘOVÁ, 1993)

3.3.6 Metody pro stanovení polyfenolů

Metoda stanovení celkových polyfenolů podle EBC

V alkalickém roztoku reagují polyfenoly s železitými ionty za vzniku červeného barevného komplexu. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. (BASAŘOVÁ, 1993; Analytica EBC, 1975)

Metoda podle Harrise a Ricketse

Metoda se používá pro polyfenolové sloučeniny anthokyanogeny, které mají velký vliv na tvorbu koloidních zákalů. Na polyamidový prášek se adsorbují anthokyanogeny a absorbát je rozpuštěn za tepla ve směsi butanolu a kyseliny chlorovodíkové. Spektrofotometricky změříme intenzitu vzniklého červeného zbarvení při vlnové délce 550 nm. (BASAŘOVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

Metoda podle Chapona

Do vzorku, který obsahuje tanoidy se přidá polyvinylpyrrolidon a vzniká zákal, dokud se neabsorbují všechny tanoidy. Zákal se měří nefelometricky. (BASAŘOVÁ, 1993)

Metoda chromatografická

K měření polyfenolových látek piva i mladiny se používá vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Látky se adsorbují na polyamidovém sorbentu, poté se roztokem acetonu extrahují, zahustí se a vzniklý roztok se znovu extrahuje ethylacetátem. Před vlastní analýzou je izolát rozpuštěn v malém množství methanolu. (BASAŘOVÁ, 1993)

3.3.7 Metody stanovení hořkých látek

Stanovení jednotek hořkosti podle EBC

Principem je extrakce hořkých látek z okyseleného piva isooktanem a poté jejich stanovení spektrofotometricky. Stanovují se především iso – α – hořké kyseliny. (BASAŘOVÁ, 1993; Analytica EBC, 1975)

Metoda stanovení iso – α – hořkých a α – hořkých kyselin

Principem je opět extrakce hořkých látek z okyseleného piva izooktanem, vymytí rušících látek z extraktu kyselým methanolem a výsledná koncentrace kyselin je stanovena změřením absorbance v alkalickém methanolu při 255 a 360 nm. (BASAROVÁ, 1993)

3.3.9 Metoda vážková pro stanovení celkových lipidů

Principem je přidání trichlormethanu, methanolu a vody do vzorku mladiny či piva, jeho důkladné protřepání a po oddělení trichlormethanové fáze a odpaření rozpouštědla se lipidy stanovují vážkově. (BASAROVÁ, 1993)

3. 3. 10 Metoda elektrochemická – stanovení rozpuštěného kyslíku

Veškeré elektrochemické metody pro stanovení rozpuštěného kyslíku fungují na principu redukce jeho molekul, jež přecházejí difúzí z měřeného vzorku na elektrodu, která je katodicky polarizovaná. Proud vznikající při měření je přímo úměrný parciálnímu tlaku kyslíku. Pokud známe maximální rozpustnost kyslíku v měřené kapalině při dané teplotě, můžeme určit koncentraci kyslíku přímo. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

3. 3. 11 Metody stanovení oxidu uhličitého

Metoda absorpční

Ve zváženém množství hydroxidu draselného se absorbuje oxid uhličitý, který se z piva uvolní varem. Takže hmotnostní přírůstek hydroxidu draselného odpovídá množství oxidu uhličitého v analyzovaném pivu. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda manometrická podle Robertse, Laufera a Stewarda, modifikovaná Hummelem

Metoda vychází z použití Henryho zákona a zároveň z hodnot parciálního tlaku vzduchu. Principem metody je, že se obsah oxidu uhličitého v pivě určuje z naměřených hodnot tlaku v láhvi, obsahu vzduchu v hrdlovém prostoru a objemu hrdlového prostoru nad hladinou piva v lahvi. V byretě se po absorpci uvolněného CO₂ ze vzorku v roztoku hydroxidu sodného odečte množství vzduchu v hrdlovém prostoru. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda titrační – jednoduchá provozní

Po přidání roztoku hydroxidu sodného do vzorku piva se na něj naváže oxid uhličitý jako uhličitan nebo hydrogenuhličitan sodný. Přídavkem roztoku chloridu barnatého vzniká uhličitan barnatý, který je nerozpustný a poté se zpětnou titrací na thymolftalein kyselinou

chlorovodíkovou zjistí množství hydroxidu sodného, které nebylo spotřebováno. (BASAROVÁ,1993)

Metoda titrační podle Bloma a Lunda

Oxid uhličitý obsažený v pivu se po přidání hydroxidu sodného vážně jako uhličitán sodný. Přídavkem kyseliny chlorovodíkové se oxid uhličitý z alikvotní části piva upraveného hydroxidem sodným opět uvolní a je veden proudem vzduchu do roztoku hydroxidu barnatého. Obsah oxidu uhličitého v pivu můžeme stanovit zpětnou titrací nespoteřovaného hydroxidu barnatého. (BASAROVÁ,1993)

3. 3. 12 Metody stanovení pěnivosti piva

Metoda podle Schustera a Mischkeho

Uvolněním oxidu uhličitého z piva po vsypání práškového karborunda za standardních podmínek se vytvoří pěna, dále se měří rychlost jejího poklesu. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda podle De Clercka

Vytemperované pivo na teplotu 12 °C je nalito do sklenice a měří se doba, za kterou se vzniklá pěna sníží o 1 cm. Pro pozorování se používá mikroskop s dvacetiosminásobným zvětšením. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda podle Ullmanna a Pfenningera

Principem je měření doby do vytvoření lysinky na hladině piva, které bylo za standardních podmínek nalito do sklenice. Pokud se objeví po pěti minutách, znamená to dobrou pěnivost. Metoda je ryze orientační. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda podle Kloppera

Principem je určení doby, za kterou dojde k poklesu hladiny pěny piva o 10, 20 a 30 mm. Pokles je snímán pohyblivým systémem elektrod. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

Rychlometoda podle Šavla

Ve skleněné nádobě se standardním způsobem napění dané množství piva v ultrazvukové lázni anebo pádem ze zvláštní nálevky. Je sledován pohyb rozhraní mezi kapalinou a pěnou. Čas od napěnění do dosažení zvolené polohy rozhraní je roven době částečného rozpadu pěny, a proto charakterizuje pěnivost piva. (BASAROVÁ, 1993)

3. 3. 13 Měření čirosti

Nefelometricky se určuje čirost, zákal čerstvě zfiltrovaného piva v kyvetě nebo přímo v láhvi. Pokud je čirost měřena přímo v láhvi, násobí se získané hodnoty opravným faktorem, který je určen kalibrací standardních formazinových roztoků. (BASAROVÁ, 1993; KLOUDA, 2003)

3. 3. 14 Metoda podle Essera

Metodou podle Essera lze stanovit filtrovatelnost piva. Principem je izobarické přefiltrování vytemperovaného piva na teplotu 0 °C přes membránový filtr. Periodicky se přitom zjišťují množství filtrátu, jež jsou podkladem pro výpočet hodnoty, která určuje filtrovatelnost piva. (BASAROVÁ, 1993; EBLINGER, 2009)

3. 3. 15 Kontrola pasterace

Díky obsahu enzymu invertasy v nepasterovaném pivě, který je inaktivován při teplotách vyšších než 60 °C, můžeme posoudit, zda bylo pivo pasterováno. Posuzuje se zbytková aktivita enzymu, která je vyjádřena v g rozštěpené sacharosu jednotkovým objemem analyzovaného piva během jedné hodiny. (BASAROVÁ, 1993)

3. 3. 16 Metody stanovení vedlejších kvasných produktů

Jedná se o metabolity procesu kvašení, které pivu dávají typické organoleptické vlastnosti, avšak je při vyšší koncentraci mohou i měnit. Patří mezi ně aromatické a vyšší alifatické alkoholy, estery, nižší mastné kyseliny, thioly, sulfidy a karbonylové sloučeniny a další. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda Headspace – plynová chromatografie

Pro určení lehce těkavých sloučenin se používá možnost přímého nástřiku par, které jsou odebrány za standardních podmínek z prostoru nad kapalinou. Koncentrace těchto látek v plynné fázi je stejná jako jejich koncentrace v kapalné fázi. K detekci se používá plamenoionizačního detektoru, pokud stanovujeme alkoholy, estery nebo aldehydy. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda destilační – plynová chromatografie

Po destilaci vodní parou se těkavé sloučeniny z destilátu extrahují organickým rozpouštědlem, v kterém se špatně rozpouští ethanol. Po odstranění nadbytku rozpouštědla je získán koncentrát, který je použit k chromatickému dělení. (BASAROVÁ, 1993)

Metoda spektrofotometrická – stanovení vyšších alifatických alkoholů

Vyšší alifatické alkoholy reagují v prostředí koncentrované kyseliny sírové s dimethylaminobenzaldehydem za vzniku žluto – hnědého až červenofialového zbarvení. Jeho intenzita je měřena při 530 nm vlnové délky. (BASAROVÁ, 1993)

3. 3. 17 Metody pro stanovení dusitanů a dusičnanů

Vzorek piva či mladiny je vyčereň hexakynoželeznatanem tetradraselným. Dusičnany jsou zredukovány na dusitany kadmiovou houbou. Poté jsou dusitany kvantitativně stanoveny spektrofotometricky po diazotaci kyseliny sulfanilové a kopulaci diazoniové soli α – naftylaminem. (BASAROVÁ, 1993)

Po odebrání se vzorek mladiny, mladého piva či piva musí ihned konzervovat roztokem chloridu rtuťnatého a jeho pH je upraveno přibližně na hodnotu 6,5. Před stanovením je nutné vzorek odbarvit aktivním uhlím a poté jsou dusitany stanoveny stejně jako v předchozí metodě. (BASAROVÁ, 1993)

3.4 Moderní analytické metody

Následující kapitola je zaměřena převážně na nové a výkonnější metody přípravy a úpravy vzorků, separační metody – plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

3.4.4 Příprava vzorků

3.4.1.1 SPE – solid phase extraction

Solid phase extraction neboli extrakce pevnou fází je jedna z nejvýkonnějších technik pro rychlou a selektivní přípravu vzorků. Podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, který je umístěn mezi fritami v extrakční minikolonci a skrz prochází vzorek. (ŠTĚRBA et. al., 2011) Využívá se jedinečných chemických vlastností molekul, které jsou díky mezimolekulovým interakcím zachyceny na sorbentu. Z toho důvodu můžeme extrakci

pevnou fází také nazvat jako chemickou filtraci. (KLOUDA, 2003) Metoda se málokdy používá bez další úpravy vzorků, jako je například ředění či úprava pH. (SIMPSON, 2010)

Samotný postup je složen ze šesti základních kroků: příprava vzorku před extrakcí, solvatace kolonky, předrovnovážná úprava kolonky, aplikace vzorku, promývání kolonky a eluce analytu z kolony – selektivní desorpce vhodným rozpouštědlem. (KLOUDA, 2003; SIMPSON, 2010; ŠTĚRBA et. al, 2011)

Oproti tradičním separačním technikám, mezi něž patřila hlavně extrakce v soustavě kapalina – kapalina, extrakce pevnou fází poskytuje mnoho výhod a to hlavně dobrou selektivitu a úsporu organických rozpouštědel. Je snadné SPE automatizovat a navázat na další instrumentální metody. Využití je různé například pro čištění látek, derivatizaci vzorku, zkoncentrování stopových množství látek nebo i výměnu rozpouštědel, kdy analyt je převeden z jedné matrice do druhé. (KLOUDA, 2003) Využití extrakce na pevné fázi je především ve spojení s kapalinovou a plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií pro stanovení například polyfenolů, mykotoxinů, aldehydů, aromatických a jiných těkavých látek v pivu. (SAISON, 2010; ABAD-GARCÍA, 2007)

3.4.4.2 MEPS – microextraction by packed sorbent

Mikroextrakce na pevném sorbentu je vlastně miniaturizovaná SPE se kterou jako první přišel Mohamed Abdel - Rehim z farmaceutické společnosti AstraZeneca. (ABDEL-REHIM, 2004) MEPS je vlastně novým typem SPE postupu, který miniaturizuje objem extrahovaného vzorku na množství 10 - 250 μ l. MEPS, který je dostupný komerčně využívá stejných sorbentů, jako konvenční SPE kolonky, takže se většinu extrakcí na tuhý sorbent lze převést na tento nový postup.

Výhodami mikroextrakce na pevném sorbentu je především její jednoduchost, online automatizace, rychlost přípravy vzorků, diametrálně nižší cena analýzy oproti tradiční SPE, extrakce z menších objemů vzorku, velice nízká množství rozpouštědel. Velice důležitým kladem této metody je fakt, že eluční objem je díky své velikosti vhodný k přímému nástřiku do systému plynové či kapalinové chromatografie. Dobře lze využít například pro analýzu nižších mastných kyselin v pivě. (HORÁK et. al., 2011)

3.4.4.3 SPME – solid phase microextraction

Mikroextrakce pevnou fází je velice rychlá a citlivá technika, která umožňuje snížit dobu na přípravu vzorku a to především tím, že nevyžaduje použití rozpouštědla. Je možné s ní dosáhnout velmi dobrých detekčních limitů. (PAWLISZYN, 1999) Techniky se uspokojivě využívá při detekci síry a sloučenin selenu, alkoholů a esterů, aldehydů, polyfenolů a k vytvoření obecného profilu těkavých látek v pivu. (MOHAMMAD et. al., 2014)

Základním principem SPME je použití velmi malého množství sorbentu, obvykle méně než 1 μL . Sorbent může být polymerní kapalina o vysoké molekulární hmotnosti, obdobné povahy jako stacionární fáze v chromatografii, nebo tuhý vysoce porézní sorbent či kombinace obou. (PIZARRO, 2010) Nejpraktičtější geometrická konfigurace SPME je použití malého křemenného vlákna, obvykle potaženého polymerní stacionární fází. (DIETZ et. al., 2006) Vlákno je namotáno na speciálním zařízení – stříkačku. Analyzovaný vzorek je absorbován či adsorbován vláknem, záleží na povaze sorbentu, kterou je potaženo, a to trvá do té doby, dokud není dosaženo rovnováhy v systému. (PAWLISZYN, 1999)

Množství extrahovaného analytu extrakční fází je určeno distribučním poměrem mezi maticí vzorku a materiálem, který je nanášen na vlákno. (PAWLISZYN, 1999)

Dále je analyt termicky desorbován do vhodného separačního a detekčního systému, obvykle je to plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. (DIETZ et. al., 2006; ŠTĚRBA et. al, 2011)

Nejběžnějšími vlákny, která se používají pro stanovení těkavých látek v pivu, jsou (ŠTĚRBA et. al., 2011):

- polyakrylát (PA) – středně polární
- divinylbenzen/Carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS)
- Carboxen/polydimethylsiloxan (CAR/PDMS)
- Carbowax/divinylbenzen (CW/DVB)
- polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB)
- polydimethylsiloxan (PDMS) – nepochární

Hlavní výhodou SPME techniky oproti extrakci na tuhou fázi je jednoduchost použití s prakticky nulovou přípravou vzorku, a především to, že zachycuje v headspace uspořádání pouze těkavé látky. Jako vše má i tato metoda své nevýhody, mezi které obecně patří špatná reprodukovatelnost, křehkost vlákna, možná kompetitivní sorpce na vláknech (ŠTĚRBA et. al. 2011), náklady na použití, ale největší nevýhodou je omezený rozsah stacionárních fází, které jsou komerčně dostupné. (DIETZ et. al, 2006)

3.4.5 Chromatografické metody v kombinaci s hmotnostní spektrometrií

3.4.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie HPLC – MS (High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry), tedy separačních a spektrálních technik, zaznamenalo v posledních letech velký pokrok. Nejprve se směs látek rozdělí konvenční chromatografií na kolonu. Obvykle je použita chromatografie s reverzní fází, kde se látky váží hydrofobními interakcemi na kolonu za přítomnosti hydrofilního rozpouštědla například vody a jsou eluovány pryč díky rozpouštědlu, které má více hydrofobní vlastnosti například metanol nebo acetonitril. Na řadu přichází druhý krok, kde se analyzované látky objevují na výstupu kolony a dále vstupují do hmotnostního spektrometru. Zde je odstraněn přebytek rozpouštědla a částice jsou ionizovány. Vzhledem k tomu, že detektor dokáže pracovat pouze s ionty a ne neutrálními molekulami, je ionizace nepostradatelným krokem. Získáváme tak strukturní informace o všech sloučeninách. Hmotností spektrometrie funguje za vysokého vakua, kdežto na výstupu z chromatografu jsou látky nesené proudem kapaliny za atmosférického tlaku. Správné převedení analyzovaných látek do plynné fáze a odstranění přemíry mobilní fáze patří k hlavním problémům spojení HPLC – MS. (HOLČÁPEK et.al, 1998; NAUSHA et. al. 2014; NIELSEN, 2010, JEŽKOVÁ, 2009)

Iontové zdroje hmotnostní spektrometrie

Termosperj (TSP)

Eluát je při ionizaci termosprejem veden po výstupu z chromatografické kolony vyhřívanou kapilárou, v níž dochází k částečnému odpaření rozpouštědla a na výstupu z kapiláry se tvoří nadzvukový proud směsi tvořené částečně odpařeným rozpouštědlem a malými, elektricky nabitými kapičkami. Díky dalšímu odpařování rozpouštědla, dochází k rychlému nárůstu hustoty povrchového náboje kapiček, až do chvíle kdy dojde k uvolnění kvazimolekulárního

iontu z jejich povrchu. Vznik iontů lze podpořit přidáním iontové látky do mobilní fáze. Pokud zvýšíme napětí na odpuzovací elektrodu, můžeme tak podpořit fragmentaci látek a také citlivost detekce. (VERNER, 2005)

Elektrosprej (ESP) a iontový sprej (ISP)

Eluát prochází při ionizaci elektrosprejem po výstupu z chromatografické kolony kapilárou, na níž je vysoké napětí (3-5 kV), tudíž malé kapičky, které vznikají na výstupu z kapiláry, jsou vlivem vysokého gradientu elektrického pole nositeli kladného nebo záporného náboje dle polarit vložení napětí na kapiláru. Po dalším odpařování rozpouštědla dojde ke zmenšení kapiček a zároveň ke zvětšení hustoty povrchového náboje a to do té doby, než dojde k rozpadu na menší kapičky a nakonec k uvolnění protonovaného molekulárního iontu $[M+H]^+$ nebo aduktu molekuly se sodným iontem $[M+Na]^+$ v případě snímání kladných iontů a deprotonovaný iont $[M-H]^-$ při snímání záporných iontů. Ionty, které jsou fragmentované bývají často málo intenzivní nebo zcela chybí. (VERNER, 2005; SMYTH, 1999)

Iontový sprej je modifikací elektrospreje. Využívá pneumatického zmlžovače umístěného na konci kapiláry pro snadnější zmlžení eluátu. (VERNER, 2005)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Iontový zdroj je u APCI uspořádán obdobně jako u ESP, avšak s tím rozdílem, že na kapiláře není vloženo napětí a u jejího konce je umístěna výbojová jehla (elektroda). Eluát je pneumatickým zmlčovačem rozprašen na konci kapiláry. Vzniká aerosol, který je v rychlosti odpařen v krátké zóně vyhřívané na teplotu až 600 °C. Díky napětí, jež bylo vloženo na výbojovou jehlu, dochází ke vzniku koronárního výboje, tím jsou ionizovány molekuly mobilní fáze přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu. Molekuly analytu jsou následně ionizovány reakčním plynem, tedy ionty vzniklé z mobilní fáze, podobně jako při klasické chemické ionizaci. (VERNER, 2005; STEVENS, 1999)

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice se obvykle používá pro analýzu proteinů a dalších makromolekul. Nejdříve se vzorek smísí s organickou kyselinou, ta snadno absorbuje energii laseru, a následně se vysuší. V procesu ionizace, do kterého je zahrnut krátký intenzivní puls laseru, dochází k zahřátí a desorpci matrice a analytů. Zároveň je

ionizována matrice (organická kyselina), která je donorem náboje pro analyt. Díky vakuu, ve kterém proces probíhá, není potřeba řešit problém s přenosem iontů mezi atmosférickým tlakem a provozním vakuem analyzátoru. (FRIEDECKÝ, LEMR, 2012)

Hmotnostní analyzátory

Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole – Q)

Kvadrupól je jeden z nejrozšířenějších hmotnostních analyzátorů, jehož výhodou jsou nižší pořizovací náklady než u jiných analyzátorů. (FRIEDECKÝ, LEMR, 2012) Obsahuje kombinaci čtyř rovnoběžných tyčových elektrod, na které je přiváděna složka střídavého a stejnosměrného napětí. Ionty určité hodnoty m/z , což je poměr hmotnosti ku náboji, mají stabilní trajektorii vedoucí k detektoru, popř. další části analyzátoru, a to na základě nastavení hodnot stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku. (KLOUDA, 2003; FRIEDECKÝ, LEMR, 2012) Ionty, jež mají nestabilní trajektorii, jsou vychýleny a k detektoru se nedostanou. Ve směru axiální osy je pohyb iontů umožněn díky gradientu napětí napříč jednotlivými částmi hmotnostního spektrometru. Analyzátoru lze využívat ve dvou režimech. První skenovací režim funguje při kontinuálních změnách elektrického pole, což umožňuje proměřit všechny hodnoty m/z v krátkém časovém úseku. Zahrnuje informace o všech vzniklých iontech, ale je méně citlivý. Naproti tomu druhý tzv. SIM, single ion monitoring, pracuje za speciálního nastavení elektrického pole kvadrupólu, kdy je dovoleno projít pouze iontům s danou velikostí m/z . SIM režim se naopak využívá pro citlivou kvantifikaci předem zvolených látek (FRIEDECKÝ, LEMR, 2012)

Průletový analyzátor, detektor doby letu - TOF

Detektor doby letu neboli TOF – „*time of flight*“ patří mezi nejrychlejší a nejjednodušší, protože kompletně celý vzorek je akcelerován najednou. (KLOUDA, 2003) Ionty jsou urychlovány v jednotlivých pulzech elektrickým polem do evakuované letové trubice, kterou se pohybují směrem k detektoru. Oddělování a třídění iontů probíhá na základě vztahu mezi rychlostí pohybu iontů a m/z . TOF má lepší rozlišovací schopnost než kvadrupól. Často se využívá uspořádání za použití tzv. reflektoru (iontového zrcadla), které otáčí směr letu o téměř 180° , čímž se prodlouží dráha a i doba letu a zároveň kompenzují rozdíly v hodnotách kinetické energie iontů dané látky, což významně zlepšuje rozlišení iontů. (FRIEDECKÝ, LEMR, 2012).

3.4.2.3 Plynová chromatografie s detektorem doby letu a hmotnostní spektrometrií (GC/TOF-MS)

Plynová chromatografie

GC (Gass Chromatography) je separační metoda, kde mobilní fází je nosný plyn. Pro transport vzorku je důležitá jeho okamžitá přeměna na plyn. Látky analyzované touto metodou musejí mít dostatečný tlak syté páry, musejí být tepelně stálé, abychom je mohly přeměnit na plyny. Po separaci na stacionární fází jsou jednotlivé složky eluátu indikovány detektorem, jehož intenzita signálu a časový průběh analýzy umožňuje určení druhu a kvantitativní zastoupení jednotlivých složek ve vzorku. (KLOUDA, 2003; ŠTULÍK, 2004)

Spojení s TOF a MS

V kvasném průmyslu je běžné využívat hmotnostní spektrometrii s kvadrupólovým analyzátozem, tato metoda je však omezena možným množstvím vzorku piva. Proto se začala více testovat metoda plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s průletovým analyzátozem neboli detektorem doby letu (TOF – „time of flight“), což se ukázalo jako mnohem citlivější a komplexnější technologie. Zařízení TOF umožňuje, aby všechny ionty vstupující do letové trubice dorazily k detektoru bez filtrace. To má za následek větší citlivost, tudíž je možný záznam spekter i v plném „scan“ režimu. (BUKOWSKI, 2015)

Při použití TOF - MS v kombinaci s CG a vhodnou přípravou vzorků a zavedením techniky se dosahuje přesného a spolehlivého rutinního screeningu i stopových sloučenin.

Pro přípravu vzorků se využívá sorpční extrakce a následné tepelné desorpce, která má dostatečnou citlivost. Pro analýzu piva není velikost vzorku omezena a extrakční proces je snadný, bezpečný a proto může potenciálně zvládnout velké série vzorků najednou.

Dle studie, která byla provedena za účelem prokázat unikátní analytické schopnosti GC/TOF-MS, bylo zjištěno, že tato metoda je vhodná pro hloubkovou analýzu těkavých organických sloučenin v pivu. (BUKOWSKI, 2015)

3.4.2.4 Elektronický nos GC - GC/ MS

Principem technologie elektronického nosu je absorpce a desorpce těkavých sloučenin na soubor senzorů, to má za následek specifické změny elektrického odporu, které jsou měřeny na všech jednotlivých senzorech při styku se vzorkem. Elektronický nos je tím výkonnější

a přesnější, čím více měření podstoupil a čím více zkušeností se specifickou látkou (vůní, zápachem) má. Používá se tedy především v senzorické analýze. Jeho výhodou je rychlost, jednoduchost použití a především rychlost s jakou lze získat výsledky, jeho pořizovací cena je však poněkud vyšší. (Historie elektronického nosu, 2011; KELLER, 1998; ADAHCHOUR, 2008)

Funguje na biologickém modelu, který kopíruje činnost lidského nosu, konkrétně jeho receptorů pro vjem jednotlivých velikostně rozlišných molekul, ze kterých je pach složen. Vše je poté analyzováno a určeno neuronovou sítí. Dle typu přístroje, který elektronický nos má, existuje několik variant vzorkování: a) manuální vzorkování b) automatické vzorkování c) on-line vzorkování. (Technologický princip, 2011)

Elektronický nos využívá technologie plynové chromatografie, většinou ultra rychlé, k separaci vzorku na jednotlivé komponenty a poté hmotnostní spektrometrii pro stanovení elementárního složení jednotlivých částic či sloučenin. Konečnou fází je rozpoznávání vzorků, které zaručuje neutronová síť. Je to výpočetní model, který se hojně využívá v umělé inteligenci. Modelem je jí chování struktur biologické povahy. Využívá se pro distribuované paralelní zpracování dat. Podobně jako je tomu v našem organismu, je i umělá síť složena z jednotlivých neuronů, které si vzájemně předávají signál a ty jsou jimi transformovány díky specifickým přenosovým funkcím. (Neuronová síť, 2011)

V poslední době se pracuje především na redukci velikosti, pořizovací ceny a zvýšení citlivosti jednotlivých senzorů pro více druhů analyzovatelných látek. Vůbec nejmenší verzí tohoto přístroje je nos-on-a-chip, který má v jediném počítačovém čipu zahrnutý jak senzory, tak zařízení na rozpoznávání vzorků. (BARANAUSKIENÉ et. al, 2005)

V pivovarsko – sladařské analytice lze elektronického nosu využít převážně pro stanovení vedlejších chutí a to jak ve sladu, chmelu i v hotovém pivu, dokáže identifikovat i výrobce. (TAN T LUCAS et. al., 1995)

3.4.3 Metody molekulové spektroskopie

3.4.3.1 Spektroskopie v blízké infračervené oblasti – NIR

NIR („near-infrared spectrometry“) patří do skupiny metod molekulové spektroskopie, která pracuje se spektrální oblastí blízkého infračerveného záření, tj. oblast vlnových délek 800 – 2500 nm resp. vlnočtů 12500 – 4000 cm^{-1} . Takže oblast NIR z jedné strany navazuje na

viditelnou oblast a ze strany druhé na střední infračervenou. Podle různých zdrojů informací hranice fluktuují, protože nejsou zcela ostré. (MCLEOD et. al, 2009) Děje se tak v závislosti na tom, jestli se hranice definují z možností spektrometrů pokrýt danou oblast, nebo z druhu energetických přechodů, jež se v určité oblasti pozorují. Absorpci záření v NIR oblasti nejčastěji způsobují energetické přechody mezi vibračními hladinami molekul, hlavně přechody kombinačními a svrchními tóny. Je třeba používat kyvet s delší optickou dráhou a to proto, že absorpce záření v NIR oblasti je kvůli kombinačním přechodům i svrchním tónům slabší než např. při přechodech fundamentálních v MIR (středně infračervené oblasti) oblasti. Je dosti obyčejné přiřadit absorpční pásy jednotlivým kombinačním přechodům a svrchním tónům, a z toho důvodu není běžně proveden rozbor spekter, který směřuje k určení funkčních skupin v molekulách, tak jak je to obvyklé při interpretaci spekter v MIR oblasti. (SIESLER et. al, 2006)

Je však možné vymezit oblasti, kde jsou dominantní pásy kombinačních přechodů (cca $4000 - 5300 \text{ cm}^{-1}$), první overtóny (cca $4600 - 7300 \text{ cm}^{-1}$), druhé overtóny (cca $6000 - 10000 \text{ cm}^{-1}$) a třetí overtóny (cca $8800 - 14500 \text{ cm}^{-1}$). Z hlediska kvalitativní informace je možné srovnávat měřená spektra čistých látek s knihovny spekter, a tak provádět identifikaci látek.

Ve většině případů lze stanovit více složek vedle sebe, a to bez dělení složité směsi a navíc přímo ve výrobním procesu. Z toho důvodu se NIR spektrometrie dá zařadit do skupiny tzv. procesních analytických metod, u nichž se klade důraz na rychlost samotné analýzy včetně varianty kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu. Je tedy možné zároveň stanovit obsah ethanolu a sacharidů v mladině, mladém pivě (například během probíhajících kvasných procesů). Analýza je téměř nedestruktivní, není potřeba speciální úpravy vzorku a je poměrně rychlá (k záznamu postačí méně než jedna minuta). Lze měřit vzorky i ve skleněných i některých dalších transparentních obalech. Metodu lze využít i pro relativně hodně zředěné vzorky. Mnohem pracnější a časově výrazně náročnější než samotné měření spekter je následné zpracování a vyhodnocování naměřených dat. (CASTRITIUS et. al, 2010; SIESLER et. al., 2006)

Techniky měření NIR spekter

Jsou dva způsoby jak měřit NIR spektra za prvé jako zeslabení zářivého toku po průchodu záření vzorkem (transmisní měření) a za druhé po odrazu záření (reflexní techniky). V případě použití reflexních technik se nejčastěji uplatňuje princip difúzní reflexe (FTIR – „fourier

transform infrared“), kdy se záření, které dopadá na vzorek, odráží od povrchu jednotlivých malých částic práškového vzorku. Transmisní měření se využívá především k měření kapalin. Kapalně vzorky lze měřit v kyvetách ze speciálního skla, které vykazuje vysokou propustnost v celé NIR oblasti. „Vedle uvedených postupů, kdy je vzorek umístěn v držáku přístroje, se často NIR spektra měří s využitím vláknové optiky s různými typy sond, které mohou být umístěny například přímo v chemickém či biotechnologickém výrobním reaktoru.“ (SIESLER et. al, 2006)

3.4.3.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací – FTIR

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací pracuje na základě interference spektra, takže využívá místo monochromátoru, který má své mínusy jako například pomalost získávání spektra, malá citlivost, nízký poměr signálu k šumu, Michelsonova interferometru. (KLOUDA, 2003) Záření ze zdroje přichází na polopropustný dělič paprsků, který jednu polovinu paprsků propustí k pohyblivému zrcadlu, druhá se odráží směrem k pevnému zrcadlu. Paprsky se od obou vzájemně kolmých zrcadel zpětně odrážejí a na děliči paprsků se podle polohy pohyblivého zrcadla buď sčítají, nebo odčítají. Signál, který dopadá na detektor je generován interferogramem. Pro získání klasického spektrálního záznamu, vyžaduje spektrometr matematickou metodu Fourierovy transformace na absorpční infračervené spektrum. (SIESLER et. al., 2006) Zdrojem záření je elektricky žhavená tyčinka z karbidu křemíku i jiných materiálů. Pro detekci se využívají různé typy detektorů, ale v moderních FTIR spektrometrech je nejčastější DTGS detektor. Pracuje na principu pyroelektrického jevu. Po absorpci záření se mění teplota pyroelektrického materiálu a tím se mění i stupeň orientace polárních molekul. Tím je vyvolán elektrický náboj a díky tomu vzniká měřitelný elektrický proud. Jako pyroelektrický senzor se používá krystal z deuterovaného triglycinsulfátu (DTGS), kdy deuterací je zvýšena teplota, při níž lze detektor využít. (KLOUDA, 2003; SIESEL et. al, 2006)

FTIR spektrometry mají spoustu výhod. Při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření. Díky tomu lze provádět i experimenty, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, například pokud je měřen silně absorbující vzorek nebo při měření s nástavci pro analýzu kapalných vzorků v odraženém světle – reflektanční infračervená spektroskopie. (SIESEL et.al, 2006)

4 ZÁVĚR

Na cestě za hotovým pivem jak ho známe, se setkáváme s několika pivovarskými meziprodukty – sladinou, mladinou a mladým pivem. V procesu výroby vznikají i další významné meziprodukty a to především v průběhu Maillardovy reakce a enzymatického hnědnutí, které mají vliv na výslednou organoleptickou jakost piva.

Klasické analytické metody používané v pivovarnictví se orientovaly především na stabilitu piva, jeho mikrobiální nezávadnost, komplexní stanovení obsahových látek a samozřejmě také na provozní metody, používané v průběhu výroby. V posledních dvaceti letech, se tyto metody zdokonalovaly. Byl kladen důraz na podrobnější informace a hlubší analýzu. Postupně se měnily principy pro přípravu vzorků, která patří mezi nejdůležitější kroky.

S vývojem a zlepšováním informačních technologií se jednotlivé metody posunuly o další kus dál. Zaměřila jsem se na chromatografické metody a možnosti spojení s hmotnostní spektrometrií, která je velkým pomocníkem při identifikaci i těch nejmenších částic.

K nejnovějším trendům bezesporu patří metody využívané v senzorické analýze piva. Zaujala mě především možnost využití elektronického nosu. Všechny moderní metody pojí větší citlivost detekce, vyšší nároky na odbornost pracovníků, podrobnější a komplexnější výstupy a snaha o lepší využití přímo v provozu.

Po zpracování tohoto tématu jsem došla k závěru, že metody využívané v pivovarské analytice jsou na velice vysoké úrovni. Jejich další zdokonalování jde ruku v ruce s atraktivitou tohoto nápoje stejně tak jako s vývojem nových druhů piva a snaze oslovit širší spektrum konzumentů.

5 SEZNAM LITERATURY

ABAD-GARCÍA, B., BERRUETA, L. A., LOPÉZ-MARQUÉZ, D. M., CRESPOFERRER, I., GALLO, B., VICENTE, F.: Optimization and validation of methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*. 2007, no. 1154, pp. 87-96. Dostupný z: www.sciencedirect.com

ABDEL-REHIM, M.: New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 801, 2004, 317-321.

ADAHCHOUR, M. et. al: *J. The electronic nose*, Austria, 1186 (2008) 67-108

ALBL, V. a kol.: *Výroba sladu a piva*. 1. vyd. Plzeň: Institut výchovy a vzdělání MZVŽ ČR ve spolupráci s plzeňskými pivovary, s.p., 1990. 368 s. ISBN 80-7105- 003-2

Analytica EBC. Zürich: Schweizer Brauerei - Rundschau, 1975.

BARANAUSKIENĖ, R., P.R. VENSKUTONIS, A. GALDIKAS, D. SENULIENE a A. ŠEKTUS. Testing of microencapsulated flavours by electronic nose and SPME–GC. *Food chemistry* [online]. 2005, č. 1, s. 45-54 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604005552>

BASAŘOVÁ, G. *České pivo*. 3., dopl. vyd. Praha: Havlíček Brain Team, 2011, 309 s. ISBN 978-80-87109-25-0

BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7

BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarsko-sladařská analytika 1*. Praha: Merkanta, 1992, 385 s.

BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarsko-sladařská analytika 2*. Praha: Merkanta, 1993, S.399-632.

BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarsko-sladařská analytika 3*. Praha: Merkanta, 1993, S.647-966.

BUKOWSKI, Nick. Combining Time of Flight Mass Spectrometry with Gas Chromatography for Increased Sensitivity in Beer Analysis. *Separation science: Premier learning for analytical chemists* [online]. United Kingdom: ALMSCO International, 2015 [cit. 2015-04-16]. Dostupné z: <http://www.sepscience.com/Sectors/Food/Articles/540-/Combining-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry-with-Gas-Chromatography-for-Increased-Sensitivity-in-Beer-Analysis?pageNo=1>

CASTRITIUS, S., A. KRON, T. SCHAFER, M. RADLE a D. HARMS. Determination of Alcohol and Extract Concentration in Beer Samples Using a Combined Method of Near-Infrared (NIR) Spectroscopy and Refractometry. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2010, č. 58, 12634 - 12641 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf1030604>

ČEPIČKA, J.: *Obecná potravinářská technologie*. vyd. 1. Praha: VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1

DANĚK, J.; FERKL, P.; PROCHÁZKA, S.: *Technologie pro 4. ročník SPŠ potravinářská technologie – obor kvasná technologie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1982. 241 s. ISBN neuvedeno

DIETZ, Christian, Jon SANZ a Carmen CÁMARA. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, č. 1103, 183 - 192 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305022016>

EBLINGER, H.M.E. *Handbook of Brewing Processes, Technology, Markets*. 2.: Weiheim: WILEY-VCH, 2009. ISBN 978-3-527-31674-8.

FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab* [online]. 2012, roč. 20, č. 3, 152 - 157 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>

GODULA, M. Ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosférického tlaku (AP-MALDI) - nový směr v analýze peptidů a proteinů. *Chemické listy*. 2005, č. 99, s. 930-936. Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_930-936.pdf

GOUPY, P., HUGUES, M., BOIVIN, P., & AMIOT, M. J.: Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 1625–1634, (1999)

HISTORIE ELEKTRONICKÉHO NOSU [online]. 2011 [cit. 2015-04-19] Dostupné z WWW: <http://EzineArticles.com/1037705>

HOLČAPEK J., P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, č. 92, s. 278-286. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf

HORÁK T., J. ČULÍK, M. JURKOVÁ, P. ČEJKA, V. KELLNER, J. DVOŘÁK, D. HAŠKOVÁ. MEPS a jeho použití při přípravě vzorků v pivovarské analytice. *Kvasný průmysl*. 2011, roč. 57, č. 9, s. 326-330

CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 207 s., 8 s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-1616-9

JEŽKOVÁ, A., et al.: Vývoj metodiky extrakce na tuhé fázi HPLC-MS pro stanovení deoxynivalenolu v ječmeni a sladu. *Chemické listy*. 2009, 103, s. 679-683

KARABÍN, M.; DOSTÁLEK, P.; HOFTA, P.: Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy*. 2006, 100, s. 184-189

KELLER, P. E.: *Electronic/Artificial Noses. Technology Brief*. Washington. Pacific Northwest National Laboratory, Richland, 1998PNL-SA-26873

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.

KOSAŘ, K. a S. PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902658-6-3

KRÜGER, E. a H.J. BIELIG. *Betriebs- und Qualitätskontrolle in Brauerei und alkoholfreier Getränkeindustrie*. Berlin: Paul Parey, 1976. ISBN 9783489646143

MARSHALL, M.R., JEONGMOK, K., CHENG-I, W.: *Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods*. Auburn: Nutrition and Food Science Department, 2000, Dokument

dostupný na URL: [http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic Browning.html](http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/EnzymaticBrowning.html) (prosinec 2014)

MCLEOD, G., K. CLELLAND, H. TAPP, E.K. KEMSLEY, R.H. WILSON, G. POULTER a D. COOMBES. A comparison of variate pre-selection methods for use in partial least squares regression: A case study on NIR spectroscopy applied to monitoring beer fermentation. *Journal of food Engineering* [online]. 2009, č. 2, 300 - 307 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087740800335X>

MOHAMMAD, Ali a INAMUDDIN. *Green Chromatographic Techniques: Separation and purification of organic and inorganic analytes*. 1. vyd. London: Springer Dordrecht Heidelberg, 2014. ISBN 978-94-007-7734-7.

NAUSHAD, M. a M. R. KHAN. *Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry: evaluation and applications in food analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2014, 461 p. ISBN 978-1-4665-9155-4

NEURONOVÁ SÍŤ [online].2011[cit.2015-03-28].Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Neuronova_sit

NIELSEN, S. *Food analysis*. 4. vyd. New York: Springer, c2010, xiv, 602 s. ISBN 978-1-4419-1477-4

PAWLISZYN, Janusz. *Applications of Solid Phase Microextraction*. 1. vyd. United Kingdom, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 0-85404-525-2.

PELIKÁN, M.; DUDÁŠ, F.; MÍŠA, D.: *Technologie kvasného průmyslu*. 2. vyd. Brno: MZLU, 2004. 135 s. ISBN 80-7157-578-X

PIZARRO, C., N. PÉREZ-DEL-NOTARIO a J.M. GONZÁLEZ-SAIZ. Optimisation of a simple and reliable method based on headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile phenols in beer. [online]. 2010, č. 1217, 6013–6021 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310009258>

SAISON, D., et al.: Decrease of Aged Beer Aroma by the Reducing Activity of Brewing Yeast. *Journal of agricultural and food chemistry* article. 2010, 58, s. 3107- 3115

SIESLER, H.W., Y. OZAKI, S. KAWATA a H.M. HEISE. *Near - Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. 3. vyd. Germany: WILEY- VCH, 2006. ISBN 3-527-30149-6.

SIMPSON, Nigel J. K. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. The USA: Eastern Hemisphere Distribution, 2010. ISBN 0-8247-0021-X

SMYTH, W. F.: The use of electrospray mass spectrometry in the detection and determination of molecules of biological significance. *Trends in analytical chemistry*. 1999, vol. 18, no. 5, pp. 335-345

SPYROS, Apostolos a Photis DAIS. *NMR spectroscopy in food analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013, 1 online resource (xi, 329 p.). ISBN 9781849735339

STEVENS, J. F.; TAYLOR, A. W.; DEINZER, M. L.: Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1999, 832, s. 97-107

ŠTĚRBA, Karel, Pavel DOSTÁLEK a Marcel KARABÍN. Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chemické listy*. 2011, č. 105, 603 - 610.r

ŠTULÍK, K.: *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9

TAN T LUCAS Q, MOY L, GARDNER JM AND BARTLETT P N, 1995. The electronic nose-A new instrument for sensing vapors. *LC GC INT* 8(4): 218-225

TECHNOLOGICKÝ PRINCIP [online]. 2011 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://www.alpha-mos.com/products_technology/electronic_nose.htm

THOMPSON, Jack. *Vaříme pivo: podrobný průvodce vařením piva, přípravou vína a cideru*. 1. české vyd. Praha: Svojtka & Co., 2012, 164 s. ISBN 978-80-256-0931-6

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., *Chemie potravin I*, str. 359, vydalo nakladatelství OSSIS, 2009 – 3. Vydání, ISBN 978-80-86659-15-2

VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 1*, vydala firma OSSIS, 1999 – 1. Vydání, ISBN 80 – 902391-5-3

VELÍŠEK, J.: *The Chemistry of Food*. Wiley-Blackwell, New York 2014

VERHOEF, B. *Encyklopedie piva*. Praha: Rebo Productions, 1998, 304 s. ISBN 80-7234-012-3

VERHOEF, B. *Kompletní encyklopedie piva: podrobný průvodce světem lahodného pěnivého moku*. 2. vyd. Dobřejovice: Rebo Productions, 2004, 304 s. ISBN 80-7234-116-2

VERNER, Petr. Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze. *Chemické listy*. 2005, č. 99, s. 937-942. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_937-942.pdf

Vyhláška č. 335/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI – „*atmospheric - pressure chemical ionization* „- chemická ionizace za atmosférického tlaku

CAR – Carboxen

CKT – cylindrokonický tank

CW – Carbowax

DVB – divinylbenzen

ESP – elektrosprej

FTIR – „*fourier transform infrared* „ - Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

GC – „*gass chromatogramy*“ – plynová chromatografie

HPLC – „*high performance liquid chromatography*“ – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ISP – iontový sprej

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice

MEPS – „*microextraction by packed sorbent*“ - mikroextrakce na pevném sorbentu

MS – „*mass spektrometry*“ – hmotnostní spektrometrie

NIR – „*near infrared spektrometry*“ – spektroskopie v blízké červené oblasti

PA – polyakrylát

PDMS - polydimethylsiloxan

SIM – „*single ion monitoring*“ -

SPE – „*solid phase extraction*“ – extrakce pevnou fází

SPME – „*solid phase microextraction*“ – mikroextrakce pevnou fází

TOF - „*time of flight*“ – detektor doby letu

TSP – termosprej