

Změny obsahů vitaminů skupiny B v různých fázích výroby piva

Bc. Kateřina Novotná

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina NOVOTNÁ**
Osobní číslo: **T09554**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Změny obsahů vitamínů skupiny B v různých fázích výroby piva**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište technologii výroby piva.
2. Charakterizujte vitaminy skupiny B a jejich nutriční aspekty.
3. Popište stanovení těchto vitamínů pomocí HPLC.

II. Praktická část

1. Analyzujte připravené vzorky.
2. Naměřené výsledky porovnejte s odbornou literaturou.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ROP, Otakar, HRABĚ, Jan. Nealkoholické a alkoholické nápoje. 1. vyd. Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.

[2] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava, Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[3] BRIGGS, Dennis E. Brewing : science and practice [online]. Boca Raton, CRC, [cit. 2011-02-06]. 881 s. Dostupné z WWW:

<http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=1249>. ISBN 978-0-8493-2547-2.

[4] KADLEC, Pavel. Technologie potravin II. 1. vyd., dotisk 2008. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2008. 236 s. ISBN 978-80-7080-510-7.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: NOVOTNÁ KATEŘINA

Obor: ITHEVC

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 19. 5. 2011

Novotná

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací

(1) Vysoká škola nevydávajíc zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3;

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užitje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě díla vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo;

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svatelní bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybného projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedatčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na stanovení vitaminů skupiny B v různých stádiích výroby piva pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC). K nalezení optimální metody stanovení těchto vitaminů bylo vyzkoušeno několika různých postupů. Naměřené koncentrace byly následně porovnány s literárními údaji.

Klíčová slova: pivo, pivovarnictví, vitaminy, kapalinová chromatografie

ABSTRACT

The thesis is focused on the determination of vitamins B in various stages of beer production using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). To find the optimal method for the determination of these vitamins have been tried several different procedures. The measured concentrations were consequently compared with the hints in the literature.

Keywords: beer, brewing, vitamins, liquid chromatography

Touto cestou bych chtěla poděkovat Ing. Pavlu Hanuštiakovi za trpělivost, odborné vedení a cenné rady při zpracování diplomové práce.

Dále mé velké děkuji patří Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. a Ing. Lence Fojtíkové za ochotu, vstřícnost, užitečné rady a vytvoření přátelského prostředí při práci v laboratořích. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také přátelům a rodině za podporu během studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA	12
1.1 LEGISLATIVA	12
1.2 SUROVINY PRO VÝROBU PIVA.....	13
1.2.1 Sladovnický ječmen	13
1.2.2 Náhražky sladu (surogáty).....	15
1.2.2.1 Škrobnaté náhražky.....	16
1.2.2.2 Cukernaté náhražky.....	16
1.2.3 Chmel a chmelové výrobky.....	17
1.2.4 Voda	19
1.3 VÝROBA SLADU.....	21
1.3.1 Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene.....	21
1.3.2 Máčení ječmene.....	23
1.3.3 Klíčení ječmene.....	24
1.3.4 Hvozdění	25
1.4 VÝROBA PIVA.....	27
1.4.1 Výroba mladiny	27
1.4.1.1 Šrotování sladu	28
1.4.1.2 Vystírání a rmutování	28
1.4.1.3 Scezování sladiny a vyslazování mláta.....	30
1.4.1.4 Chmelovar.....	31
1.4.1.5 Závěrečné úpravy mladiny	32
1.4.2 Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva.....	33
1.4.3 Závěrečné úpravy piva	35
2 VITAMINY	37
2.1 THIAMIN (VITAMIN B ₁)	38
2.2 RIBOFLAVIN (VITAMIN B ₂).....	40
2.3 KYSELINA NIKOTINOVÁ A JEJÍ AMID.....	42
2.4 KYSELINA PANTOTHENOVÁ (VITAMIN B ₅).....	43
2.5 PYRIDOXIN (VITAMIN B ₆).....	44
3 CHROMATOGRRAFIE	46
3.1 PRINCIP CHROMATOGRRAFIE	46
3.2 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	46
3.3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	49
3.3.1 Stacionární fáze v HPLC.....	50
3.3.2 Mobilní fáze v HPLC	50
3.3.3 Instrumentace	51
3.3.4 Detektory v kapalinové chromatografii.....	53
3.3.4.1 Spektrofotometické detektory.....	54

II	PRAKTICKÁ ČÁST	56
4	CÍL PRÁCE	57
5	METODIKA	58
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	58
5.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY	59
5.2.1	Běžné laboratorní vybavení	59
5.2.2	HPLC aparatura	59
5.3	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZY	60
5.3.1	Zahušťování vzorku piva	60
5.3.2	Délka chromatografické kolony	60
5.3.3	Složení mobilních fází	60
5.4	KONEČNÁ METODIKA	61
5.4.1	Příprava mobilní fáze	62
5.4.2	Kalibrace	62
5.5	KONEČNÁ ÚPRAVA VZORKU	62
5.6	POPIS ANALYZOVANÉHO MATERIÁLU	63
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	64
6.1	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK	64
6.2	VÝSLEDKY MĚŘENÍ JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ PIVA	66
6.2.1	Výpočet koncentrací vitamínu B ₂	66
6.2.2	Výpočet koncentrací vitamínu B ₃	68
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	77
	SEZNAM OBRÁZKŮ	78
	SEZNAM TABULEK	79
	SEZNAM PŘÍLOH	80

ÚVOD

Pivo se v České republice těší velké oblibě, o čemž vypovídá i naše prvenství co do spotřeby tohoto nápoje. Pivovarnictví má u nás mnohaletou tradici. Piva „českého typu“ jsou dnes známa a velmi oblíbená po celém světě. Jsou charakteristická svými nezaměnitelnými vlastnostmi, jež jim propůjčují vysoce kvalitní české odrůdy ječmene a chmele. Pivo „českého typu“ se vyznačuje zlatavou barvou, jiskrnou číroostí, silným řízem a plností, silnou hořkostí a kompaktní bohatou pěnou.

Pivo je disperzní soustavou různých sloučenin a vyznačuje se perfektní nutriční vyvážeností. Jeho chemické složení se může měnit v závislosti na extraktu původní mladiny a stupni prokvašení. Hlavní součástí extraktu piva jsou sacharidy, dále dusíkaté látky, polyfenolické látky a hořké látky z chmele, barviva (melanoidiny), glycerol, lipidy, heterocyklické látky a vitaminy. Některé z těchto vitaminů (vitamin C, vitamin E) se společně s dalšími látkami (selen, polyfenoly) podílí jako antioxidanty na ochraně organismu před škodlivým působením volných radikálů. V mnoha publikovaných zdravotních studiích se tak můžeme dočíst o pozitivním vlivu střídavé konzumace piva na zdraví konzumenta. Hovoří se především o snížení počtu kardiovaskulárních onemocnění, které se dává často do souvislosti s obsahem homocysteinu v krvi, kdy na redukci tohoto faktoru účinně působí právě vitaminy skupiny B. Bylo také zjištěno, že pravidelní konzumenti piva mají v krvi vyšší koncentrace vitamínu B₆, který rovněž snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění.

Tato práce je zaměřena na stanovení vitaminů B-komplexu, konkrétně na thiamin, riboflavin, niacin (resp. kyselinu nikotinovou), kyselinu pantothenovou a pyridoxin, jež jsou podrobně popsány také v teoretické části. Ta se dále zabývá jednotlivými surovinami určenými k výrobě piva a také popisem výroby samotné, opět s důrazem kladeným na obsah vitaminů skupiny B. Poslední kapitola teoretické části pak pojednává o chromatografii jako takové se zaměřením na princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a na popis kapalinového chromatografu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA

Pivo můžeme definovat jako slabě alkoholický nápoj vzniklý řízeným kvašením cukernatého roztoku, povařeného s chmelem nebo chmelovým výrobkem a kvašeného vybraným kmenem pivovarských kvasinek při technologicky určených teplotách a dobách hlavního kvašení a ležení piva. Podle některých historiků je pivo vůbec nejstarší lidmi vyrobený alkoholický nápoj pocházející z doby před 7000 lety. [1], [2]

Zdrojem cukru pro kvašení piva je většinou škrob obsažený v ječném sladu. Pokud se výjimečně nahrazuje jinou škrobnatou surovinou nebo přímo cukrem, hovoříme o surogaci a použitou náhradu nazýváme surogát. [1]

Dříve se obsah alkoholu v pivu vyjadřoval jednotkou „stupeň“. Ten je však podle současně platné soustavy SI vyhrazen obloukové míře a musel být proto nahrazen termínem „extrakt v původní mladině“ (EPM). Pojem desetistupňové pivo („desítka“) a pivo s EPM 10 tak vyjadřují v podstatě stejné pivo vzniklé kvašením mladiny, která na počátku kvašení obsahovala 10 % zkvasitelného extraktu a 90 % vody. [1]

Pivo je nejprodávanějším alkoholickým nápojem na světě, kterého se ročně vyrobí přibližně 1,5 mld. hektolitrů, přičemž tato hodnota každoročně stoupá. Největšími producenty jsou Čína a USA, Česká republika podle současných statistik zaujímá 17. místo s roční produkcí necelých 20 mil. hektolitrů (1,2 % světové výroby piva). Co se týče specifické spotřeby piva, tj. množství vypitého piva na osobu a rok, držíme světový primát s roční spotřebou 150 litrů na osobu. [1], [3]

Ve světě se vyrábí několik set druhů piv, přičemž se vychází ze základního dělení na piva typu Ale a ležáky, což přibližně odpovídá dělení na spodně a svrchně kvašená piva. [2]

1.1 Legislativa

Pro účely Vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů se rozumí:

a) **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 původ-

ní mladiny nahradit extraktem, zejména cukru, obilného škrobu, ječmene, pšenice nebo rýže; u piv ochucených může být obsah alkoholu zvýšen přidavkem lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů,

b) **sladem** obilná zrna ječmene, pšenice nebo jiných obilovin, u nichž sladováním došlo k enzymatickým přeměnám endospermu a k vytvoření typických chuťových, aromatických látek a barvicích látek. [4]

Tab. 1. Fyzikální a chemické požadavky na jakost piva [4]

ukazatel		nealko- holická	se sníženým obsahem alkoholu	stolní	výčep- ní	ležáky	speci- ální	portery
skutečné prokvašení %	tmavá piva	nestanoveno		min. 45				
	ostatní piva	nestanoveno		min. 50				nestanoveno
alkohol v obj. %		max. 0,5	0,5 – 1,2	více než 1,2				
extrakt pů- vodní mla- diny v hm. %		nestanoveno		max. 6	7 – 10	11 – 12	min. 13	min 18

1.2 Suroviny pro výrobu piva

Základními surovinami pro výrobu piva jsou ječmen, voda a chmel, či chmelové výrobky, případně i náhražky sladu. Teoreticky je možno sladovat více druhů obilí, v praxi se však používá sladovnický ječmen, v cizině pak i pšenice k výrobě sladu pro pšeničná piva. V České republice převažuje výroba světlého ječného sladu plzeňského typu. [5]

1.2.1 Sladovnický ječmen

V České republice se pro výrobu sladu a sladových výtažků pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého ječmene. Nejznámější ječmenářskou oblastí je u nás Haná. Odrůdy zde pěstované patří k nejkvalitnějším na světě a daly genetický základ mnohým zahraničním odrůdám. V roce 2000 se u nás zpracovalo okolo 600 000 t sladovnického ječmene. [5], [6]

Kromě pěstitelských vlastností se u sladovnického ječmene posuzují zejména sladařské vlastnosti, tj. chemické složení a vhodnost pro výrobu sladu. Z jednotlivých znaků je to

zejména klíčivost a klíčivá energie (udávají procentický podíl schopnosti zrn vyklíčit za 3 až 5 dnů při stanovených podmínkách), objemová hmotnost, podíl zrn nad sítím 2,5 mm a především odrudová čistota a homogenita jednotlivých dodávek. Důležitý je co nejnižší podíl cizích a biologicky poškozených zrn, plesnivých zrn či zrn se zahnědlými špičkami, která mohou být původcem samovolného přepěňování piva (tzv. gushing). [5], [6], [7], [8]

Ječmen obsahuje asi 80 – 88 % sušiny. Nejvíce zastoupenou složkou jsou sacharidy, které tvoří asi 80 % hmotnosti zrna. U kvalitních sladovnických odrud je obsah škrobu asi 60 - 65 %, nízkomolekulární sacharidy jsou přítomny jen v nepatrném množství. Neškrobové polysacharidy pak tvoří okolo 10 % hmotnosti ječného zrna. V obalových vrstvách najdeme především celulosu, hemicelulosy se podílejí na stavbě a pevnosti buněčných stěn. Endospermální hemicelulosy jsou složeny ze 75 % z β -glukanů a 25 % pentosanů. Zvýšený obsah β -glukanů v ječmeni a následně ve sladu ztěžuje sladařské a pivovarské zpracování tohoto produktu díky snížené přístupnosti škrobových zrn enzymům, zvyšování viskozity roztoků a snížení koloidní stability piva. [1], [5], [6], [8], [9]

Technologii zpracování sladovnického ječmene na slad i pivovarskou technologii a kvalitu vyrobeného piva významně ovlivňují dusíkaté látky, jejichž optimální obsah se pohybuje v rozmezí 10 – 11,5 %. Důležitými složkami ječmene jsou také enzymy. Ty jsou přítomny jak v latentní, tak v aktivní formě. Uplatňují se enzymy všech šesti klasifikačních tříd, nejvíce pak ty hydrolytické. Z ostatních složek obsahuje ječmen polyfenolové látky, vitaminy a minerální látky, z nichž jsou důležité zejména fosforečnany. [5], [7]

Vitaminy se nacházejí především v zárodku a v aleuronové vrstvě zrna. Jejich obsah je závislý na půdně-klimatických podmínkách a také na odrudě. Mnohé z nich jsou součástí aktivních skupin enzymů a působí tak na enzymatickou aktivitu klíčícího zrna. [10]

V ječmeni jsou přítomny vitaminy skupiny B, vitamin C, vitamin H (biotin) a provitamin A (karotenoidy). V zárodečné části zrna je přítomen také vitamin E, který je účinným antioxidantem a svým působením potlačuje škodlivé účinky volných radikálů. Antioxidační aktivitu vykazuje také vitamin C. Přítomnost těchto látek v ječmeni a ve sladu je důležitá pro organickou stabilitu piva. [10]

Význam vitaminů skupiny B v procesu vaření piva spočívá v jejich přítomnosti v mladině v množstvích často variabilních, ovšem dostatečných pro zajištění odpovídající činnosti

kvasinek v pivovarnictví. Tyto vitaminy jsou velmi důležité jako růstové faktory kvasinek během procesu fermentace (zejména biotin, inositol a kyselina pantothenová). [11]

Tab. 2. Obsah některých vitaminů skupiny B v ječmeni [10]

Vitamin	Obsah na 100 g sušiny
B ₁ – thiamin	0,12 – 0,74 mg
B ₂ – riboflavin	0,10 – 0,37 mg
Kyselina nikotinová	8,00 – 15,0 mg
B ₆ - pyridoxin	0,30 – 0,40 mg

Sklizeny ječmen není schopen ihned vyklíčit, musí nejprve fyziologicky dozrát (dormance ječmene). Během této doby dochází v zrně k oxidačním procesům (respirace) a odbourávání inhibitorů klíčení. Proto je důležité pravidelné provětrávání a tím zajištění přístupu kyslíku ke skladovanému zrně. Dormance ječmene je závislá i na půdních a klimatických podmínkách. Posklizňové dozrávání u nás pěstovaných sladovnických ječmenů je vesměs krátké (4 – 5 týdnů). Ječmeny s dlouhou dobou dormance mají většinou nízký obsah enzymů a poskytují méně kvalitní slady. [5], [6], [7]

1.2.2 Náhražky sladu (surogáty)

Sladové náhražky jsou škrobové nebo cukerné surogáty, které mohou do určitého množství nahradit ječný slad. Surogáty se používají zejména pro snížení surovinových nákladů. Jejich použití je nejvíce rozšířeno v zemích s menší pivovarskou tradicí, především v Americe, Africe a Asii. [6], [10]

Rozsah použití surogátů je ovlivněn technickým vybavením pivovarů, ale také typem a kvalitou vyráběného piva. Kromě škrobových a cukerných surogátů se mohou použít slady i z jiných obilovin. Ty slouží k výrobě speciálních piv nebo jako přísada ke sladu pro zlepšení některých vlastností, jako např. pěnivosti piva nebo pro rychlejší kvašení. [10]

Použití běžných surogátů do 10 % hmotnosti zpracovaného sladu výrazně neovlivní kvalitu piva. Další zvyšování podílu surogátů již vyžaduje změny v používané technologii. Při surogace vyšší než 40 % je nutno aplikovat enzymové preparáty, jinak je prakticky neproveditelná. U spodně kvašených piv by množství použitého surogátu nemělo nikdy překročit hranici 20 %. [8], [10]

1.2.2.1 Škrobnaté náhražky

Škrobnaté náhražky jsou levnější a celkově dostupnější, vyžadují však speciální technologické zpracování a mají menší účinnost využití extraktivních složek. [5]

Pro zlepšení chuti a pěnivosti se dříve běžně používal nesladovaný ječmen v množství asi 10 %. Výhodou je chemické složení obilky, která je nejvíce podobná sladu. Pro výrobu speciálních piv v Německu a Belgii se používá pšenice, ta ale obsahuje lepek. Podobně jako β -glukany u ječmene prodlužuje lepek scezování mladiny a filtraci piva. [10]

V Severní Americe a Asii se jako škrobová náhražka používá kukuřice. Nevýhodou je vysoký obsah tuků v zrně, proto se kukuřice loupe a zbavuje klíčku, který jich obsahuje až 25 %. V Asii se dále používá rýže, v Africe pak čirok, jež má vysoký obsah cukru (5 – 18 %). [10]

1.2.2.2 Cukernaté náhražky

Výhodou těchto náhražek je snadná rozpustnost, do mladiny se proto přidávají většinou v průběhu chmelovaru. Používají se v množství 5 – 10 %, maximálně však 20 %. Vyšší podíly mohou mít za následek změny v charakteru piva. Cukernaté náhražky snižují obsah dusíkatých látek mladiny, což může vést k vysokému stupni prokvašení (a tím vyššímu obsahu alkoholu), ale i ke snížení pěnivosti piva. [5], [10], [12]

Rafinovaný krystalový cukr (řepný nebo třtinový) je nejběžněji používaným cukerným surogátem. Může se přidat také hnědý, případně surový cukr se zbytky melasy. Samotná melasa se však používá jen za mimořádně špatné ekonomické situace. V zahraničí se pak používá i tzv. umělý med, což je sirup obsahující glukosu a fruktosu s vysokým štěpením sacharosy. [10]

Do této skupiny náhražek se řadí i cukrový kulér, jehož barvicí schopnost je 4 – 6krát větší než má barvicí slad. Tmavá piva vyráběná za přídavku cukrového kuléru pak mají žlutohnědou pěnu. [10]

Kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou bramborového, pšeničného či kukuřičného škrobu můžeme vyrobit cukerné sirupy. Ty se využívají v Severní a Jižní Americe, ale také například ve Velké Británii nebo Francii. [10]

Kromě náhražek mohou být v pivovarské výrobě použity i sladové výtažky. Přípravují se vyluhováním enzymově bohatých sladů vodou a zahuštěním výluhů při nízké teplotě za vakua. Využívají se jako zdroje sladových enzymů v havarijních situacích. [5]

1.2.3 Chmel a chmelové výrobky

Chmel jsou v podstatě usušené chmelové hlávky samičích rostlin chmele evropského (*Humulus lupulus* var. *europaeus*) z čeledi konopovitých (*Cannabaceae*). Poskytuje pivu typicky hořkou chuť a přispívá tak k tvorbě charakteristického aroma. U nás se chmel pěstuje v oblastech Žatecka, Úštěcka a Tršicka u Olomouce. Tento chmel je velmi kvalitní a téměř třetina produkce slouží k vývozu. [1], [5], [6], [9]

Z pivovarského hlediska můžeme odrůdy chmele rozdělit na jemné aromatické, představované především žateckými odrůdami, aromatické, hořké a vysokoobsažné s vysokým obsahem pryskyřic, ale zpravidla s hrubým aroma. Podle zbarvení chmelové révy rozlišujeme tzv. červeňáky, představované rovněž žateckými odrůdami, a zeleňáky pěstované v zahraničí, především v Anglii, Belgii a Americe. [1], [5]

Sklizený chmel obsahuje v hlávkách asi 72 – 82 % vody. Suší se teplým vzduchem 5 – 8 hodin při teplotách nepřesahujících 50 °C, až jeho vlhkost klesne asi na 8 %. Po vysušení se chmel skladuje na půdách, přijímá vzdušnou vlhkost, a tím se obsah vody zvýší asi na 11 %. Poté se chmel třídí, lisuje do žoků a odesílá k dalšímu zpracování nebo přímo do pivovarů. [5], [7]

Chemické složení usušeného chmele je závislé na odrůdě, místě původu, ročníku a způsobu posklizňové úpravy. Průměrně obsahuje 8 – 12 % vody, 15 – 20 % celkových pryskyřic, 2 – 6 % polyfenolových látek, 0,2 – 2,5 % silic, 1 – 3 % vosků a lipidů, 12 – 15 % dusíkatých látek, 40 – 50 % sacharidických složek a 6 – 8 % minerálních látek. [10], [11]

Chmel však obsahuje i problematické složky. Jsou to látky nepříznivě ovlivňující zpracování chmele v pivovarském procesu a řadí se k nim dusičnany, rezidua postřikových látek, těžké kovy a u některých chmelových výrobců i rezidua chemických katalyzátorů. [6], [10]

Obsah pivovarsky cenných složek, zejména pryskyřic, polyfenolů a silic, je rozhodujícím faktorem pro kvalitu chmele. Chmelové polyfenoly nacházejí uplatnění při srážení vysokomolekulárních bílkovin, chmelové silice jsou pak zodpovědné za charakteristické chmelové aroma. Při skladování a transportu podléhá snadno většina pivovarnicky cenných látek

chmele chemickým změnám. Z důvodu chemické nestability, ale i kvůli relativně nízké účinnosti využití nejdůležitějších složek chmele při výrobě piva, vysokým nárokům na skladování a obtížné manipulovatelnosti s hlávkovým chmelem se dnes většina chmele zpracovává na různé chmelové výrobky. [1], [6], [9], [10], [11]

Podle způsobu výroby rozlišujeme výrobky připravené mechanickými, fyzikálními a chemickými úpravami hlávkového chmele. [10]

Mezi výrobky připravené mechanickými úpravami hlávkového chmele patří **mleté a granulované chmely** bez nebo se standardizovaným obsahem α -hořkých kyselin. Ze všech chmelových výrobků se právě granulované chmely podobají svým charakterem přírodnímu chmelu nejvíce. Podle stupně zkoncentrování hořkých kyselin rozeznáváme různé typy granulovaného chmele (typ 100, 90, 45 a 30). [5], [9]

Při výrobě mletého chmele se surovina nejprve čistí a dosouší na obsah vody 5 – 6 %. Následně se mele, homogenizuje a plní do obalů. U granulovaného chmelu se mletý chmel protlačuje matricí granulárního lisu. Vzniklé granule mají průměr 5 – 10 mm a zpravidla válcovitý tvar. U nás vyráběný granulovaný chmel se mele za nízkých teplot ($-35\text{ }^{\circ}\text{C}$) a koncentruje při -30 až $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za těchto teplot lupulin přechází v krystalickou formu a oddělí se na vibračních sítích. [7], [9]

Takto získané výrobky se balí do obalů s inertní atmosférou nepropouštějících vlhkost, vzduch a světlo. V současné době jsou hojně používané při výrobě výčepních, ležáckých i speciálních piv spodně i svrchně kvašených. Často se ale kombinují s vhodným chmelovým extraktem a to zejména v případě varních vod s vyšším obsahem dusičnanů, aby bylo dosaženo snížení jejich hladiny v hotovém pivu. Mechanická úprava totiž sama o sobě neumožňuje výrazné snížení obsahu dusičnanů. [5], [7], [10]

K výrobkům připraveným fyzikálními úpravami přírodního chmele patří zejména nemodifikované **chmelové extrakty**, které jsou v současné době široce rozšířeny a používají se pro výrobu téměř všech druhů piv. Původně se získávaly extrakcí neekologickými rozpouštědly (methylenchloridem a hexanem), dnes je však veškerá produkce založena na extrakci ethanolem či oxidem uhličitým. Extrakty mají v porovnání s přírodním chmelem vyšší koncentraci pivovarsky důležitých složek, především α -hořkých kyselin. [8], [10]

Výrobky vzniklé chemickými úpravami hlávkového chmele, granulovaného chmele či chmelového extraktu se připravují řízenou izomerací, redukcí a hydrogenací α -hořkých kyselin. Do této skupiny chmelových výrobků řadíme **izoextrakty** a **izopelety**. [5], [7], [10]

Používání těchto výrobků je částečně omezeno technologickými a legislativními požadavky. Z těchto důvodů se v evropských zemích s tradičním pivovarským průmyslem používají jen velmi omezeně, pokud vůbec. [5], [10]

V současném pivovarnictví dosahuje používání chmelových výrobků vysokého stupně. Důležitým faktorem jejich použití je cenová relace a splnění technologických požadavků. Naše pivovary v současnosti nejčastěji kombinují granulovaný chmel s extraktem získávaným pomocí oxidu uhličitého. Přírodní hlávkový chmel se používá jen výjimečně. Pro jeho použití je totiž nutno ve varně instalovat přídavné strojní zařízení, tzv. **chmelový cíz**, kde se odděluje povařená mladina od vylouženého chmele. [1], [10], [12]

1.2.4 Voda

Vody se ve sladařském a pivovarském průmyslu spotřebuje velké množství. Je důležitou surovinou, neboť přímo ovlivňuje kvalitu piva a má i jinak široké uplatnění. Spotřeba vody mnohokrát převyšuje objem vyrobeného piva, kdy se na výrobu jednoho litru spotřebuje v závislosti na velikosti a technickém stavu velkého pivovaru od sedmi do dvanácti litrů vody. Menší restaurační pivovárky, pokud vytáčíjí pivo přímo z výčepních tanků, mají spotřebu vody podstatně nižší, neboť velké objemy vody spotřebují linky na mytí a plnění lahví či sudů, což v tomto případě odpadá. Podíl varní vody z celkové spotřeby je poměrně malý. [1], [6], [7]

Podle účelu použití můžeme vodu v pivovarství rozdělit do tří skupin:

1. **Varní voda** je jako jedna ze základních surovin používána pro přípravu piva. Musí splňovat požadavky na vodu pitnou a to především z hlediska zdravotní a hygienické nezávadnosti. V pivě voda představuje 75 až 80 % hmotnosti podle druhu výrobku a svými vlastnostmi ovlivňuje průběh přípravy, základní kvalitu i specifické vlastnosti určité značky piva. Voda z městských vodovodních řádů je plně využitelná jako voda varní, pokud není třeba upravit její složení při výrobě určitých druhů piv.

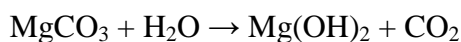
2. **Mycí a sterilační voda** nesmí obsahovat mikroorganismy, chemické kontaminanty a nesmí zapáchat. Voda pro výplachy a sterilaci by se měla chlorovat.
3. **Provozní voda** musí odpovídat standardům stanoveným pro jednotlivá zařízení a operace. Pokud se pára z parních generátorů injektuje přímo do pivovarského zařízení, např. při varu mladiny, musí voda určená k výrobě této páry odpovídat předepsané potravinářské kvalitě. Voda používaná při chlazení podléhá někdy úpravě mikrobiologické čistoty a chemického složení. Nízký obsah anorganických iontů by pak měla mít voda určená pro přípravu mycích roztoků a voda pasterační. [7], [13]

Voda v přírodě představuje velmi zředěný roztok solí a plynů, povrchové vody obsahují také suspendované organické a anorganické látky. K nejdůležitějším rozpuštěným látkám patří vápenaté a hořečnaté soli vytvářející tvrdost vody, která je důležitým kritériem posuzování kvality vody pro pivovarské účely. [1], [5]

Rozlišuje se **tvrdost stálá** (trvalá, nekarbonátová) a **tvrdost přechodná** (karbonátová). Tvrdost trvalá je tvořena stálými vápenatými a hořečnatými solemi (síran, chloridy, křemičitany aj.), zatímco tvrdost přechodná hydrogenuhličitan, které se varem úplně nebo částečně rozkládají podle následujících rovnic: [7], [9]



Uhličitan vápenatý je nerozpustný a vylučuje se z roztoku. Uhličitan hořečnatý je málo stálý a probíhá jeho další rozklad až na hydroxid hořečnatý, který je pouze omezeně rozpustný. [9], [10]



Celková tvrdost je součtem tvrdosti stálé a přechodné. Dříve se vyjadřovala ve stupních německých ($^{\circ}\text{n}$), dnes už v $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a podle její hodnoty se v pivovarském oboru dělí vody na: [7]

- | | | |
|-----------------|---|---------------------------------|
| ▪ měkké | do 1,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | tj. do 8 $^{\circ}\text{n}$ |
| ▪ středně tvrdé | do 2,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | tj. do 12 $^{\circ}\text{n}$ |
| ▪ tvrdé | do 5,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | tj. do 30 $^{\circ}\text{n}$ |
| ▪ velmi tvrdé | nad 5,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | tj. nad 30 $^{\circ}\text{n}$. |

Měkká voda s menším podílem hořčíku a přechodné tvrdosti je vhodná pro výrobu světlých piv, pro tmavá piva nevádí ani voda tvrdší. Varní voda by však zásadně neměla obsahovat alkalické uhličitany, chlor a příliš železa, manganu a dusičnanů. Měkčení vody se provádí demineralizací na iontoměničích nebo reverzní osmózou. [7], [12]

1.3 Výroba sladu

Slad se vyrábí naklíčením a hvozděním sladovnického ječmene ve sladovnách. Hlavními produkty jsou světlé, tmavé a speciální slady. Ze sladu se však vyrábí i sladové výtažky používané v různých potravinářských výrobcích, v textilním průmyslu a ve farmacii. [5], [7]

Principem sladování je vytvoření optimálních podmínek pro klíčení ječmene, přičemž v zrně dochází k aktivaci a tvorbě technologicky důležitých enzymů (cytolytických, proteolytických a amylolytických) za současného zamezení hmotnostních ztrát potlačením růstu. Cílem je tedy vyrobit řízeným procesem klíčení a hvozdění slad obsahující potřebné enzymy, aromatické a barevné látky typické pro určený druh piva. [5], [6], [7]

Sladovny můžeme rozdělit podle způsobu a techniky sladování na periodické humnové sladovny, pneumatické bubnové a skříňové sladovny, polokontinuální sladovny typu posuvné hromady a na kontinuální sladovny pásové, tunelové a šachtové. [5]

Slad se vyrábí z ječmene po čtyř- až pětítýdenním dozrávání v silech. Nejprve se ječmen předčistí, poté se namáčí ve zvláštních nádobách (náduvnících). Vyklíčený ječmen se následně suší (hvozdí) na hvozdu. Teplota sušení se volí podle typu vyráběného sladu. [1]

1.3.1 Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene

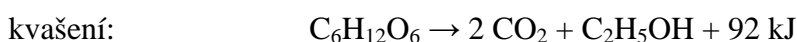
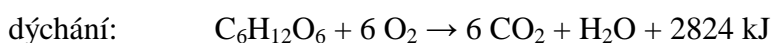
Ječmeny jsou dodávány do sladoven ihned po sklizni. Sklízí se jen několik týdnů, ale sladařská kampaň trvá 10 i více měsíců. K příjmu ječmene dochází na přijímací rampě, která je vybavena váhou. Kromě hmotnosti se kontrolují i ostatní předepsané znaky, tj. obsah vody, bílkovin, zlomků a nečistot, podíl nad sítem 2,5 mm a další. [5], [6]

Při příjmu musí sladovny zajistit oddělený výkup a skladování jednotlivých odrůd. Ječmen se čistí a třídí podle velikosti a kvalitativních znaků. Třídění ječmene podle velikosti zrn má velký technologický význam pro docílení jednotného máčení, klíčení a získání dokonale homogenního sladu. Za těchto podmínek pak můžeme vyrobit dobře rozluštěné kvalitní slady a zaručit nízké sladovací ztráty. [7], [10]

Skladovaný ječmen představuje živý organismus, jež se neustále vyvíjí a mění. Největší roli při skladování obilovin hraje především obsah vody a teplota zrna, dále stupeň poškození obilky, kvalita čištění a třídění a přítomnost škůdců. Mechanicky poškozené obilky se mohou pokrývat myceliem skladištních hub a tvořit ložiska samozahřívání. Samozáhřev pak končí naprostým rozkladem skladovaného zrna. [10]

Kritická vlhkost zrna při skladování je 14 %. Překročením této hodnoty se do chodu uvedou různé biochemické reakce, jejichž výsledkem je zvýšená produkce oxidu uhličitého, vody a tepla. [10]

Energii potřebnou pro životní projevy získává zrno odbouráváním rezervních polysacharidů, především škrobu. V přítomnosti kyslíku je energie získávána aerobním dýcháním, v jeho nepřítomnosti probíhá anaerobní kvašení. [5]



Zrno by mělo být neustále v přítomnosti kyslíku, aby jeho metabolismus nepřešel z dýchání na kvašení. Produkty kvašení totiž narušují až usmrcují klíček, navíc je dýchání energeticky výhodnější a představuje menší ztráty hmoty zrna. [7]

Čerstvě sklizený ječmen má značnou aktivitu dýchání a je nutno ho proto nějakým způsobem konzervovat. Aktivní větrání, při kterém se provádí výměna vzduchu v mezizrnných prostorech (40 – 50 % objemu hromady) bez přemístění zrna, je ekonomicky nejvýhodnější. V ideálním případě klesne vláha ječmene na 12 %, což je optimální hodnota pro zachování kvality suroviny během skladování. [9], [10]

Čerstvě sklizený a vytríděný ječmen se při skladování nachází ve stadiu základního klidu, tzv. **dormance**. Dormance je několikatydenní období po sklizni, kdy obilky ječmene klíčí pomalu a nejednotně i za podmínek jinak pro klíčení optimálních. U rostlin se tento jev vyvinul v době, kdy se musely přizpůsobit pravidelnému střídání podmínek vhodných a nevhodných (sucho, chlad) pro růst. Dormance tudíž není reakcí na nepříznivé podmínky, ale přizpůsobení se klimatickému cyklu. [5], [6], [10]

Špatná klíčivost čerstvě sklizeného ječmene je dána přítomností inhibitorů klíčení, tzv. dorminů. Dormance zaniká teprve jejich odbouráním oxidací, uvolňuje se činnost stimulatorů klíčení gibberelinů a zrna je schopné vyklíčit. Tento proces je sice možné urychlit, ale z hygienických a ekologických důvodů se dává přednost přirozenému odležení. [5], [6], [7], [9]

1.3.2 Máčení ječmene

Cílem máčení je řízeným způsobem zvýšit obsah vody v ječném zrně z 12 – 15 % na 42 – 48 %. Nastartují se tak enzymatické reakce nezbytné pro optimální průběh sladařského klíčení. Dosažený obsah vody v namočeném zrně se nazývá stupeň domočení a liší se podle druhu vyráběného sladu. [6], [7], [10]

Dalším důvodem máčení je i odstranění splavků a lehkých nečistot, umytí zrna a zejména vyloužení nežádoucích látek (barevné a hořké látky, kyselina křemičitá a bílkoviny z pluch). Tyto látky zhoršují sensorické vlastnosti piva a podporují tvorbu zákalů. [9], [10]

Nejrychleji přijímá zrna vodu během prvních 4 – 8 hodin, postupem času se příjem výrazně zpomaluje v důsledku bobtnání škrobnatých a koloidních látek endospermu. Pro výrobu světlých sladů se volí stupeň domočení 42 – 45 %, u tmavých sladů 45 – 48 %. Příjem vody zrnem je ovlivněn její teplotou, dále velikostí zrna, dobou odležení ječmene, odrůdou, přístupem kyslíku, chemickým složením máčecí vody a technologií máčení. Nejdůležitějším faktorem je kyslík. Se zvyšujícím se obsahem vody začíná zrna dýchat a vytvářet oxid uhličitý. Při spotřebování kyslíku a přílišném nahromadění oxidu uhličitého přechází normální dýchání v intramolekulární anaerobní dýchání spojené s kvašením. Metabolity kvašení jako ethanol aj. mohou poškodit klíček. Naopak za dostatečného přístupu kyslíku se doba máčení zkracuje. [5], [7], [9], [10]

Máčení ječmene probíhalo dříve v kamenných, později betonových náduvnících. Dnes se používají náduvníky výhradně ocelové, většinou válcového tvaru s kónickým dnem a sklonem 45 °, aby se mohl samočinně vyprázdnit a ječmen tak vytékat ven. [5], [10]

Existuje několik způsobů máčení, ale u všech je vždy první máčecí voda, obsahující také dezinfekční prostředky, značně znečištěna, rychle se z ní vyčerpává kyslík a musí být proto brzy vyměněna. Nejběžnějším způsobem je máčení s provzdušňovacími přestávkami. Máčecí voda se podle teploty a množství vzdušnění 1 – 3krát denně vyměňuje. Mezi každým

napouštěním se dělá přestávka 4 – 6 hodin, aby se zrno dobře provzdušnilo. Celková doba máčení se pohybuje od 60 do 90 hodin, nejčastěji pak 72 hodin. Celkové ztráty při máčení by neměly překročit 3 % hmotnosti namáčeného ječmene. [5], [7], [10]

1.3.3 Klíčení ječmene

Cílem sladařského klíčení ječmene je aktivace a tvorba enzymů a docílení požadovaného stupně rozluštění zrna (odbourání rezervních látek) při minimálních nákladech a únosných skladovacích ztrátách. Dosahuje se toho umělým modelováním podmínek přirozeného klíčení vhodnou teplotou, vláhou a přístupem kyslíku. Řízení klíčení, nebo-li **vedení hromad**, se liší podle druhu vyráběného sladu, technického vybavení sladovny a kvality zpracovávaného ječmene. [5], [6], [7], [10]

Podmínkou pro syntézu a nárůst aktivity enzymů je zajištění dostatečného množství metabolické energie, která se získává oxidačním odbouráváním zásobních látek. Optimální podmínky pro sladařské klíčení ječmene jsou při 14 – 18 °C v hromadě, dostatek kyslíku v průběhu máčení a v počátečním stádiu klíčení pak vede k výrobě vysoce enzymatických sladů. [7], [10]

Z hlediska technologie patří mezi nejvýznamnější enzymy klíčení fosfatasy, cytasy, proteasy a hlavně amylasy. S výjimkou α -amylasy jsou ostatní enzymy v malém množství v ječmeni již přítomny. **Fosfatasy** uvolňují při svém působení z fyтину a dalších organických látek kyselce reagující fosforečnany a tím napomáhají tvorbě kyselých reakce tolik důležité pro činnost ostatních enzymů. [5], [10]

Cytasy jako komplex enzymů štěpí neškrobové polysacharidy celulosu, hemicelulosu a gumovité látky (glukany, pentosany). Hemicelulosa tvoří vysokomolekulární neškrobové polysacharidy β -glukany, které výrazně zvyšují viskozitu roztoků. Z tohoto důvodu je při výrobě sladu důležité jejich rozštěpení, jinak by mohly nastat potíže při stékání a filtraci piva. [5], [8], [9], [10]

Bezpochyby nejdůležitějšími enzymy sladu jsou **amylasy**. Rezervní škrob endospermu je jejich působením rozštěpen na maltosu a glukosu, které jsou dále prodýchávány za tvorby energie nezbytné pro životní procesy zrna. Čím déle se hromada vede při nízké teplotě, tím větší je aktivace a tvorba amylas. [5]

Klíčení sladovnického ječmene klasickým způsobem probíhá na humnech, což jsou prostorné místnosti s hladkými podlahami a účinným větráním. Charakteristická stádia klíčení jsou nazývána jako mokrá hromada, suchá hromada, pukavka, mladík, vyrovnaná a sejmutá hromada. [5], [6], [7]

Konečným produktem klíčení je **zelený slad**. Má mít zdravou vůni, mírně zavadlé kořínky, správně vyvinutou strelku a má být dobře rozluštěn. Podle vývinu strelky rozeznáváme tzv. **krátké slady** (délka strelky je 1/3 až 1/2 délky zrna), obvykle nedoluštěné, a **dlouhé slady** (strelka nad 3/4 délky zrna), které jsou vhodné pro výrobu tmavých sladů. [5], [7]

Kromě klasického sladování na humnech existuje ve světě široká paleta pneumatických sladoven. Ty můžeme rozdělit do čtyř skupin na bubnová klíčidla, skříňová klíčidla, šachtová klíčidla a horizontální klíčidla. Jejich výhodami jsou vysoká kapacita, snížená potřeba manuální práce, vysoký stupeň automatizace a také to, že jejich činnost není závislá na roční době. V moderních sladovnách jsou nejvíce používány klíčidla skříňová a polokontinuální posuvné hromady. [5]

Při klíčení dochází k trojnásobnému až šestinásobnému zvýšení obsahu riboflavinu a také zdvojnásobení úrovně niacinu. Většina vitaminů je však zničena během následujícího procesu hvozdění. [9], [14]

1.3.4 Hvozdění

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu. Cílem je snížení obsahu vody zeleného sladu pod 4 %, zastavené vegetačních pochodů v zrně a vytvoření aromatických a barevných látek tvořících charakter sladu. Toho se dosáhne řízeným a šetrným způsobem sušení. Nejprve se zelený slad na hvozdech předsuší při teplotě vzduchu do 60 °C, poté je dosušen při teplotách 60 – 80 °C u světlého sladu a 60 – 105 °C u tmavého sladu. [5], [6], [7], [10]

Snížením obsahu vody během hvozdění se stává slad skladovatelným a stabilním, zastavuje se klíčení a další luštění zrna. K nejdůležitějším reakcím při hvozdění patří tvorba chuťových a barevných (oxidoredukčních) látek. Tvorbu barevných melanoidinů způsobují reakce neenzymového hnědnutí, a to jak reakce karbonylových sloučenin s aminokyselinami, tak i reakce samotných karbonylových sloučenin. Oba typy reakcí probíhají při vyšší teplotě a vyšším obsahu vody. Čím rychleji tedy dochází k odstranění vody při předsušení za

nízké teploty, tím méně se enzymatickými reakcemi tvoří nízkomolekulární látky, jež se mohou podílet na reakcích neenzymového hnědnutí. [5], [10], [12]

Technologie hvozďení je upravována podle druhu vyráběného sladu, podle obsahu vody v zeleném sladu a podle typu hvozdu. Po skončení procesu hvozďení se usušený slad sklápí do košů a dopravuje k odkličovačce, kde dochází k odstranění kořínků zvaných sladový květ. Ten má vysoký obsah biologicky významných látek a je vyhledávanou surovinou v krmivářství i ve fermentačních technologiích. [5], [7]

Čerstvý slad hůře zcukřuje a je proto nutné jej nechat odležet, jinak by se mohly objevit poruchy při kvašení, rovněž by mohlo dojít ke snížení pěnivosti piva. Hvozďením byla narušena koloidně-chemická rovnováha, která se odležením regeneruje, dochází také k opětovné aktivaci oslabených enzymů. [7]

Ještě před expedicí se slad leští. Získáme tak výrobek čistého vzhledu za současného odstranění prachu a poškozených zrn. Takto upravený slad je možno skladovat na sýpkách nebo v silech až 2 roky. [7]

Při skladování je třeba vytvořit takové podmínky, aby slad přijal malé množství vody nutné k tzv. technologickému odležení, ovšem aby nezvlhl (kritická hranice je 5 % vlhkosti). Pro expedici se slad balí do jutových pytlů nebo je volně ložen přímo do dopravních prostředků určených pro potraviny. Proti navlhnutí je pytlovaný slad chráněn vnitřní polyetylenovou vložkou. [7], [10]

Převážnou část výroby tvoří světlé slady plzeňského, vídeňského a dortmundského typu. **Český (plzeňský) slad** se vyrábí z ječmene se středním obsahem bílkovin (do 11 %) a vlhkostí zrna 42 – 45 %. Je to krátký slad, který se hvozďí 2x 12 hodin nejprve při teplotě 40 – 50 °C a posledních 5 hodin se volí dotahovací teplota 80 °C. **Slad vídeňský** je podobný tomu českému, dotahovací teplota je však vyšší. [1], [7], [12]

Hojně vyráběný je i **slad bavorský (mnichovský)**, který je určen pro výrobu tmavých piv. Jedná se o slad dlouhý s obsahem bílkovin 12 % a vyšším a vlhkostí 46 – 48 %. Hvozďí se dvakrát 24 hodin s dotahovací teplotou 105 °C. [5], [7]

Slady speciální se používají k výrobě tmavých nebo speciálních piv. Od běžných světlých a tmavých sladů se liší především enzymovou aktivitou, kyselostí, barvou a vůní. Jejich přidáním k běžným sladům můžeme ovlivnit sensorické vlastnosti piva, zejména chuť,

barvu, aroma a pěnovost. Do této skupiny patří slad karamelový, barevný, diastatický, nakuřovaný nebo lihovarský, a dále v cizině vyráběné melanoidové a proteolytické slady. [5], [7]

Mezi speciální slady můžeme zařadit i **slad pšeničný**. Používá se při výrobě speciálních (tzv. bílých) piv nebo v pekárenství. Stupeň domočení pšenice bývá do 43 %. Tento slad se obtížně suší, proto musí být hvozdění velmi šetrné. Dotahovací teplota nesmí být vyšší než 75 °C po dobu 3 hodin. Pšenice nemá pluchy a tak nemůže samotný pšeničný sladový šrot vytvářet dostatečnou filtrační vrstvu na scezovací kádi. Pro výrobu tohoto sladu se volí pšenice s nižším obsahem lepku. [1], [10]

Výroba speciálních sladů činí v České republice asi jen 5 % z celkové produkce. [10]

1.4 Výroba piva

Technologii výroby piva můžeme rozdělit na tři hlavní technologické procesy:

1. výroba mladiny ze sladu, chmele a vody, popř. za použití surogátů,
2. kvašení mladiny a dokvašování mladého piva pivovarskými kvasinkami,
3. závěrečné úpravy a stáčení zralého piva do transportních nádob či obalů.

Mladina se ve světě vyrábí dvěma odlišnými způsoby. Na západě převládá jednormutový infuzní způsob bez povaření rmutu, u nás a v řadě dalších evropských zemí je rozšířen vícermutový dekokční způsob s povařováním rmutů. [5], [7], [12]

1.4.1 Výroba mladiny

Výroba mladiny sestává z následujících technologických operací: šrotování sladu (příp. surogátů), vystírání sladového šrotu do vody, rmutování, scezování sladinu a vyslazování sladového mláta, chmelovar a závěrečné úpravy mladiny. Látky obsažené ve sladu, především škrob, je nejprve nutno převést do roztoku, aby mohly být sladovými enzymy přeměněny ve směs nízkomolekulárních sacharidů, které jsou později kvasinkami zkvašeny na ethanol a oxid uhličitý. [5], [7], [8]

1.4.1.1 Šrotování sladu

Šrotování je mechanické drcení sladového zrna. Je to zdánlivě jednoduchá operace, ovšem složení šrotu výrazným způsobem ovlivňuje proces rmutování, scezování a varní výtěžek. Cílem šrotování je dokonalé vymletí endospermu při co nejmenším poškození pluch, které dále slouží jako filtrační materiál při scezování. [7], [8], [10], [12]

Plucha obsahuje kromě nerozpustné celulosy polyfenoly, pentosany, hořké a barevné látky. Jejich vyluhování vzrůstá s dobou kontaktu a s poškozením pluchy. Větší poškození pluch tak může negativně ovlivnit chuť piva. [10]

Předpokladem pro požadovaný průběh rmutování a vysoký varní výtěžek je jemné roze-mletí endospermu. Čím jemnější šrot je, tím lepší je přístup enzymů k jednotlivým částem sladu. Hrubá krupice se proto těžko rozpouští a pomalu zcukřuje. Je-li zastoupena ve větším množství, klesá dosažitelné prokvašení mladiny a vzrůstá obsah nezucukřeného extraktu v mlátě. Zpracování hrubších částic tak vyžaduje intenzivní a delší rmutování. Na druhé straně příliš jemný šrot může způsobovat ucpávání filtračních kanálek ve vrstvě mláta a působit tak potíže při scezování. [5], [10], [12]

Šrotování se musí přizpůsobit kvalitě sladu a technickému vybavení varny. Čím méně je slad rozluštěn, tím jemněji se musí šrotovat. [5]

1.4.1.2 Vystírání a rmutování

Sladový šrot se na začátku várky smíchá s vodou ve vystírací kádi nebo rmutovací pánvi. Této směsi se říká **dílo** nebo **vystírka**. Množství sladu či náhražek použité pro jednu várku nazýváme **sypání**. **Nálev** je pak objem vody použité k vystírce a určuje se podle sypání a druhu vyráběného piva. [1], [5]

Rmutováním dochází k mnoha enzymovým reakcím, včetně zcukření škrobu. Tyto pochody probíhají většinou při zvýšených teplotách optimálních pro činnost enzymů, jež způsobují rozštěpení a převedení požadovaného podílu surovin do roztoku. Nejdůležitější je činnost amylolytických, proteolytických a kyselinotvorných enzymů. [5], [7]

Již při vystírání přechází část surovin do roztoku, hlavní podíl se však získá až při rmutování. Volbou vhodných podmínek rmutování, zejména teplotního průběhu, můžeme ovlivnit působení enzymů tak, abychom dosáhli požadovaného složení sladiny. Podle teplot op-

timálních pro činnost jednotlivých druhů enzymů můžeme proces rmutování rozdělit následovně:

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

Základním požadavkem všech rmutovacích postupů je převést do roztoku veškerý škrob, včetně vhodného podílu bílkovin a dalších látek. Nejdůležitější chemickou reakcí při rmutování je proto štěpení škrobu na nízkomolekulární cukry, zejména glukosu, maltosu a dextriny. Naopak přítomnost složek, jako např. polyfenolů sladových pluch se snažíme omezit. [5], [7], [10]

Štěpení škrobu probíhá ve třech fázích, mluvíme o bobtnání a zmazovatění, ztekucení škrobu a jeho zcukření. Při zahřívání vodní suspenze sladového šrotu škrobová zrna postupně **bobtnají** a praskají. Amylosa se rozpouští na koloidní roztok a z amylopektinu vzniká viskózní škrobový maz. Zmazovatělý škrob obsahuje vodou nabobtnalé částice, do kterých snadněji vnikají sladové enzymy. Teploty mazovatění se liší podle druhu obilovin. Sladový a ječný škrob mazovatí při 50 – 57 °C, kukuřičný při 65 – 75 °C a rýžový dokonce až při 80 – 85 °C. Vzniklý škrobový maz je štěpen amylolytickými enzymy na dextriny a maltosu. [5], [7], [10]

Ke **ztekucení** škrobu dochází v další fázi účinkem sladové α -amylasy. Tento enzym katalyzuje štěpení α -1,4-glykosidických vazeb nespecificky uprostřed řetězců amylosy a mezi větveními amylopektinu. Tím se tvoří kratší řetězce, rychle klesá molekulová hmotnost a také viskozita roztoku. Optimální teplota ztekucení škrobového mazu je 65 – 75 °C při pH 4,6. [5], [10]

Ke **zcukření**, nebo-li úplnému rozštěpení makromolekul škrobu, dochází účinkem komplexu více amylolytických enzymů, zejména pak α - a β -amylasy. β -amylasa odštěpuje disacharid maltosu z neredukujících konců vzniklých štěpů amylosy a amylopektinu. Ve sladu je rovněž přítomen enzym maltasa (štěpí maltosu na dvě molekuly glukosy) a sacharasa (štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu). [5], [7], [10]

Složení rozpuštěného extraktu lze v určitém rozmezí měnit prodlužováním či zkracováním časových prodlev při optimálních teplotách pro dextrinotvornou α -amylasu nebo cukrotvornou β -amylasu. Hluběji prokvašená piva s vyšším obsahem alkoholu poskytují sladiny s vysokým obsahem zkvasitelných cukrů, naopak sladiny s více dextriny vedou k nízko-prokvašeným pivům s nižším obsahem alkoholu, vyšším zbytkovým extraktem a tedy i plnější chutí. Průběh štěpení škrobu se ve rmutech kontroluje jodovou zkouškou. [5]

Podle způsobu zvyšování teploty při rmutování můžeme rozlišit infuzní a dekokční postup rmutování. U nás se rmutování provádí ve rmutovacím kotli výhradně dekokčními postupy. Společným znakem **dekokčních postupů** je pomalé zahřívání dílčích rmutů na cukrotvornou teplotu a následné povaření (dekokce). Objem dílčích rmutů je volen tak, aby po povaření a přečerpání ke zbytku vystírky stoupla teplota na optimální hodnotu. Po vrácení rmutu do vystírací pánve je zpřístupněný škrob rychle zcukřen enzymy vystírky. [7], [10], [12], [15]

Rozlišují se postupy jednormutové, dvourmutové a třírmutové, naše pivovary používají nejběžněji dvourmutové. Pro dekokční postupy je charakteristický pokles enzymatické aktivity v důsledku povaření rmutu. [5], [7], [15]

U **infuzního postupu** rmutování se celý objem vystírky postupně vyhřívá jen na odrmutovací teplotu. Na rozdíl od dekokčního způsobu se tedy část díla nepovařuje, pivo má světlejší barvu a méně výraznou chuť. Infuzní způsob je běžný zejména ve Velké Británii nebo v Německu a používá se především při výrobě svrchně kvašených piv a při surogaci materiálů bez enzymové aktivity s aplikací průmyslově vyráběných enzymů. [1], [7], [10]

Při zpracování škrobnatých náhražek není zrno narušeno procesem sladování a neobsahuje tudíž technologicky významné množství aktivních enzymů. Je-li podíl náhražek vyšší než 15 %, sladové enzymy nedostačují ke štěpení molekul škrobu a je proto nutné užití enzymových preparátů s amylolytickou aktivitou. I za těchto podmínek však dochází k výrazně nižšímu štěpení dusíkatých látek při rmutování. [5], [10]

1.4.1.3 Scezování sladiny a vyslazování mláta

Scezování je proces oddělení sladového extraktu (sladiny) od pevného podílu zcukřeného rmutu, tzv. mláta. Provádí se většinou ve scezovací kádi, kdy se mláto po určité době usazuje na dno a vytvoří vrstvu vysokou asi 20-30 cm. Přes tuto vrstvu sedimentovaných

pluch a ostatních nerozpustných zbytků protéká sladina, která se takto zároveň čistí. Zfiltrovaný podíl extraktu sladu označujeme jako **předek**. [1], [7]

Mláto obsahuje po skončení stékání předku ještě hodně extraktu a je proto nutné jej vysladit. **Vyslazování mláta** se provádí horkou vodou o teplotě 75 °C, aby došlo k vyloužení posledních zbytků rozpustného extraktu. Zfiltrovaný roztok extraktu při vyslazování se nazývá **výstřelek**. Vyslazuje se buď nepřetržitě, kdy se napouští tolik vody, kolik odtéká ve výstřelcích, nebo se pracuje na více výstřelků. Nepřetržité vyslazování je sice rychlejší, avšak při vyslazování na 2 až 3 výstřelky se dosahuje vyšších varních výtěžků. Předek a výstřelky se shromažďují v mladinové pánvi. [1], [5], [10], [12]

Proces vyslazování se opakuje tak dlouho, dokud není dosaženo požadované stupňovitosti výstřelků, obvykle 1 %. Poslední výstřelky, nebo-li **patoky**, se většinou vedou do odpadu, mohou být ale použity také pro další várku. Zbylé mláto se z kádě vyhrne a dopraví do zásobníku mláta (mlátníku). Odtud se pak distribuuje zemědělským podnikům jako žádané krmivo. [1]

1.4.1.4 Chmelovar

Scezená sladina se spolu s výstřelky považuje v mladinové pánvi s chmelem. Ten se přidává ve formě granulí, popřípadě se tento granulát kombinuje s chmelovým extraktem. Přírodní chmel se používá spíše výjimečně, neboť vyžaduje přídatné zařízení k oddělení považených a vyloužených chmelových šištic, tzv. chmelový cíz. [1]

Chmelovar probíhá v našich pivovarech zpravidla 90 minut a jeho produktem je **mladina**. Ta musí svým složením odpovídat vyráběnému pivu, tzn. že při výrobě např. 10% světlého piva musí obsahovat 10 % hm. extrahovaných látek. Mladina obsahuje kromě vody také sacharidické složky, dusíkaté látky, chmelové a minerální látky, polyfenoly a vitaminy. Chemické složení mladiny má rozhodující vliv na konečnou kvalitu vyrobeného piva. [5]

Cílem chmelovaru je převedení hořkých látek z chmele a jejich částečná přeměna, odstranění nežádoucích těkavých látek, koagulace bílkovin a odstranění přebytečné vody tak, aby vyrobená mladina dosáhla požadované stupňovitosti a proběhly další požadované pochody, mající vliv na její vlastnosti. [1]

Hlavními reakcemi při chmelovaru jsou izomerační reakce chmelových α -hořkých kyselin, při kterých vznikají intenzivně hořké produkty zvané iso- α -hořké kyseliny. Při chmelovaru

probíhají i mnohé oxidační reakce, jež vedou k produktům ovlivňujícím sensorický charakter mladiny a následně i piva. Za horka dochází k degradaci mastných kyselin, oxidaci vyšších alkoholů, tvoří se produkty Maillardovy reakce, degradují se aminokyseliny a dochází také k enzymové a neenzymové oxidaci polyfenolů. [5]

Dávky chmele a chmelových preparátů jsou voleny podle typu vyráběného piva. Obvykle se chmel přidává nadvakrát nebo natřikrát, pouze ve výjimečných případech se chmelí na jednu dávku. Děje se tak při výrobě nízkochmelených piv nebo pokud chceme potlačit chmelové aroma. Chmelové extrakty nahrazují zpravidla 50 – 70 % hlávkového chmele. Přidávají se většinou na začátku chmelovaru, poté následuje granulovaný či hlávkový hořký či vysokoobsažný chmel, čímž se docílí požadované hořkosti. Na závěr se pro dosažení požadovaného aroma dávkuje výrobek z jemně aromatického chmele. [5], [7], [10]

Byl-li použit hlávkový chmel, následuje po chmelovaru oddělení zbytků v chmelovém cízu nebo jiném separátoru. Při použití granulovaného chmele se pevné podíly odstraní v průběhu chlazení mladiny spolu s kaly. Chmelové extrakty jsou prakticky beze zbytku rozpustné. [5]

1.4.1.5 Závěrečné úpravy mladiny

Mladinu po chmelovaru je nutné před dalším zpracováním technologicky upravit. Obsahuje totiž **hrubé kaly** (nesprávně označované jako horké kaly), tedy vysrážené vločky zejména bílkovinného charakteru. Vločky dále obsahují hořké látky, polyfenoly, mastné kyseliny a minerální látky, přičemž jejich vzájemný poměr značně kolísá. [1], [10]

Tyto kaly by mohly způsobovat problémy při kvašení, je proto nutné jejich odstranění. Pro separaci hrubých kalů se dříve používaly chladicí stoky, na nichž kaly sedimentovaly. Z důvodu možnosti mikrobiologické kontaminace jsou však dnes tato zařízení nahrazena zpravidla vířivými káděmi (whirpools), méně často usazovacími káděmi, odstředivkami nebo dekantéry. [1], [5], [12]

Vyčeřená mladina je pořád horká (přibližně 95 °C) a je nutno ji před aplikací várečných kvasinek **zchladit** na zákvasnou teplotu 5 – 7 °C, neboť by jinak došlo k jejich usmrcení. U dříve používaných otevřených chladicích systémů (chladicí stoky a sprchové chladiče) byla horká mladina ochlazována postupně vlivem okolního studenějšího vzduchu. Dnes se však u většiny pivovarů setkáváme s uzavřenými vířivými káděmi, ve kterých dochází

k usazení hrubých kalů a mladina se dochlazuje následně v deskových protiproudých výměnících tepla. [1], [5], [12]

Další operací je částečná či úplná **separace jemných kalů**. Při teplotách pod 80 °C dochází ve větší míře k vylučování částecek jemného kalu a původně čirá mladina se postupně kalí. Tato reakce, kterou způsobují především tríslobílkovinné komplexy, je reverzibilní a při zahřátí se kal opět rozpouští. Jemný kal vzhledem k velikosti částic obtížně sedimentuje, zanáší povrch kvasničných buněk a omezuje tak jejich látkovou výměnu. Zejména u intenzivních postupů kvašení nebo při vícenásobném použití kvasnic může negativně ovlivňovat rychlost kvašení a chuť piva. [10]

Kvašením v otevřených kvasných kádích dochází k vyloučení značného podílu jemných kalů v kvasné dece a v kvasinkách. Na rozdíl od hrubých kalů je však vhodné pouze jejich částečné odstranění, přílišná redukce může vést k prázdné chuti piva nebo k pomalejšímu kvašení z důvodu nedostatečného množství nenasycených mastných kyselin. [10]

Zchlazená mladina se nakonec **provzdušní** sterilním vzduchem, aby měly kvasinky v průběhu hlavního kvašení dostatečné množství kyslíku. [1], [5]

1.4.2 Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva

Zchlazená a provzdušněná mladina je ideálním prostředím pro pomnožování různých organismů, proto je nutné ji co nejdříve zkvasit kulturními várečnými kvasinkami. Dávkuje se zpravidla půl litru hustých vypraných a provzdušněných (protažených) kvasinek na sto litrů mladiny. V nejmodernějších pivovarech se tak děje zvláštními dávkovacími čerpadly přímo do proudu proudící mladiny, což zaručuje optimální rozptýlení kvasničných buněk v celém objemu vyrobené mladiny. [1], [7]

Pro kvašení mladiny se původně používal zákvas z předchozí várky. V současné době pod pojmem pivovarské kvasinky rozumíme 2 druhy kvasinek, jež se vzájemně liší svými vlastnostmi a to se také odráží v jejich technologickém použití. **Svrchní pivovarské kvasinky** *Saccharomyces cerevisiae* kvasí při teplotách v rozsahu 15 – 23 °C a používají se zejména na výrobu pšeničných piv. Po ukončení kvašení jsou vznikajícím oxidem uhličitým vynášeny na hladinu, kde tvoří tzv. deku. **Spodní pivovarské kvasinky** *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* (dříve *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis*) slouží k výrobě piv

plzeňského typu. Teploty kvašení se pohybují mezi 6 – 12 °C a po ukončení kvašení sedimentují na dno kvasných nádob. [1], [5], [7], [12], [16]

Klasickou technologii kvašení mladiny můžeme rozdělit do dvou fází a to na hlavní kvašení a dokvašování. V České republice probíhá **hlavní kvašení** obvykle v otevřených kvasných kádích spodními pivovarskými kvasinkami. Dochází při něm ke zpracování podstatné části zkvasitelného extraktu a trvá většinou 6 – 10 dní. Cílem kvašení je řízená přeměna zkvasitelných sacharidů glukosy, maltosy a maltotriosy na ethanol a oxid uhličitý za současného vytvoření vhodných organoleptických vlastností piva. Tento děj probíhá anaerobně podle následující reakce:



Zároveň se v malé míře tvoří i vedlejší kvasné produkty (alifatické alkoholy, aldehydy, ketony, estery, mastné kyseliny), které mají také vliv na chuťový charakter piva. [5], [7], [10], [12]

V kádích umístěných v chlazených prostorech zvaných spilka můžeme pozorovat několik stádií hlavního kvašení. Po 12 až 24 hodinách se na povrchu kvasící mladiny objevuje první bílá pěna. Této fázi se říká **zapašování**. Uvolňující se oxid uhličitý stoupá podél stěn kvasné kádě vzhůru a transportuje pěnu od stěny kádě k jejímu středu (tzv. odrážení). Úbytky extraktu jsou při zapašování velmi nízké a pohybují se do 0,35 % za den. [1], [10]

Druhým stádiem hlavního kvašení je **tvorba nízkých bílých kroužků**, které se začínají objevovat přibližně 36 hodin po naplnění kádě. Kvašení probíhá rychleji, také úbytek extraktu je výraznější a činí 0,8-1,2 % za 24 hodin. Tento proces trvá dva až tři dny, kdy se tvoří charakteristické růžice pěny smetanové barvy. [1], [10]

Stadium **vysokých hnědých kroužků** je obdobím nejintenzivnější činnosti kvasinek. Vznikající oxid uhličitý vynáší z mladiny různé kalý a tříslobílkovinné sloučeniny, které barví pěnu dohněda. V této fázi dochází logicky také k největšímu úbytku extraktu (až 1,8 %) a také k poklesu hodnoty pH na 4,6 až 4,4. [1], [10]

Čtvrtým a posledním stádiem je tzv. **propadání deky**, kdy se výrazně snižuje intenzita kvašení a úbytek extraktu nepřesahuje 0,3 % za 24 hodin. Povrch mladého piva je pokryt nízkou (2 až 3 cm) a tmavou vrstvou pěny – dekou. Ta obsahuje vyloučené látky, kvasinky a kontaminanty, jež by při propadnutí do mladého piva mohly způsobit jeho nepříjemnou

hořkost. Deka se proto sbírá pomocí děrované lžíce, někdy opakovaně. Tímto stadiem je proces hlavního kvašení ukončen. [1], [10]

Na dno kvasné kádě současně sedimentují spodní kvasinky, které se po stáhnutí piva sbírají, propírají studenou vodou a znovu nasazují do provozu. [5], [6], [7]

Dokvašování a zrání mladého piva probíhá v ležáckém sklepě, kde při teplotách 1 – 3 °C pivo v ležáckých tancích velmi pozvolna dokváší, číří se, zraje a sytí vznikajícím oxidem uhličitým. Doba ležení je závislá na druhu vyráběného piva, u stolních a výčepních piv bývá 3 týdny, u speciálních exportních piv může trvat až několik měsíců. Zráním piva dochází k odbourání chuti mladého piva za současného nárůstu obsahu sensoricky aktivních esterů. [5], [6], [7], [8], [10]

Pivovarské kvasinky jsou významným zdrojem vitaminů B-komplexu. Dokáží absorbovat thiamin přítomný ve sladu. Přestože obsahují až 160 mg·kg⁻¹ tohoto vitamínu, v pivu je thiamin obsažen jen v nepatrném množství (0,01-0,06 mg·dm⁻³). Jinak je tomu v případě riboflavinu. Při fermentaci, na rozdíl od thiaminu, nezůstává v kvasničných buňkách a je tak v pivu přítomen v množství asi 0,5 mg·dm⁻³. [17]

1.4.3 Závěrečné úpravy piva

Dokonale vyzrálé pivo se musí ještě před plněním do spotřebitelských a transportních obalů zfiltrovat, aby získalo jiskrnou čírost a zbavilo se zbytků neusazených mikroorganismů a koloidních kalických částí. [5], [6], [9]

Filtrace piva se nejčastěji provádí na křemelinových a deskových celulosových filtrech různé konstrukce. Dříve se pivo filtrovalo přes desky obsahující zvýšený podíl dlouhovělnitého azbestu. Filtrační materiály obsahující azbest jsou však dnes z potravinářských provozů vyloučeny a nahrazeny jinými materiály, jež vykazují vedle mechanických také adsorpční účinky. Nejmodernějším a stále více se rozšiřujícím způsobem jsou membránové filtrace, které jsou ovšem velmi nákladné. [5], [6], [7], [9]

Dalším důležitým krokem je docílení požadované biologické stability piva jeho **pasterací**. Ta se provádí zejména v lahvích či v plechovkách v ponorných a tunelových pastérech při teplotě 62 °C po dobu 20 – 30 minut, méně častá je kvůli nebezpečí vzniku varné příchuti mžiková pasterace v průtokových pastérech při teplotě kolem 80 °C. [5], [7], [12]

U exportních piv, kdy je nezbytné zaručit mnohaměsíční trvanlivost, se provádí **stabilizace** založená na principu odstranění prekurzorů zákalů piva, především vysokomolekulárních dusíkatých látek, polyfenolů, kovových iontů a rozpuštěného kyslíku. [5], [6], [7]

Rozlišujeme stabilizátory adsorpční (silikagel, polyvinylpolypyrrolidon), antioxidační (kyselina askorbová) pro eliminaci vlivu kyslíku, srážecí (tanin) a enzymové (papin). Od posledních dvou jmenovaných se ale postupně upouští. Do piva se přidávají nejčastěji před koncem dokvašování, aby se případně vyloučené látky odstranily při filtraci. V některých zemích je použití těchto stabilizátorů legislativně omezeno. [5], [7]

Konečnou fází výroby je **stáčení piva** do transportních (cisterny) a spotřebitelských obalů (sudy, lahve, plechovky). Aby neutrpěla kvalita piva, je při stáčení nutné zamezit ztrátám oxidu uhličitého a styku piva s kyslíkem. Z tohoto důvodu se v moderních linkách stáčí pivo pod tlakem oxidu uhličitého do obalů předplněných oxidem uhličitým nebo směsí oxidu uhličitého s dusíkem. Dusík se stále více uplatňuje jako ochranný plyn při plnění piva do obalů pro jeho příznivý vliv na tvorbu, trvanlivost a vzhled pivní pěny. V posledních letech se rozšiřuje plnění do nevratných plastových lahví, jejichž používání je zejména s ohledem na ekologické aspekty v řadě zemí omezeno zákonnými předpisy. [5], [7]

V České republice se vyrábějí převážně světlá piva technologií dekokčního rmutování a spodního kvašení. Podle koncentrace mladiny můžeme rozlišit piva výčepní (konzumní), ležáky a piva speciální. Zvláštním typem jsou piva se sníženým nebo nulovým obsahem alkoholu, jež jsou vyráběna buď potlačeným kvašením z nízkoprocentních mladin, nebo odstraněním alkoholu z hotového piva pomocí vakuové destilace či membránových procesů. [5], [6], [7], [10]

Zejména v zahraničí se v posledních letech rozšířila výroba piv se sníženým energetickým obsahem (lehká piva, light beer) u nás dříve nesprávně označovaná jako Dia-piva. Kvasnicová piva jsou produkována zpravidla v minipivovarech přidávkem rozkvašené mladiny do již hotového piva nebo s vyloučením filtrace. [5], [6], [7]

2 VITAMINY

Vitaminy jsou esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro život organismu. Heterotrofní organismy je nedokáží syntetizovat, nebo jen v omezené míře (např. syntéza niacinu z tryptofanu u člověka), a jsou proto získávány jako exogenní látky především potravou. Některé z nich mohou být produkovány také střevní mikroflórou. Vitaminy nejsou pro organismus zdrojem energie, ani stavebním materiálem, mají však několik důležitých funkcí. Jsou nezbytné pro látkovou přeměnu, kdy plní významnou úlohu jako prekurzory kofaktorů různých enzymů (vitaminy skupiny B). Biochemické reakce katalyzují buď samy, nebo ve formě složitých sloučenin, jež vznikají teprve v organismu. Některé z nich se uplatňují také v oxidačně redukčních systémech (vitamin C, vitamin E). [12], [18], [19], [20], [21]

K označení vitaminů používáme buď písmena abecedy (vitaminy s podobnými fyziologickými účinky dále rozlišujeme číselnými indexy), nebo pomocí názvů odvozených od jejich chemického složení. Protože po chemické stránce neexistují mezi jednotlivými vitaminy žádné strukturní vztahy, podle nichž by mohly být klasifikovány, využívá se k jejich základnímu rozdělení společné fyzikální vlastnosti – rozpustnosti. Vitaminy rozpustné ve vodě (v polárním prostředí) nazýváme **hydrofilní**. Do této skupiny patří vitaminy B-komplexu a vitamin C. Vitaminy rozpustné v tucích (v nepolárním prostředí) označujeme jako **lipofilní** a řadíme sem vitaminy A (a jeho provitaminy), D, E, K a vitamin F (esenciální mastné kyseliny). [12], [19], [21], [23], [24]

Některé organické sloučeniny samy o sobě nevykazují vitaminosní účinky, působením UV záření nebo pomocí enzymů však může v těle docházet k jejich přeměně ve vitaminy. Tyto látky nazýváme **provitaminy**. Příkladem může být β -karoten jakožto provitamin retinolu (vitaminu A). [17], [23]

Vitaminy působí již v nesmírně malých koncentracích. Jejich nedostatečný příjem v potravě může být příčinou mnohých nemocí. Deficienci v lehčích podobách označujeme jako **hypovitaminosu**, těžší podobu, jež se projevuje poruchami některých biochemických procesů, pak nazýváme **avitaminosa**. Dlouhodobý extrémní nedostatek vitaminů může vést až ke smrti organismu. Na vzniku avitaminosy se však mohou podílet i jiné faktory jako např. nedostatečná resorpce vitaminů při onemocnění zažívací soustavy, či přítomnost **antivitaminů**, což jsou látky inhibující určitým mechanismem biologické účinky vitaminů. [17], [18], [23], [25]

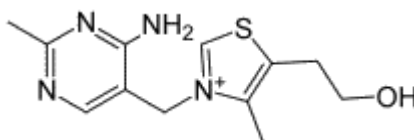
Naopak nadbytečný příjem některých vitaminů může vyvolat **hypervitaminosu**. Ta může vést rovněž k těžkým onemocněním, kdy jsou nebezpečné zejména zvýšené dávky lipofilních vitaminů A a D. Vitaminy rozpustné ve vodě nejsou v organismu ukládány vůbec nebo jen omezeně a jejich přebytek je vyloučen močí. Vitaminy rozpustné v tucích jsou skladovány v játrech. [17], [23], [26]

Vitaminy patří mezi velmi labilní složky potravin. Během technologického zpracování a kulinární úpravy dochází u většiny z nich ke ztrátám výluhem (hydrofilní vitaminy) či oxidací (lipofilní vitaminy). Jsou proto považovány za indikátory použití správných technologických postupů. [17], [18], [25]

V potravinářském průmyslu se vitaminy používají k obohacení řady výrobků (restituce a fortifikace). Některé z nich našly uplatnění také jako přirozená barviva (riboflavin, vitamin a provitaminy A) nebo jako antioxidanty (vitamin C, E, A). [17]

2.1 Thiamin (Vitamin B₁)

Thiamin (dříve nazývaný aneurin) obsahuje **pyrimidinový cyklus** (4-amino-2-methylpyrimidin) spojený methylenovou skupinou na C-5 s dusíkem **thiazolového cyklu** 5-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-thiazolu. Jedná se o vysoce specifickou látku a jakékoliv změny v molekule vedou ke ztrátě biologické aktivity. [17], [18], [21], [27], [28]



Obr. 1. Thiamin [24]

Vyskytuje se především jako volná látka nebo ve formě fosforečných esterů. Biochemicky aktivní formou je **thiamindifosfát (TDP)**, jež vzniká z thiaminu v různých orgánech účinkem enzymu *thiaminokinasy*. TDP je kofaktorem enzymů *dekarboxylas* a *aldehydtransferas*. Hraje důležitou úlohu při dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové a při oxidační i neoxidační dekarboxylaci α -ketokyselin, zároveň se také podílí na konečném odbourávání metabolických produktů lipidů a proteinů. Svými biochemickými funkcemi tak thiamin zasahuje do metabolismu cukrů, tuků i aminokyselin. Druhou účinnou formou je **thiamintrifosfát (TTP)**. [17], [20], [23], [24]

Thiamin patří k nejméně stálým vitaminům. Relativně stabilní je v kyselém prostředí ($\text{pH} < 5$). V neutrálním a alkalickém prostředí, kdy se vyskytuje jako volná báze, je značně nestálý a dochází k jeho hydrolýze. Podobně se může tento vitamin štěpit také působením oxidu siřičitého nebo hydrogensířičitanů. [17], [21], [25]

V **rostlinných surovinách** se thiamin nachází především ve volné formě. Jeho nejcennějším zdrojem jsou pro člověka cereální výrobky, jež kryjí asi 40 % denní potřeby. Vitamin je v obilovinách přítomen hlavně v klíčku a v aleuronové vrstvě, tedy i v otrubách. Podle stupně vymletí tak bílé mouky obsahují až desetkrát méně thiaminu než mouky celozrnné. Dalšími důležitými zdroji thiaminu jsou luštěniny nebo brambory. [17], [25], [27]

V **živočišných tkáních** je zhruba 80 – 90 % tohoto vitaminu přítomno ve formě thiamindifosfátu, jež musí být před absorpcí v organismu enzymaticky rozštěpen. Hlavními zdroji jsou maso (především vepřové) a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vnitřnosti a vejce. [21], [23], [27]

Mnohé mikroorganismy (např. pivovarské kvasinky) jsou schopny thiamin syntetizovat a jsou proto jeho bohatým zdrojem. Thiamin je produkován rovněž intestinální mikroflórou, avšak množství vitaminu dodaného tímto způsobem je příliš nízké, a tak je potřebné množství získáváno prakticky pouze potravou. Obecně se ve vyšších koncentracích vyskytuje v potravinách bohatých na sacharidy, kde probíhá intenzivní metabolismus cukrů (obiloviny, luštěniny, vepřové maso, játra). [17], [18], [27]

Kapacita zásob thiaminu v lidském organismu je poměrně nízká a činí 25 – 30 mg. Biologický poločas obratu je 10 – 20 dnů, proto by měl být příjem thiaminu potravou relativně pravidelný. [18]

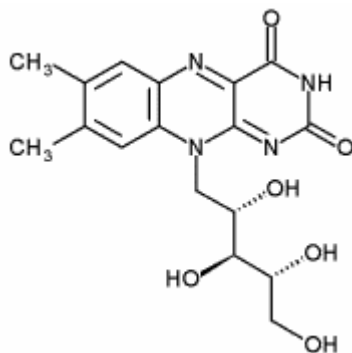
Nedostatečné množství vitaminu B₁ může být způsobeno chronickým alkoholismem, hladověním, nedostatečnou tvorbou žaludeční šťávy, nadbytkem enzymů *thiaminas* nebo přítomností antivitaminu oxythiaminu. Zvýšený výskyt thiaminové deficiencie byl pozorován také u HIV-pozitivních pacientů. Avitaminosa thiaminu může vést k onemocnění **beri-beri**, které je i dnes dosti rozšířeno v rozvojových zemích jihovýchodní Asie. Projevuje se masivním snížením neurologických funkcí, úbytkem kosterního svalstva, poruchami srdeční činnosti a edémem. [17], [23], [24], [26]

Hypervitaminosa se u thiaminu téměř nevyskytuje. Jeho toxicita je velmi nízká a za bezpečnou koncentraci při perorálním užití je považován až stonásobek doporučené denní dávky. [18], [23]

Množství potřebného vitamínu souvisí s množstvím sacharidů přijímaných v potravě. Doporučený příjem u dospělých osob s denním příjmem energie 12600 kJ (3000 kcal) je stanoven na 1,2 mg. Zvýšený příjem thiaminu je doporučen těhotným a kojícím ženám (1,4 mg·den⁻¹). [17], [23], [28]

2.2 Riboflavin (Vitamin B₂)

Riboflavin patří do skupiny látek zvaných flaviny. Základem jeho struktury je isoalloxazinové jádro, na které se váže ribitol. Chemicky se jedná o 7,8-dimethyl-10-(1'-D-ribityl)isoalloxazin. V biochemických systémech se vyskytuje volný nebo vázaný ve formě flavinových kofaktorů **FMN** (flavinmononukleotid) a **FAD** (flavinadenindinukleotid). [23], [29], [30]



Obr. 2. Riboflavin [24]

Jedná se o žlutozelenou krystalickou látku, jejíž vodné roztoky mají schopnost fluorescence. Riboflavin dokáže převádět krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené a umožňuje tak vidění za šera. Volně se vyskytuje především v sítnici. Účastní se oxidačně redukčních reakcí, kdy při redukci přijímá dva atomy vodíku za vzniku bezbarvého **leukoriboflavinu**, na vzduchu pak dochází k jeho zpětné oxidaci. Uplatňuje se rovněž v metabolismu ostatních vitamínů skupiny B (pyridoxin, niacin), v produkci hormonů v nadledvinkách nebo při tvorbě krevních elementů a zárodečných buněk. [18], [21], [23], [27]

V neutrálním a zásaditém prostředí jsou za přístupu světla všechny flaviny (zvláště pak volný riboflavin a FMN) značně nestálé. Absorbovanou světelnou energii předávají vzduš-

nému kyslíku, z něhož vzniká singletový kyslík. Ten oxiduje organické sloučeniny a současně dochází k fotolytickému štěpení flavinů. Fotodegradací riboflavinu v neutrálním či kyselém prostředí vzniká **lumichrom** (7,8-dimethylalloxazin), v alkalickém prostředí je to **lumiflavin** (7,8,10-trimethylisoalloxazin). [17], [21], [23], [25], [27]

U mléka, ale také u vína či piva, působí riboflavin jako fotosenzibilizátor při expozici slunečnímu světlu v nevhodných obalech. Vzniklý lumiflavin a singletový kyslík způsobují rozsáhlou destrukci vitamínu C či oxidaci retinolu, esenciálních mastných kyselin a aminokyselin. Rozkladem methioninu a cysteinu pak vznikají těkavé sirné sloučeniny, které způsobují nepříjemný, tzv. **sluneční přípach**. Vyjma ozáření UV paprsky je riboflavin velmi stálý a to i při tepelném zpracování. K větším ztrátám ale může docházet výluhem. [17], [31]

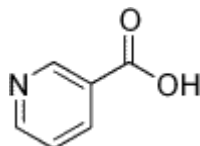
Až 40 % riboflavinu získaného potravou zajišťuje mléko a výrobky z něj, dalšími bohatými zdroji jsou maso a masné výrobky (20 %), cereálie (15 %), vejce, luštěniny, játra a ledviny. Dobrymi zdroji jsou i droždí, obilné klíčky či některé houby. V trávicím traktu je riboflavin daleko lépe absorbován z potravin živočišného původu, v rostlinné stravě totiž převládají kovalentně vázané formy, jež jsou *proteasami* obtížně štěpitelné. [18], [23], [25], [30]

Ke vzniku hypovitaminosy vede nedostatečný příjem riboflavinu trvající déle než 100 dní. Ta se u člověka projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, některými očními nebo nervovými poruchami. Deficience je poměrně vzácná a vyskytuje se zejména u osob, jež konzumují nedostatečné množství mléka a mléčných výrobků. Hypovitaminosa může být způsobena také dlouhotrvajícím stresem, nemocemi štítné žlázy, záněty tenkého střeva či konzumací alternativní stravy (vegani, vegetariáni). U těchto osob se deficience riboflavinu projevuje společně se symptomy nedostatku ostatních vitaminů B-komplexu. [21], [23], [24], [27], [28]

Doporučený denní příjem riboflavinu je (vzhledem k jeho působení v energetickém metabolismu a metabolismu proteinů) závislý na obsahu bílkovin a energetické hodnotě potravy. U průměrného obyvatele ČR činí tato hodnota 1,5 mg·den⁻¹. Kojícím matkám, při infekčních onemocněních, po chirurgických zákrocích či při zvýšené aktivitě štítné žlázy je doporučen zvýšený denní příjem okolo 1,8 mg. [18], [23], [28]

2.3 Kyselina nikotinová a její amid

Kyselina nikotinová a její amid, chemicky kyselina 3-pyridinkarboxylová a 3-pyridinkarboxamid, jsou známy jako vitamin B₃, dříve nazývaný také vitamin PP (Pelagra Preventive factor). Obě tyto látky mají stejnou biologickou účinnost. Starší název niacin se dodnes používá k označení příbuzných látek tvořených kyselinou nikotinovou, nikotinamidem a jejich deriváty. [18], [21], [23], [29]



Obr. 3. Kyselina nikotinová [24]

Nikotinamid je součástí **nikotinamidadenindinukleotidu NAD** (oxidovaná forma NAD⁺, redukovaná forma NADH) a jeho esteru **nikotinamidadenindinukleotidfosfátu NADP** (NADP⁺, NADPH), jež jsou souhrnně označovány jako *koenzymy pyridinových dehydrogenas*. Jejich funkce spočívá v odebrání dvou atomů vodíku substrátu. NAD⁺ a NADP⁺ jsou součástí *oxidoreduktas* katalyzujících oxidace primárních a sekundárních alkoholů, aldehydů, α -aminokyselin, účastní se také syntézy a odbourávání cukrů nebo přenosu elektronů v respiračních systémech, např. ve většině reakcí Krebsova cyklu. [17], [20], [23], [24], [29]

Lidský organismus je schopen niacin omezeně syntetizovat z aminokyseliny tryptofanu pomocí enzymů obsahujících jako kofaktor vitamin B₆. K vytvoření 1 mg niacinu je přitom zapotřebí asi 60 mg tryptofanu. Potřeba vitaminu je tedy ovlivněna přísunem bílkovin v potravě. Ty ale obsahují také leucin, jež biosyntézu NAD z tryptofanu inhibuje. [21], [25], [27], [28]

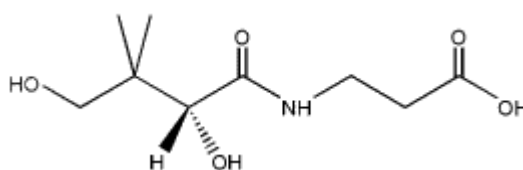
Doporučená výživová dávka pro středně pracující obyvatele ČR se pohybuje v rozmezí 16 – 20 mg·den⁻¹. Potřebu vitaminu pokrývají jak potraviny živočišného původu, ve kterých se vyskytuje především nikotinamid, tak potraviny původu rostlinného s převažující kyselinou nikotinovou. Nejbohatšími zdroji tohoto vitaminu jsou vnitřnosti, maso a masné výrobky, vejce (zejména žloutek), kvasnice, luštěniny či obiloviny (obsah v moukách opět závisí na stupni vymletí). V některých cereáliích, především v kukuřici a čiroku, je niacin pevně vázán na glykopeptidy a jako takový je nevyužitelný. Bohatým zdrojem je také pra-

žená káva. Zelené kávové boby obsahují alkaloid **trigonellin**, který při pražení degraduje na kyselinu nikotinovou a sensoricky aktivní pyridiny. [17], [18], [23], [25]

Niacin není klasickým vitaminem, jelikož si tělo dokáže část potřebného množství samo syntetizovat z aminokyseliny tryptofanu. Výskyt deficience je v našich podmínkách vzácný, může se ale objevit v zemích třetího světa, kde se obyvatelstvo stravuje především kukuřicí a čirokem. Nedostatek tohoto vitaminu může zapříčinit vznik nemoci zvané **pelagra**, která se projevuje kožními chorobami a nervovými poruchami. Rovněž se mohou objevit poruchy sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku, poruchy vstřebávání vitaminu B₁₂, či poruchy transportu sodíku, draslíku a glukosy. Hypervitaminosa niacinem vede k hemoragiím v ledvinách a za toxické je pro dospělou osobu považováno množství 1,8 mg na 1 kg tělesné hmotnosti. Při suplementaci bývá místo kyseliny nikotinové doporučován její amid, jelikož je lépe tolerován. [18], [21], [24], [27], [28]

2.4 Kyselina pantothenová (Vitamin B₅)

Kyselina pantothenová je látka velmi dobře rozpustná ve vodě, která se zahříváním s kyselinami či zásadami hydrolyzuje. Chemicky se jedná o D-(+)- α,γ -dihydroxy- β -dimethylbutyryl- β' -alanin. Biologický účinek tohoto vitaminu je specificky vázán na uvedenou strukturu. Je-li β -alanin nahrazen jinou aminokyselinou, je tato látka fyziologicky neúčinná a může dokonce vykazovat antivitaminovou aktivitu. [18], [23]



Obr. 4. Kyselina pantothenová [24]

V přírodě se kyselina pantothenová vyskytuje jako přirozená součást **koenzymu A** (CoA, CoA-SH), který se podílí na řadě metabolických pochodů. V rostlinách a v některých mikroorganismech se tato kyselina syntetizuje z pantoové kyseliny a β -alaninu, savčí organismus však tuto schopnost postrádá. Kyselinu je schopen pouze přenášet do molekuly koenzymu A a do speciálního proteinu **ACP** (ACP-SH, Acyl Carrier Protein). V přírodních materiálech se kyselina pantothenová a její soli vyskytují pouze jako D(+) formy, L(-) formy v těle nevykazují vitaminovou aktivitu. V malém množství je tato kyselina doprovázena

svým vyšším homologem – kyselinou hopantenovou, která obsahuje místo β -alaninu vázanou kyselinu γ -aminomáselnou. [12], [17], [23], [25]

Koenzym A se účastní klíčových reakcí v metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů, rovněž zasahuje do biosyntézy cholesterolu, steroidních hormonů, neurotransmiterů, porfyrinu a hemoglobinu. Jeho hlavní biologickou funkcí je přenos acylových skupin (acetyl-CoA) za současné tvorby thioesterů. Takto aktivované formy původních metabolitů vstupují do biochemických reakcí jako je β -oxidace mastných kyselin či citrátový cyklus. Ve formě nosného proteinu ACP má pantothenová kyselina významnou úlohu při biosyntéze mastných kyselin. [18], [23], [24], [27]

Kyselina pantothenová je nejstabilnější v slabě kyselém prostředí (pH 4-5). V kyselém i alkalickém prostředí dochází k hydrolýze amidové vazby za vzniku pantoové kyseliny, resp. její soli β -alaninu. Koenzym A se snadno oxiduje za vzniku disulfidu a je relativně stabilní v prostředí o pH 2-6. Ke ztrátám vitamínu B₅ dochází v potravinách jednak skladováním, především ale termickým zpracováním potravin. Významné jsou také ztráty vyluhováním, které bývají často vyšší než ty způsobené hydrolýzou.[17]

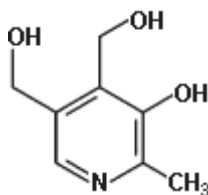
Kyselina pantothenová se v malém množství vyskytuje prakticky ve všech potravinách rostlinného a živočišného původu, a to zpravidla ve vázané formě jako koenzym A, acylkoenzymy A a ACP. Dobrymi zdroji tohoto vitamínu jsou ledviny, játra, vaječné žloutky, maso (včetně rybího), některé sýry, cereální výrobky, luštěniny, rýže, houby a kvasnice. [23], [24], [28]

Dostatečný příjem kyseliny pantotenové je zajištěn běžnou smíšenou stravou, proto se minimální denní požadavek na tento vitamin stanovuje velmi obtížně. Výživová doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR byla vypočtena na 7,3 mg·den⁻¹. Případy deficiencie bývají pouze ojedinělé, mohou se vyskytnout u osob s těžkou malnutricí nebo po podání antagonistů a projevují se především dermatitidami. [18], [21], [23]

2.5 Pyridoxin (Vitamin B₆)

Názvem pyridoxin se označují tři navzájem příbuzné látky, které všechny plní funkci vitamínu. Liší se substitucí v poloze 4 pyridinového kruhu a jsou to **pyridoxol** (2-methyl-3-hydroxy-4,5-bis-hydroxymethylpyridin), **pyridoxal** (2-methyl-3-hydroxy-4-

formyl-5-hydroxymethylpyridin) a **pyridoxamin** (2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethylpyridin). [17], [25], [27], [29]



Obr. 5. Pyridoxin [24]

V biochemických systémech vystupuje pyridoxin ve formě fosfátových derivátů. Pyridoxal-5'-fosfát je kofaktorem *dekarboxylas*, *aminotransferas* a dalších enzymů. Účastní se řady reakcí souvisejících s metabolismem aminokyselin jako jsou α -dekarboxylace vedoucí ke vzniku biogenních aminů, aldolizace či racemizace. U pyridoxalu, pyridoxaminu a jejich fosfátů existuje možnost vzájemné přeměny transaminací. Koenzymy jsou nezbytné v metabolismu cukrů při štěpení glykogenu, ovlivňují také biosyntézu porfyrinu, hemoglobinu a některé funkce nervového a imunitního systému. [12], [18], [20], [23]

V potravinách živočišného původu se vitamin B₆ vyskytuje především ve formě fosforečných esterů pyridoxalu a pyridoxaminu. Až 40 % vitamínu hradí maso a masné výrobky, dále je pyridoxin obsažen ve vnitřnostech, vaječném žloutku a samozřejmě v droždí. V potravinách rostlinného původu najdeme hlavně pyridoxol a pyridoxal. Dobrymi zdroji jsou obilné klíčky, cereální výrobky, sójové boby, brambory či luštěniny. [17], [23]

Doporučená výživová dávka tohoto vitamínu činí pro průměrného obyvatele ČR asi 1,7 mg·den⁻¹. Zvýšený příjem (2 mg·den⁻¹) je doporučován těhotným a kojícím ženám a také při dlouhodobém podávání některých léků, např. cytostatik, estrogenů či antidepresiv. Nedostatek vitamínu B₆ se projevuje dermatitidami a nervovými poruchami. Deficience však většinou nesouvisí s nedostatečným příjmem pyridoxinu v potravě. Častější příčinou bývá snížená absorpce vitamínu v trávicím traktu, alkoholismus nebo přítomnost antivitaminů. [17], [18], [27], [28]

Vitamin B₆ je relativně stálý v kyselých roztocích, méně už v neutrálním a alkalickém prostředí a zejména na světle. Ztráty při skladování a zpracování se značně liší podle převládající formy přítomného vitamínu. Protože je pyridoxol stálejší než pyridoxal a pyridoxamin, jsou i ztráty u potravin rostlinného původu, ve kterých tato forma vitamínu převládá, menší. Hlavní příčinou ztrát bývá vyluhování, často také reakce pyridoxalu s bílkovinami. [17]

3 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je fyzikálně chemická metoda sloužící k separaci a analýze složitých směsí látek s navzájem velmi podobnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, které by se jinými metodami analyzovaly jen velmi těžce, bylo-li by to vůbec možné. Na základě odlišné pohyblivosti jednotlivých látek ve směsi můžeme za daných podmínek získat jednotlivé složky ve velice čistém až homogenním stavu. Chromatografie umožňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu. Kvalitativní analýza slouží ke zjištění, jaké druhy látek danou směs tvoří, kdežto pomocí kvantitativní analýzy můžeme určit, v jaké koncentraci jsou tyto látky ve směsi přítomny. Výsledkem separace složek směsi může být i skutečnost, že v daném experimentálním uspořádání je možné stanovit, zda se zkoumaná substance skládá z několika různých látek nebo je tvořena jen jednou jedinou a jedná se tedy o látku v čistém stavu (např. při kontrole čistoty látek). [32], [33], [34], [35]

3.1 Princip chromatografie

Základním principem chromatografie je rozdělování složek směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Nepohyblivé fázi se říká **stacionární** a může se jednat o pevnou látku či film kapaliny zakotvený na pevné látce. Fáze, která se v chromatografickém systému pohybuje, se nazývá **mobilní**. Tou může být kapalina, plyn nebo nadkritická tekutina. [32], [33], [36], [37]

Pokud umístíme zkoumaný vzorek na začátek stacionární fáze a necháme podél ní zvolna protékat fází mobilní, dojde postupně k oddělení jednotlivých složek v důsledku děje nazývaného **diferenční migrace**. V podstatě jde o to, že jednotlivé složky směsi mohou být zachycovány stacionární fází a tím bržděny v pohybu. Čím silnější jsou interakce se stacionární fází, tím je zpomalení výraznější. Naopak látky, které s touto fází nikterak nereagují, jsou nerušeně unášeny mobilní fází a na konec stacionární fáze se dostanou jako první. Tímto způsobem dochází k jejich separaci. [36], [38], [39], [40]

3.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody tvoří značné množství metod založených na odlišných principech separace. Podle různých kritérií je můžeme rozdělit následovně:

1) podle účelu:

- a) analytická chromatografie
- b) preparativní chromatografie

Analytická chromatografie pracuje obecně s velmi malým množstvím vzorku a slouží k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek zkoumané směsi. [34], [41]

2) podle skupenství mobilní fáze:

- a) kapalinová chromatografie (LC)
- b) plynová chromatografie (GC)

3) podle způsobu uspořádání stacionární fáze:

- a) kolonová (sloupcová) chromatografie
- b) plošné techniky
 - papírová chromatografie (PC)
 - tenkovrstevná chromatografie (TLC)

Při kolonových separacích je stacionární fáze umístěna v trubici, kterou protéká mobilní fáze poháněná buď gravitací (hovoříme o *nízkotlaké kolonové chromatografii*) nebo častěji čerpadlem či přetlakem plynu u plynové chromatografie. V těchto případech můžeme použít daleko jemnější materiál stacionární fáze. Kolony se tak stávají podstatně účinnější, s vyšším počtem teoretických pater a kapacitnější díky většímu povrchu stacionární fáze. [33], [36], [38], [41]

4) podle principu separace:

- a) rozdělovací chromatografie
- b) adsorpční chromatografie
- c) iontově-výměnná chromatografie
- d) gelová chromatografie
- e) afinitní chromatografie

Při separaci se obvykle uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, avšak jeden z nich převládá. [38]

Rozdělovací chromatografie je založena na rozdílné rozpustnosti složek vzorku ve stacionární (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn). Pokud je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární, hovoříme o *chromatografii s normálními fázemi*, pokud je tomu naopak a mobilní fází je nějaká organická kapalina s nízkou polaritou, jedná se o *chromatografii s obrácenými fázemi*, častěji nazývanou jako *reverzní chromatografie*. Ta je dnes mnohem běžnější, neboť je aplikovatelná na podstatně širší okruh analytů. Použité kapaliny jsou zakotveny na nosičích z oxidu křemičitého, skla, polymerů, škrobu, celulózy aj. [37], [38], [41], [42]

O separaci v adsorpční chromatografii rozhoduje rozdílná adsorpce látek na povrchu sorbentu tvořícího stacionární fázi. Látky, jež jsou za daných podmínek silněji vázány sorpčními silami, jsou stacionární fází zdržovány déle. Jsou proto charakterizovány vyššími elučními časy či objemy, v plošných technikách potom menšími hodnotami R_F . [33], [38], [41]

Iontově-výměnná chromatografie je založena na různě velkých elektrostatických přitažlivých silách působících mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku. Vazba iontu se stacionární fází (ionexem) roste s jeho nábojem, resp. polaritou a klesá s jeho velikostí. Dělené látky se obvykle u tohoto typu chromatografie pouze nezpomalí, nýbrž jsou zcela zastaveny. Abychom je z kolony uvolnili, musíme změnit charakter elučního činidla. [33], [35], [38], [41]

U gelové chromatografie se složky separují na pórovité stacionární fázi (gelu) podle velikosti. Nejrychleji jsou mobilní fází unášeny složky s největšími částicemi. Gelová chromatografie se používá pro dělení směsí vysokomolekulárních látek (hlavně bílkovin) podle jejich molekulových hmotností. Je nezbytné, aby byl materiál dělicího média ke všem separovaným složkám inertní. [33], [35], [38], [41]

Separace v afinitní chromatografii je založena na specifických interakcích obvykle nevažečné povahy, kdy se jeden z partnerů pevně naváže jako ligand na vhodný nosič a vytvoří spolu s ním stacionární fázi. Druhý z partnerů, jež je obsažen ve vzorku, se za vhodných podmínek na tento ligand naváže a následně se z kolony odstraní vhodným elučním činidlem. [33], [37], [38], [41]

5) podle použité techniky:

- a) eluční
 - izokratická
 - gradientová
- b) vytěšňovací
- c) frontální

Při gradientové eluci dochází během analýzy ke změně složení mobilní fáze. Používá se pro látky s velkými rozdíly v retenčních faktorech ($10 < k < 1$) a mezi její hlavní výhody patří zkrácení doby analýzy a také zvýšení citlivosti detekce později eluujících látek. Gradienty mohou mít různý tvar – lineární, konvexní, konkávní atd., ovšem nejběžnější je gradient lineární, kdy dochází ke kontinuálnímu zvyšování koncentrace silnějšího eluentu B v rozpouštědle A. Gradient je charakterizován počáteční a koncovou koncentrací, tvarem a v případě lineárního gradientu také směrnici. [35], [36], [41], [43]

3.3 Kapalinová chromatografie

Kolonová kapalinová chromatografie se v klasickém provedení (délka kolony až 0,5 m, vnitřní průměr kolem 10 mm, průměr částic stacionární fáze 0,05 – 1 mm) používala až do poloviny šedesátých let. Mobilní fáze se pohybovala gravitací, kdy průtok činil řádově jednotky mililitrů za minutu. Tyto separace byly málo účinné a poměrně dlouhé. Používaly se k oddělení jednoduchých směsí, které se poté analyzovaly jinou metodou, např. spektrofotometricky. [36], [40]

Pro separaci komplikovanějších směsí byla v 70. letech z plynové chromatografie vyvinuta **vysokoučinná kapalinová chromatografie** (High Performance Liquid Chromatography – **HPLC**). Stacionární fázi tvoří film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. O separaci složek vzorku však rozhodují nejen interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně také použitá mobilní fáze, jejímž složením můžeme separaci přímo ovlivnit. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem, a proto bývá tato metoda někdy nazývána jako *vysokotlaká kapalinová chromatografie*. [32], [36], [37], [38]

Dávkovaná množství vzorku do kolony se pohybují v řádech mikrolitrů a k jejich detekci je nutno použít velmi citlivé detektory, jež umožní kontinuální monitorování látek na výstupu

z kolony. Signál z detektoru je pak zpracován počítačem. K separaci lze využít všechny možné mechanismy – adsorpci, rozdělování na základě rozdílné rozpustnosti, iontovou výměnu, molekulově síťový efekt či afinitní chromatografii. Jelikož není nutné převádět vzorek na plyn a můžeme tak pracovat za laboratorní teploty, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separace tepelně nestálých a netěkavých sloučenin (na rozdíl od plynové chromatografie). Ve srovnání s plynovou chromatografií je HPLC také mnohem méně citlivá na teplotu kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze, je však citlivá na její složení a pH. [36], [38]

3.3.1 Stacionární fáze v HPLC

Při použití **náplňových kolon** se běžně používají částice o velikosti 5 – 10 μm , existují však i komerční náplně s velikostí částic 2 μm a menšími. Separace je účinnější tehdy, jestliže jsou částice co nejmenší, mají pravidelný (kulový) tvar, jednotnou velikost a pokud je těmito částicemi kolona homogenně naplněna. I při dokonalém naplnění tvoří stacionární fáze jen asi 75 % objemu kolony a při používání se působením vysokých tlaků znehodnocuje. [33], [36]

Monolitické stacionární fáze zaplňují prostor v koloně kompaktněji. Polymer o definované pórovitosti obsahuje jednak mikropóry (2 μm), jež nám umožní použít vysoké průtoky (až 9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), jednak mezopóry (13 nm), díky kterým má náplň kolony dostatečně velký povrch pro interakci s analyty. Tyto kolony se vyznačují velkou mechanickou stabilitou, jsou odolné vůči změnám pH a zároveň mají vysokou účinnost separace i při velkých průtocích mobilní fáze. V praxi se však stále nejběžněji používají tradiční náplňové kolony. [36]

Nový typ stacionární fáze představují tzv. **vtištěné polymery**, které jsou obdobou monolitických kolon. Do náplně je zabudován „obtisk“ analytu, jež má být oddělen. Používají se především pro obtížné separace, např. k chirální separaci léčiv. [36]

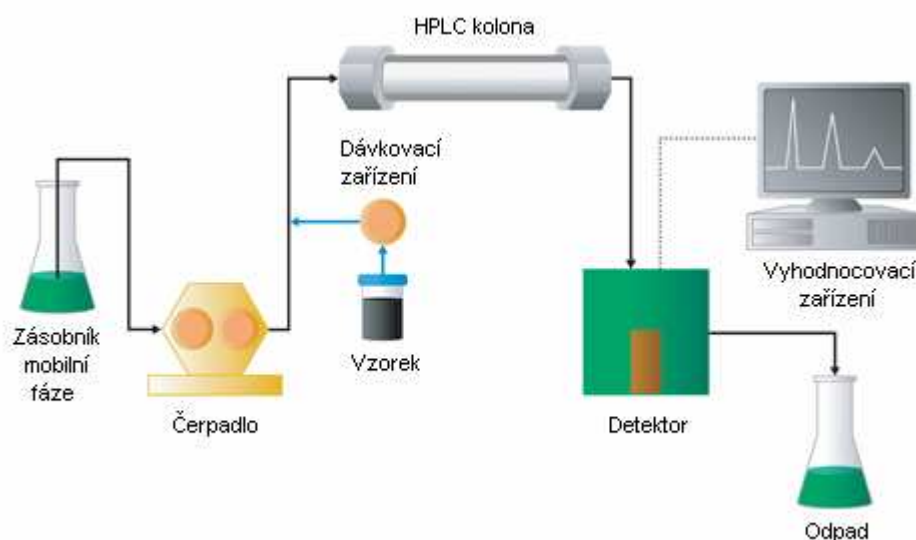
3.3.2 Mobilní fáze v HPLC

Mobilní fáze se v kapalinové chromatografii výrazně podílí na separačním procesu. Může mít různé složení, které lze ovlivnit změnami složení rozpouštědel, pH, iontové síly nebo kupříkladu iontově párovými činidly. Obecně je vždy jednodušší změnit složení této fáze než použít jinou stacionární fázi. [36], [42]

Z hlediska separace i detekce jsou důležité vlastnosti mobilní fáze. V detektoru by měla dávat minimální signál a umožňovat tak co nejcitlivější detekci solutů. Co nejnižší by měla být i viskozita, stlačitelnost, toxicita a hrana absorpce ultrafialového záření. [33], [36]

3.3.3 Instrumentace

Přístroj, na kterém se HPLC analýzy provádějí, se nazývá **kapalinový chromatograf** a je tvořen těmito hlavními částmi: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaké čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovač, kolona, detektor, vyhodnocovací zařízení. [32], [36]



Obr. 6. Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie [44]

Mobilní fáze se přivádí ze zásobníku přes filtr do čerpadla. **Zásobníky mobilní fáze** jsou nejčastěji skleněné nádoby o objemu 0,1 – 2,5 l, opatřené rýskami a uzávěrem z inertního plastu s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky. Mobilní fáze se čerpá přes filtry s velikostí pórů 2 – 20 μm , jež slouží k zachycení případných mechanických nečistot. Mobilní fáze se musí ještě před samotnou analýzou odplynit a to především proto, aby se v detektoru (v důsledku velkého tlakového spádu v systému) netvořily bublinky. K odstranění rozpuštěných plynů se používá podtlak, ultrazvuk či probublávání heliem, případně kombinace těchto metod. [33], [36], [40], [45]

Čerpadla zajišťují konstantní průtok a dostatečný tlak mobilní fáze. Stacionární fáze v HPLC kolonách je tvořena mikročásticemi, které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Aby mohla mobilní fáze přes kolonu projít, jsou nezbytné vysoké vstupní tlaky (až 40 MPa). Průtok mobilní fáze musí být konstantní, bezpulzní a volí se podle typu pou-

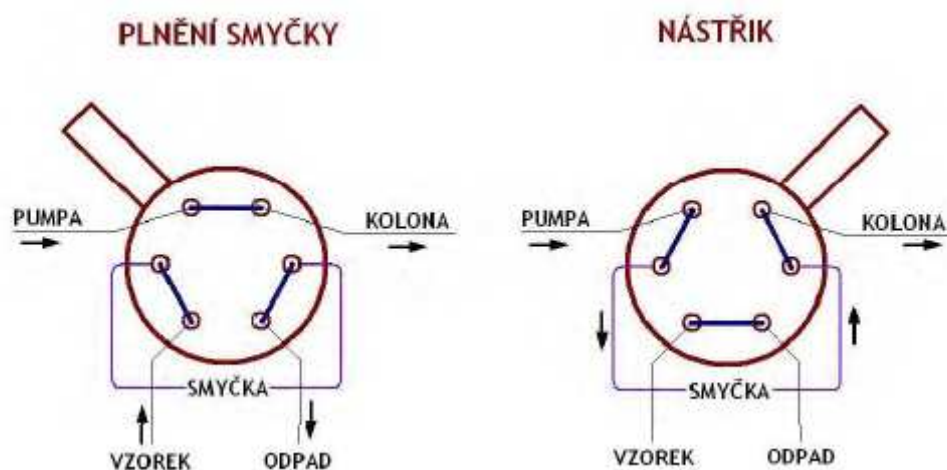
žité kolony. U běžných náplňových kolon se pohybuje okolo 1 ml za minutu. [32], [33], [42], [44]

Do kolony se kapalina čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní ani uvolňovat žádné látky. U běžných analytických kolon se nejčastěji setkáváme s dvoučinnými pístovými čerpadly, jejichž pulzní chod můžeme kompenzovat použitím dvou nebo více čerpadel současně, přičemž se jejich písty nepohybují rovnoměrně, nýbrž s fázovým posunem. [33], [36], [38], [42]

Směšovací zařízení řídí složení mobilních fází, které může být buď konstantní, potom se jedná o izokratickou eluci, nebo se může měnit podle předem daného programu. V tomto případě hovoříme o gradientové eluci. [38]

Pro vstřikování vzorku do systému se téměř výhradně používá **dávkovacích ventilů se smyčkou**. Nejčastěji se jedná o šesticestné ventily s vyměnitelnou smyčkou, do které se vzorek vpravuje injekční stříkačkou. Dávkovaný objem je pak dán velikostí smyčky a pohybuje se od desítek nanolitrů po mililitry. [33], [36], [42]

Do chromatografického systému můžeme vzorek dávkovat buď ručně nebo pomocí automatického dávkovače (autosampleru). V poloze plnění smyčky je vstup mobilní fáze od čerpadla přímo propojen s výstupem na kolonu. V nástřikové poloze prochází mobilní fáze dávkovací smyčkou a vymývá tak vzorek do kolony. [42], [44], [45]



Obr. 7. Dávkovací smyčkový ventil pro HPLC [45]

Kolony jsou obvykle zhotoveny z nerezové oceli, mohou však být také skleněné či plastové. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (5 – 25 cm) o vnitřním průměru okolo 4 – 5 mm. Jsou plněny stacionární fází o velikosti částic 3 – 10 μm (kratší kolony jsou plněny jemnější náplní). Typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči rozhoduje o schopnosti kolony separovat směsi na jednotlivé složky. [38], [39], [43]

Separaci analytů ovlivňuje také teplota kolony. Většina separací probíhá při laboratorní teplotě a termostatování nevyžaduje. U některých separací však zvýšením teploty můžeme separaci výrazně zlepšit, analýza se urychlí, dosáhneme i vyšší účinnosti, ale může být sníženo rozlišení. Kontrolou teploty za použití kolonového termostatu se zlepšuje reprodukovatelnost retenčních časů. [38], [40], [45]

K ochraně hlavní kolony se hojně používá i tzv. **předkolon** umístěných mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo **ochranných kolon**, které jsou zařazeny mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Díky stejnému složení stacionární fáze chrání vlastní analytickou kolonu zachytáváním mechanických nečistot, nerozpustných materiálů a látek, které se mohou na kolonu ireverzibilně vázat. [33], [38], [45]

Z kolony je analyzovaný vzorek veden do **detektoru**, jehož signál je následně vyhodnocen počítačem či jiným vyhodnocovacím zařízením (zapisovač, integrátor). Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram a pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, odpovídá každé složce jeden pík. [32], [36], [44]

3.3.4 Detektory v kapalinové chromatografii

Detektory můžeme definovat jako konstrukční části měřících zařízení, ve kterých jsou fyzikálně-chemické vlastnosti analytu převáděny na měřitelný, zpravidla elektrický signál. Měly by být selektivní pro analyty a zároveň málo citlivé na mobilní fázi. [36], [38], [44]

Signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu (široký lineární dynamický rozsah) a s co nejnižší mezí detekce. Naopak citlivost, kterou můžeme vyjádřit jako směrnici závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu, by měla být co největší. Signál by také neměl obsahovat **drift** (pomalý únik nulové linie) a měl by mít co nejmenší **šum** (suma všech ostatních složek systému vyjma signálu analytu). [36], [42]

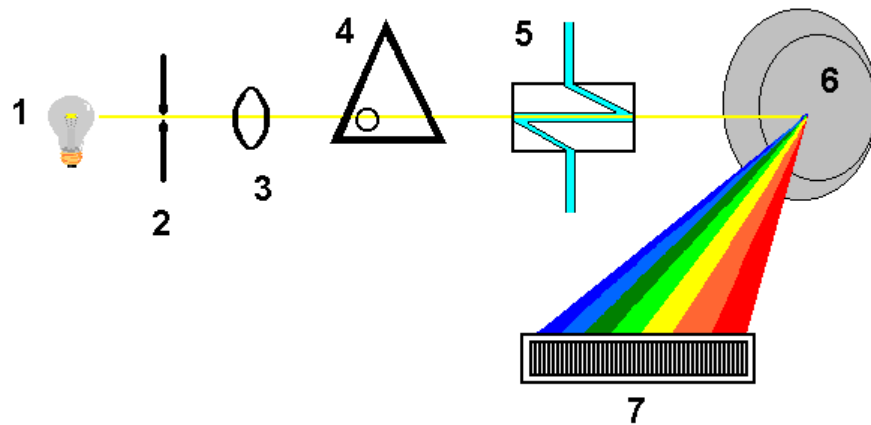
K detekci využíváme analytických vlastností systému, jež jsou ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu. Podle toho můžeme rozlišit detektory univerzální, které měří vlastnost systému jako celku, nebo detektory selektivní. Ty jsou obvykle citlivější a vhodnější zejména při analýzách složitých matic. [36]

Detektorů v kapalinové chromatografii je celá řada. Liší se principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce nebo lineárním dynamický rozsahem. Mezi nejběžněji užívané patří detektory spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, hmotnostní a refraktometrické. [32], [36], [44]

3.3.4.1 Spektrofotometické detektory

Spektrofotometrické detektory patří v kapalinové chromatografii k nejpoužívanějším, jelikož jsou poměrně jednoduché, provozně spolehlivé, lze jimi detegovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí. Princip detekce je založen na měření absorbance eluátu vycházejícího z kolony, proto by měla být absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce co nejnižší. Nejčastěji se používají dvoupraskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou, která musí být dostatečně malá, avšak pro docílení optimální citlivosti detektoru musí být zajištěna také dostatečná absorbanční (optická) dráha kyvety, jíž prochází paprsek. [33], [38], [40], [43]

Jednodušší detektory měří absorbanci při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, ty nejdokonalejší jsou schopny pomocí diodového pole či CCD prvku zaznamenat při průchodu látky kyvetou celá spektra v určené oblasti vlnových délek. Získáme tak trojrozměrné chromatogramy (retenční čas x absorbance x vlnová délka). Tyto detektory mají detekční limit až 10^{-10} g·ml⁻¹ a jejich význam spočívá především při určování homogenity píku. Citlivost detekce při zvolené vlnové délce závisí na velikosti adsorpčního koeficientu dané látky. [33], [36], [42], [43]



Obr. 8. Schéma fotometrického detektoru DAD [46]

Detektory diodového pole jsou schopny snímat celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření pocházející ze zdroje (1) se po průchodu štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a měrnou celou detektoru (5) rozkládá na jednotlivá spektra holografickou mřížkou (6). Na každou z fotodiód (7) pak dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, který je zeslaben absorpcí v cele detektoru. Každá fotodióda je spojena s kondenzátorem předem nabitým na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, jež vzniká po dopadu záření na diódu, pak tento kondenzátor vybije. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud potřebný k jejich opětovnému dobití. Spektrální rozlišení je dáno počtem diód na poli. Tento počet se pohybuje od 512 do 1024 diód. [46]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Účelem této práce bylo sledování změn obsahů vitaminů skupiny B v různých fázích výroby piva. Ke stanovení jejich koncentrací bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a spektrofotometrického detektoru s diodovým polem (DAD).

5 METODIKA

5.1 Použité chemikálie

Standardy:

- Thiamine hydrochloride (Supelco, USA 2003)
- Riboflavin (Supelco, USA 2003)
- Nicotinic acid (Supelco, USA 2005)
- D-pantothenic acid (hemicalcium salt) (Supelco, USA 2003)
- Pyridoxine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Mobilní fáze:

- A: Octan sodný (Lachema N. P., Brno, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina trifluoroctová (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- B: Acetonitril (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Methanol (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Ostatní chemikálie:

- Kyselina mravenčí (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- Síran zinečnatý (Penta, Chrudim, ČR)
- Hexakynoželeznan draselný (Lachema N. P., Brno, ČR)
- Redestilovaná voda (přístroj Aqua Osmotic typ 02, Tišnov, ČR)

5.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

5.2.1 Běžné laboratorní vybavení

Analytické váhy (Adam, AFA - 210 - LC, Schoeller instruments, ČR)

Stolní digitální pH-metr (HANNA pH 211, Fisher Scientific, USA)

Ultrazvuk (PS 04000A, Ultrasonic compact cleaner 4 l, Powersonic)

Odstředivka (Centrifuga Eppendorff, MiniSpin plus)

Lednice (Whirpool, ČR)

Mikrofiltry (LUT Syringe Filters Nylon, 13 mm x 0,45 μ m, Labicom s.r.o., ČR)

Tmavé vzorkovnice, lahve z tmavého skla (Vitrum, ČR)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

5.2.2 HPLC aparatura

Dávkovací stříkačka 50 μ l (Hamilton, USA)

Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)

- Degasser G1322A
- Binární pumpy G1312A
- Termostat kolon G1316A
- Dávkovací analytický smyčkový ventil (20 μ l)
- Kolony:
 - Discovery C 18 (25 cm x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
 - Supelcosil LC 8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
- Detektor UV/VIS DAD G1315A
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation - Instrument 1 (Agilent, USA)

5.3 Optimalizace chromatografické analýzy

K nalezení optimální metody pro stanovení jednotlivých vitaminů skupiny B bylo použito řady postupů lišících se jak délkou kolony, složením mobilních fází, tak i samotnou úpravou vzorku piva.

5.3.1 Zahušťování vzorku piva

V počátečních fázích měření bylo nejprve nutno zjistit, zda se bude muset vzorek pro analýzu zahustit. Jelikož vitaminy jsou látky teplotně dosti nestálé, bylo třeba pracovat za vakuua. Odpařovací baňka se 100 ml odpěněného vzorku byla připojena k vakuové odparce s nastavením 80 otáček za minutu. Prvních 10 minut byl vzorek zahříván na teplotu 40 °C, následně byla tato teplota zvýšena na 70 °C a udržována, dokud nedošlo k odpaření na potřebný objem (cca 20 ml). Po uplynutí této doby (15 – 20 minut) byl vzorek opět ochlazen na 40 °C. Zahuštěný vzorek byl přelit do odměrné baňky objemu 25 ml a doplněn redestilovanou vodou po rysku. K odstranění bílkovin byly použity vodné roztoky Carrezových činidel. Směs byla následně zfiltrována přes filtrační papír a posléze i přes mikrofiltr. Takto upravený vzorek byl dávkován do kapalinového chromatografu.

Jelikož byly signály dosti velké i bez zahuštění, bylo od tohoto kroku později upuštěno.

5.3.2 Délka chromatografické kolony

Při prvních analýzách byla použita kolona Supelcosil LC 8. Ukázalo se ale, že se píky vitaminů objevují příliš brzy a svými retenčními časy se překrývají s ostatními složkami piva. Z tohoto důvodu byla k dalším analýzám použita delší kolona Discovery C 18.

5.3.3 Složení mobilních fází

Jako první byla použita kombinace 0,12 M **octanu sodného** (mobilní fáze A) a **methanolu** (mobilní fáze B) ve vzájemném poměru 87:13. Analýza probíhala izokraticky při průtoku mobilních fází 0,8 ml·min⁻¹ a pH octanu bylo upraveno na hodnotu 4,8.

Kombinace 0,1 M **dihydrogenfosforečnanu draselného** (A) a **methanolu** (B) byla zkoušena v různých variantách. Šlo opět o izokratickou analýzu, experimentovalo se však s průtokem mobilních fází (0,8 a 1 ml·min⁻¹) i s jejich vzájemným poměrem (20:80, 90:10). pH dihydrogenfosforečnanu bylo upravováno nejprve na hodnotu 5,5, později na 6,5-7,0.

Jako další bylo použito kombinace 0,025% vodného roztoku **kyseliny trifluoroctové** (A) s **acetonitrilem** (B). Jednalo se o gradientovou eluci a průtok byl volen $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Tato metodika byla převzata z článku „Stanovení hydrofilních vitaminů v medu pomocí reverzní HPLC“ [47].

U všech těchto metod bylo po nástřiku směsného standardu vitaminů (B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6) pozorováno nedostatečné rozlišení jednotlivých komponent, kdy docházelo k vzájemnému překrývání v retenčních časech. Jako neoptimálnější se zdála být metoda s použitím 0,12 M **octanu sodného** jako mobilní fáze A a **acetonitrilu** jako mobilní fáze B.

Je třeba podotknout, že ani jedna z uvedených metod nevedla k dokonalému rozlišení všech vitaminů. Teoreticky by bylo možno metodu vylepšit použitím kombinace různých kolon a mobilních fází. Hledání další optimalizace je však již nad rámec této práce.

5.4 Konečná metodika

Jak již bylo řečeno dříve, ke konečnému stanovení vitaminů skupiny B v pivu bylo využito mobilních fází octanu sodného (0,12 M) a acetonitrilu. U octanu sodného bylo z důvodu jeho pufracních schopností pH opět upraveno na hodnotu 4,8. Aby nedocházelo ke krystalizaci octanu, byly pumpy omývány isopropanolem. Analýza probíhala při průtoku $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ za použití gradientové eluce.

Tab. 3. Nastavení gradientu při chromatografické analýze

čas [min]	mobilní fáze B [%]
0	13
3	13
15	100
20	100
30	100

Kalibrace i samotné proměření vzorků piva proběhly na koloně Discovery C 18. Teplota termostatu kolony byla nastavena na $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Doba analýzy trvala u standardů 15 minut, u vzorků piva 25 minut. Každý vzorek byl proměřen třikrát. UV detektor s diodovým polem snímal signál při vlnových délkách 220,16; 230,80; 254,16 a 270,16 nm.

5.4.1 Příprava mobilní fáze

Pro přípravu 500 ml 0,12 M octanu sodného bylo na analytických vahách odváženo asi 8,17 g této látky s přesností na 0,0001 g. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a doplněna redestilovanou po rysku. U tohoto roztoku bylo následně pomocí 85% kyseliny mravenčí upraveno pH na hodnotu 4,8.

5.4.2 Kalibrace

K sestavení kalibračních křivek bylo použito standardů vitaminů B₁, B₂ a B₃, ze kterých byl připraven zásobní roztok o koncentraci 20 µg·ml⁻¹. Navážka 0,02 g (s přesností na 0,0001 g) byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna redestilovanou vodou po rysku. Z tohoto zásobního roztoku byly následně připraveny koncentrace 1; 2,5 a 5 µg·ml⁻¹ určené k samotné kalibraci.

Po celou dobu práce se standardy bylo laboratorní sklo obaleno hliníkovou fólií k zamezení fotodegradace vitaminů účinkem UV záření. Kalibrační křivky vitaminu B₅ a B₆ nemohly být při této metodice proměřeny. Důvodem byla příliš vysoká mez detekce.

5.5 Konečná úprava vzorku

Jelikož pivo obsahuje velké množství rozpuštěného oxidu uhličitého, bylo jej potřeba nejdříve odstranit. Pivo bylo tedy přelito do tmavých skleněných zásobních lahví a vloženo na 30 minut do ultrazvuku. Z důvodu termolability některých vitaminů probíhal tento krok za laboratorní teploty.

Po odstranění oxidu uhličitého bylo pomocí 30% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové upraveno pH piva na hodnotu 2,0. Následně bylo odpipetováno 20 ml tohoto vzorku a smícháno s 1 ml Carrezova činidla I a 1 ml Carrezova činidla II z důvodu vysrážení bílkovin. Směs byla pomocí automatické mikropipety převedena do eppendorffek a 10 minut odstředována při rychlosti 14500 otáček za minutu. Supernatant byl opatrně odebrán mikropipetou a zfiltrován přes nylonový mikrofiltr (13 mm x 0,45 µm). Takto upravený vzorek byl injektován do dávkovací smyčky kapalinového chromatografu.

Při hledání optimální úpravy vzorku bylo k vysrážení bílkovin použito rovněž kyseliny trichloroctové. Kýžený efekt se však nedostavil, neboť vzorek zůstal i po aplikaci této látky a následné filtraci zakalen.

5.6 Popis analyzovaného materiálu

Vzorky piva určené k analýze pocházely z restauračního pivovaru Černý orel v Kroměříži. Byly skladovány v tmavých vzorkovnicích při chladírenských teplotách a z lednice byly vyjmuty jen na dobu nezbytně nutnou k jejich úpravě a vlastní analýze. Veškerá manipulace s těmito vzorky byla prováděna buď v tmavém skle, nebo ve skle obaleném hliníkovou fólií pro zamezení rozkladu vitaminů účinkem UV záření.

Pivo je v minipivovaru Černý orel vařeno na soupravě obsahující mladinovou pánev a sezovací kád', následuje vířivá kád', chlazení a otevřená spilka. Na spilce je mladé pivo cca 5 dní, pak je přečerpáno do ležáckých tanků, ve kterých zraje a je uskladněno až do výčepu, případně do sudování. Většina biomasy kvasinek je odstraněna při přečerpání mladého piva (zůstanou na spilce).

Tab. 4. Analyzované vzorky piva

Číslo vzorku	Typ piva	Počet dnů od uvaření
1	11° světlé	2
2	11° světlé	9
3	11° světlé	14
4	11° světlé	18
5	11° světlé	39
6	12° polotmavé	1
7	12° polotmavé	13
8	8° polotmavé	33
9	13° tmavé	28
10	12° bock*	34
11	11° pšeničné	52
12	14° pšeničné	17

* **Bock** (německy kozel) je spodně kvašené pivo původem z Německa vyrobené ze speciální směsi sladů. Je charakteristické vyšším obsahem alkoholu (kolem 6 %) a také dlouhou dobou ležení. Vyrábí se ve všech barevných variantách, nejčastější je však jeho tmavá podoba. Bock patří mezi velmi silná piva s EPM často nad 16 hm. %. [48]

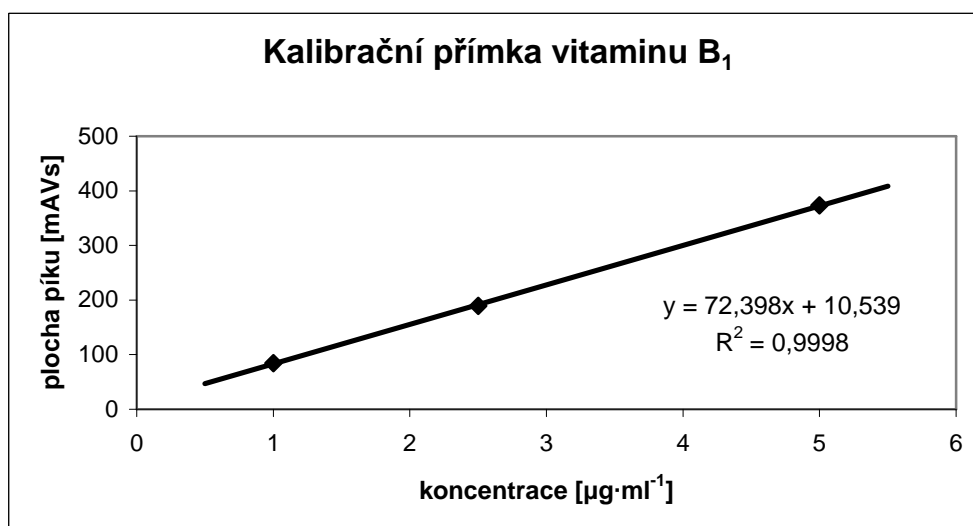
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky měření kalibračních křivek

Při použití mobilních fází octanu sodného a acetonitrilu s průtokem $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byly naměřeny následující retenční časy: pro vitamin B_1 4,53 min, pro B_2 9,48 min a u vitaminu B_3 4,05 min.

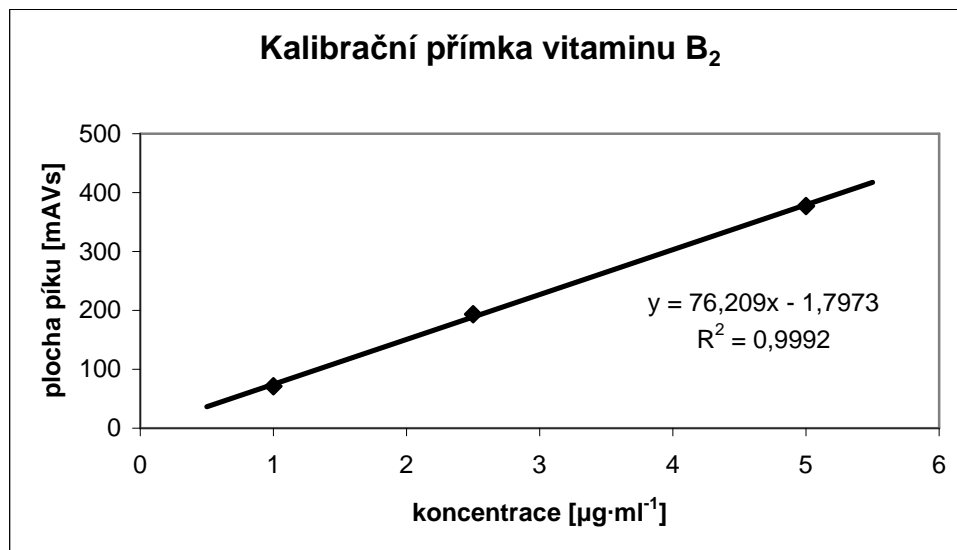
Plochy vitaminů B_1 a B_3 byly odečítány při vlnové délce 254,16, kdy byla jejich odezva v detektoru maximální. Vitamin B_2 vykazoval nejvyšší signály při vlnové délce 270,16 nm.

Kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislosti plochy píků (mAVs) na daných koncentracích ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách v příloze P I a v následujících grafech.

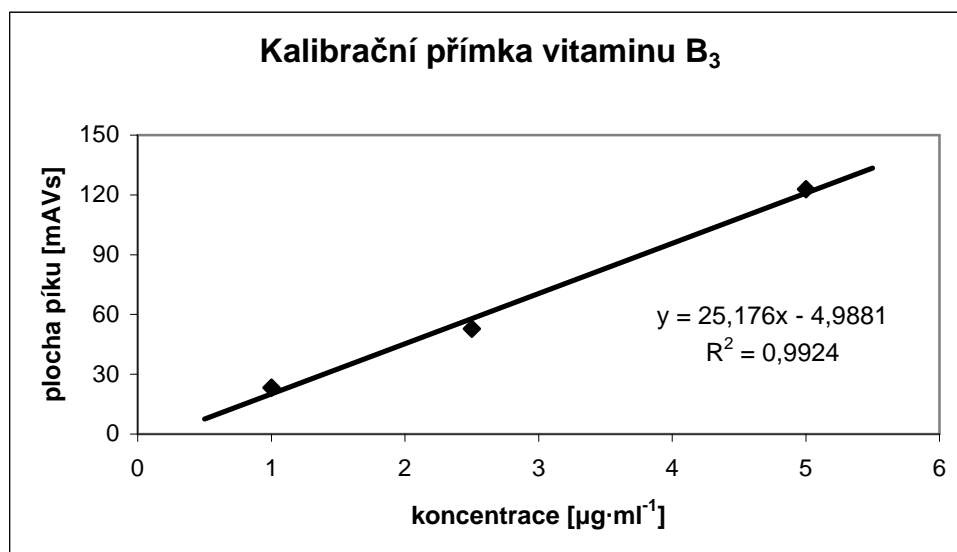


Obr. 9. Graf kalibrační přímky vitaminu B_1

Kalibrační křivka vitaminu B_1 byla sice proměřena, ke stanovení tohoto vitaminu v pivu však nedošlo. Důvodem byl retenční čas společný s dalšími složkami piva, kdy došlo ke složení v jeden obrovský pík a koncentrace thiaminu proto nemohla být určena.



Obr. 10. Graf kalibrační přímky vitamínu B₂



Obr. 11. Graf kalibrační přímky vitamínu B₃

6.2 Výsledky měření jednotlivých vzorků piva

6.2.1 Výpočet koncentrací vitamínu B₂

K výpočtu koncentrací jednotlivých vitaminů byly použity rovnice regrese kalibračních přímků uvedených v kapitole 5.1.

Pro vitamin B₂ se vycházelo z rovnice: $y = 76,209x - 1,7973$

Tab. 5. Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B₂ u 11° světlého piva

Počet dní od uvaření	Plocha píku [mAVs]	Koncentrace vitamínu B ₂ [µg·ml ⁻¹]	Průměrná koncentrace [µg·l ⁻¹]
2	64,3	0,8673	848,1 ± 48,9
	58,6	0,7925	
	65,6	0,8844	
9	35,7	0,4920	483,3 ± 8,0
	34,9	0,4815	
	34,5	0,4763	
14	35,6	0,4907	518,7 ± 53,1
	42,4	0,5799	
	35,2	0,4855	
18	39,7	0,5445	563,3 ± 16,9
	42,2	0,5773	
	41,5	0,5681	
39	34,8	0,4802	488,5 ± 9,3
	35,3	0,4868	
	36,2	0,4986	

Změny obsahů vitaminů v jednotlivých fázích výroby piva nevykazují žádnou posloupnost co do koncentrace. Důvodem může být fakt, že vzorky nebyly odebírány z jedné várky. U vitamínu B₂ je patrný výrazný pokles mezi vzorkem dvoudenním a devítidenním, který mohl být zapříčiněn fotodegradací tohoto vitamínu.

Tab. 6. Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B₂ u ostatních druhů piv

Typ piva	Počet dní od uvaření	Plocha píku [mAVs]	Koncentrace vitamínu B ₂ [µg·ml ⁻¹]	Průměrná koncentrace [µg·l ⁻¹]
12° polotmavé	1	86,6	1,1599	1140,2 ± 34,1
		86,6	1,1599	
		82,1	1,1009	
12° polotmavé	13	44,5	0,6075	625,4 ± 26,6
		48,2	0,6561	
		44,9	0,6128	
8° polotmavé	33	51,8	0,7033	679,2 ± 20,8
		49,1	0,6679	
		49,0	0,6666	
13° tmavé	28	20,2	0,2886	296,5 ± 8,6
		20,7	0,2952	
		21,5	0,3057	
12° bock	34	80,5	1,0799	1049,3 ± 33,8
		78,6	1,0550	
		75,4	1,0130	
11° pšeničné	52	69,5	0,9355	989,8 ± 91,7
		81,7	1,0956	
		69,7	0,9382	
14° pšeničné	17	77,0	1,0340	1060,2 ± 76,9
		74,4	0,9998	
		85,6	1,1468	

U 12° polotmavého piva můžeme opět pozorovat pokles koncentrace vitamínu B₂ v čase. Nejvyšší koncentrace tohoto vitamínu obsahují slady pro výrobu pšeničných a speciálních piv, naopak nejméně zastoupen je u 11° světlého a u 13° tmavého piva.

Podle Basařové a Kosaře se průměrný obsah riboflavinu u 12° světlého ležáku pohybuje v rozmezí 20 – 1000 µg·l⁻¹, což odpovídá také většině proměřených vzorků. Hlúbik pak uvádí, že světlé pivo (3,6 obj.% alkoholu) obsahuje asi 600 µg·l⁻¹ vitamínu B₂ a pivo tmavé o stejném obsahu alkoholu asi 900 µg·l⁻¹ tohoto vitamínu. Zatímco koncentrace vitamínu zjištěná u světlých piv se této hodnotě blíží, u tmavého piva bylo stanoveno výrazně nižší

zastoupení riboflavinu. Je to dáno zřejmě výrobou tmavého sladu, který je značně zkaramelizovaný. Při sušení na hvozdech je vystavován vysokým teplotám a může tak docházet k úbytku vitaminů.

6.2.2 Výpočet koncentrací vitamínu B₃

Rovnice regrese pro vitamin B₃ stanovená z příslušné kalibrační přímky má tvar:

$$y = 25,176x - 4,9881$$

Tab. 7. Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B₃ u 11° světlého piva

Počet dní od uvaření	Plocha píku [mAVs]	Koncentrace vitamínu B ₃ [µg·ml ⁻¹]	Průměrná koncentrace [µg·l ⁻¹]
2	183,6	7,4908	6587,8 ± 797,2
	145,6	5,9814	
	153,4	6,2912	
9	234,1	9,4967	9492,7 ± 69,6
	235,7	9,5602	
	232,2	9,4212	
14	189,3	7,7172	7497,4 ± 191,4
	181,5	7,4074	
	180,5	7,3677	
18	221,5	8,9962	9107,4 ± 199,6
	230,1	9,3378	
	221,3	8,9882	
39	191,5	7,8046	7971,4 ± 445,1
	208,4	8,4759	
	187,2	7,6338	

U vitamínu B₃ dochází mezi vzorkem dvoudenním a devítidenním ke zvýšení plochy píku (a tím i koncentrace vitamínu). Tuto skutečnost můžeme vysvětlit činností pivovarských kvasinek. Jelikož šlo o piva nefiltrovaná, bylo v nich přítomno poměrně hodně kvasničné hmoty.

Tab. 8. Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B₃ u ostatních druhů pív

Typ piva	Počet dní od uvaření	Plocha píku [mAVs]	Koncentrace vitamínu B ₃ [µg·ml ⁻¹]	Průměrná koncentrace [µg·l ⁻¹]
12° polotmavé	1	79,1	3,3400	3386,4 ± 60,8
		82,0	3,4552	
		79,7	3,3638	
12° polotmavé	13	100,5	4,1900	4250,9 ± 52,7
		102,8	4,2814	
		102,8	4,2814	
8° polotmavé	33	135,6	5,5842	5473,0 ± 98,3
		130,9	5,3975	
		131,9	5,4372	
13° tmavé	28	132,6	5,4651	6015,8 ± 483,6
		155,4	6,3707	
		151,4	6,2118	
12° bock	34	203,0	8,2614	8412,3 ± 351,0
		200,5	8,1621	
		216,9	8,8135	
11° pšeničné	52	66,0	2,8197	3048,7 ± 205,5
		76,0	3,2169	
		73,3	3,1096	
14° pšeničné	17	40,9	1,8227	2282,1 ± 443,8
		53,3	2,3152	
		63,2	2,7085	

U 12° polotmavého piva dochází opět činností kvasinek k nárůstu koncentrace vitamínu B₃. Sladovnický ječmen je co do obsahu tohoto vitamínu zřejmě bohatší než slady pšeničné. Nejvyšší hodnoty pak vykazuje speciální německý slad (a pivo z něj vyrobené) bock, který je bohatým zdrojem jak niacinu, tak i riboflavinu.

V literatuře [Basařová, Kosař] je uváděno zastoupení niacinu ve 12° světlém ležáku v rozmezí 3000 – 14000 µg·l⁻¹, průměrně 5000 µg·l⁻¹. Kromě 14° pšeničného piva leží naměřené hodnoty právě v tomto rozmezí.

Hodnoty koncentrací vitaminů v pivu uváděné v odborné literatuře jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 9. Publikované údaje o zastoupení jednotlivých vitaminů v pivu [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]

Literární zdroj	[13]	[10]	[29]*	[22]		[9]	
Druh piva	12° světlý ležák	12° světlý ležák	nespecifikováno	ležák	lehké	mladina	nespecifikováno
B₁	70	3 – 80	30 – 61	84	128	280 – 750 (1550)	2 – 140
B₂	250	20 – 1000	202 – 404	372	424	330 – 900	70 – 1300
B₃	5000	3000 – 14000	6565 – 11110	6452	5552	8000 – 18000	3000 – 20000
B₅	1200	50 – 2000	–	824	508	480 – 980	500 – 2700
B₆	300	100 – 1500	303 – 808	712	480	590 – 1050	130 – 1700

* údaje byly uváděny jako obsah vitaminu ve 100 g vzorku; pro přepočítání bylo uvažováno průměrné hustoty piva $\rho = 1,01 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

ZÁVĚR

Stanovení vitaminů skupiny B v pivu bylo provedeno metodou reverzní kapalinové chromatografie. Ze všech zkoušených metod byla nakonec zvolena kombinace mobilních fází 0,12 M octanu sodného (A) a acetonitrilu (B) s průtokem $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Analýza probíhala gradientově na koloně Discovery C 18 (25 cm x 4,6 mm; 5 μm) a signál byl vyhodnocován detektorem DAD při vlnových délkách 270,16 nm pro riboflavin a 254,16 nm pro thiamin a kyselinu nikotinovou.

Proměřované vzorky pocházely z minipivovaru Černý orel v Kroměříži. Jejich úprava spočívala v odstranění oxidu uhličitého ultrazvukem, úpravě pH na hodnotu 2,0, vysrážení bílkovin Carrezovými činidly, centrifugací a následné mikrofiltrací.

Obsah riboflavinu se u 11° světlého piva pohyboval v rozmezí 480 – 570 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, výjimkou byl pouze vzorek dvoudenní, u něhož byla koncentrace tohoto vitaminu podstatně vyšší (asi 850 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Ostatní druhy piv taktéž vykazovaly vyšší zastoupení riboflavinu než pivo světlé. Nejnižší obsah byl pak zaznamenán u 13° tmavého piva (průměrně 300 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Tento pokles byl nejspíše zapříčiněn vysokou teplotou při hvozdění sladu.

U niacinu (resp. kyseliny nikotinové) byl tento trend opačný. 11° světlé pivo jej obsahovalo 7500 – 9500 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, opět kromě piva dvoudenního. U zbylých vzorků byly hodnoty nižší (2300 – 6000 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Srovnatelný se světlými pivy se v tomto ohledu jeví jen 12° bock, který je podle stanovených výsledků bohatým zdrojem jak niacinu, tak i riboflavinu.

Zjištěné výsledky v podstatě korespondovaly s hodnotami uváděnými v odborné literatuře.

Kyselina pantothenová a pyridoxin nemohli být touto metodou stanoveny, jelikož mez detekce byla příliš vysoká. Koncentrace thiaminu v pivu pak nemohla být proměřena z důvodu shodného retenčního času s ostatními složkami složité pивní matrice.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. 1. vyd. Praha : Grada, 2007. 207 s. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [2] VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor : OSSIS, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [3] KELLNER, V. *Pivo, vitaminy a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka*. [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.beers.cz/dokumenty/7.pdf>>.
- [4] Vyhláška MZe 335/1997 Sb., kterou stanoví požadavky pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líc, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí. + příloha č. 5 [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=69710&ids=158>>.
- [5] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [6] *Tradiční technologie výroby piva*. [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivo/tradpiv.html>>.
- [7] ROP, O.; HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [8] LINKO, M., et al. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*. 1998, Vol. 65, s. 85-98.
- [9] BRIGGS, D. E. *Brewing : science and practice* [online]. Boca Raton : CRC, [cit. 2011-05-12]. 881 s. Dostupné z WWW: <<http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=1249>>. ISBN 978-0-8493-2547-2.
- [10] KOSAŘ, K.; PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby piva a sladu*. 1. vyd. Praha : Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.

- [11] CORTACERO-RAMÍREZ, S., et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003, Vol. 22, Issue 7, s. 440-455.
- [12] ROBINSON, R. K. *Encyclopedia of Food Microbiology : Volumes 1-3* [online]. Elsevier, 2000, [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1870&VerticalID=0>.
- [13] BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství : teorie a praxe výroby piva*. 1. vyd. Praha : Vydavatelství VŠCHT, 2010. 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [14] MAYER JR., O.; ŠIMON, J.; ROSOLOVÁ, H. A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2001, Volume 55, Number 7, [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.nature.com/ejcn/journal/v55/n7/abs/1601191a.html>>.
- [15] ZOUFALÝ, T.; BRYNYCH, P. České pivo - každodenní fenomén. *Chemické Listy* [online]. 2006, 100, [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_08_723-732.pdf>.
- [16] WALKER, G. M. *Yeast - Physiology and Biotechnology* [online]. John Wiley & Sons, 1998 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2902&VerticalID=0>.
- [17] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor : OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-2-9.
- [18] HLÚBIK, P.; OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha : Grada, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [19] MAZINA, J.; GORBATSOVA, J. Sample preparation for CE-DAD analysis of the water soluble vitamins in food products. *Procedia Chemistry*. 2010, Vol. 2, 46-53

- [20] JOULE, J. A.; MILLS, K. *Heterocyclic Chemistry* [online]. 5. ed. John Wiley & Sons, 2010 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=3072&VerticalID=0>.
- [21] FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry* [online]. Springer - Verlag, 1998 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=937&VerticalID=0>.
- [22] JENEY-NAGYMATE, E.; FODOR, P. Examination of the Effect of Vitamin E and C Addition on the Beer's ESR Lag Time Parameter. *Journal Of The Institute Of Brewing* [online]. 2007, Vol. 113, No. 1, s. 28-33 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.scientificsocieties.org/jib/papers/2007/G-2007-0312-494.pdf>>.
- [23] HOZA, I.; BUDINSKÝ, P.; KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie II.* 1. vyd. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. 104 s. ISBN 80-7318-395-1.
- [24] *Chemical Structure of Vitamins and Minerals.* [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.scientificpsychic.com/health/vitamins.html>>.
- [25] BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food chemistry* [online]. 4th rev. and extended ed. Berlin : Springer, [cit. 2011-05-12]. 1070 s. Dostupné z WWW: <http://www.springerlink.com/content/x2l17v/?sortorder=asc&p_o=0>. ISBN 978-3-540-69934-7.
- [26] *Vitamin B₁ (thiamine).* [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.umm.edu/altmed/articles/vitamin-b1-000333.htm>>.
- [27] COMBS, Gerald F. *The vitamins : fundamental aspects in nutrition and health.* 2nd ed. San Diego, California : Academic Press, 1999. 618 s. ISBN 978-0-12-183493-7.
- [28] *Vitamins and Minerals.* [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.html>>.

- [29] SIKORSKA, E., et al. Fluorescence Spectroscopy for Characterization and Differentiation of Beers. *The Institute & Guild of Brewing* [online]. 2004, Vol. 110, No. 4, s. 267-275 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.scientificsocieties.org/jib/papers/2004/G-2004-1213-234.pdf>>.
- [30] VIÑAS, P., et al. Liquid Chromatographic Analysis of Riboflavin Vitamers in Foods Using Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, Vol. 52, s. 1789-1794.
- [31] ANDRÉS-LACUEVA, C.; MATTIVI, F.; TONON, D. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin-adenine dinucleotide in wine and other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1998, Vol. 823, Issues 1-2, s. 355-363.
- [32] *Chromatografie*. [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>.
- [33] WALKER, John M; WILSON, Keith. *Principles and techniques of practical biochemistry*. 5th ed. Cambridge : Cambridge University Press, 2000. 784 s. ISBN 0-521-65873-X.
- [34] COUFAL, P. *High Performance Liquid Chromatography* [online]. 2004 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>
- [35] BIDLINGMEYER, B. A. *Practical HPLC methodology and applications*. New York : Wiley-Interscience, 1992. 452 s. ISBN 0-471-57246-2
- [36] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [37] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006. 286 s. ISBN 978-0-471-72789-7.
- [38] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [39] SÝKORA, D.; FÄHNRIK, J. *Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie*. [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf>.

- [40] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd ed. New Jersey : Wiley, 2009. 912 s. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [41] *Chromatografické metody* [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.lfhk.cuni.cz/chemie/biochemie.html>>.
- [42] ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. *Chemical Analysis : Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2nd ed. Chichester : Wiley, 2007. 574 s. ISBN 978-0-470-85903-2
- [43] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 1997. 765 s. ISBN 0-471-00703-X.
- [44] WATERS. *How Does High Performance Liquid Chromatography Work?* [online]. 2011 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ>.
- [45] CVAČKA, J. *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii* [online]. 2010 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>>.
- [46] *UV/VIS HPLC detektory* [online]. [cit. 2011-05-12]. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html>.
- [47] CIULU, M., et al. RP-HPLC Determination of Water-soluble Vitamins in Honey. *Talanta*. 2011, Vol. 83, s. 924-929.
- [48] KODEDA, M. *Pivovary.info* [online]. 2009 [cit. 2011-05-20]. Bock. Dostupné z WWW: <<http://www.pivovary.info/view.php?cislocclanku=%202009030001>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACP	Acyl Carrier Protein (Protein přenášející acylové skupiny)
DAD	Diode Array Detector (detektor diodového pole)
EPM	Extrakt v původní mladině
FAD	Flavinadeninukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gas Chromatography (Plynová chromatografie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
LC	Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie)
NAD	Nikotinamidadeninukleotid
NADP	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
PC	Paper Chromatography (Papírová chromatografie)
R _F	Retardační (retenční) faktor
TDP	Thiamindifosfát
TLC	Thin Layer Chromatography (Chromatografie na tenké vrstvě)
TTP	Thiamintrifosfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.	Thiamin	38
Obr. 2.	Riboflavin	40
Obr. 3.	Kyselina nikotinová	42
Obr. 4.	Kyselina pantothenová	43
Obr. 5.	Pyridoxin	45
Obr. 6.	Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie	51
Obr. 7.	Dávkovací smyčkový ventil pro HPLC	52
Obr. 8.	Schéma fotometrického detektoru DAD	55
Obr. 9.	Graf kalibrační přímky vitamínu B ₁	64
Obr. 10.	Graf kalibrační přímky vitamínu B ₂	65
Obr. 11.	Graf kalibrační přímky vitamínu B ₃	65

SEZNAM TABULEK

Tab. 1.	Fyzikální a chemické požadavky na jakost piva	13
Tab. 2.	Obsah některých vitaminů skupiny B v ječmeni	15
Tab. 3.	Nastavení gradientu při chromatografické analýze	61
Tab. 4.	Analyzované vzorky piva	63
Tab. 5.	Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B ₂ u 11° světlého piva	66
Tab. 6.	Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B ₂ u ostatních druhů piv	67
Tab. 7.	Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B ₃ u 11° světlého piva	68
Tab. 8.	Naměřené a vypočtené hodnoty pro vitamin B ₃ u ostatních druhů piv	69
Tab. 9.	Publikované údaje o zastoupení jednotlivých vitaminů v pivu [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	70
Tab. 10.	Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační přímky vitaminu B ₁	P I
Tab. 11.	Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační přímky vitaminu B ₂	P I
Tab. 12.	Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační přímky vitaminu B ₃	P I

SEZNAM PŘÍLOH

P I Hodnoty naměřené u standardů vitaminů

PŘÍLOHA P I: HODNOTY NAMĚŘENÉ U STANDARDŮ VITAMINŮ

Tab. 10. Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační přímky vitamínu B₁

Koncentrace standardu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mAVs]	Průměrná plocha [mAVs]
1	80,6	84,33
	92,2	
	80,2	
2,5	189,7	189,30
	179,4	
	198,8	
5	352,5	373,37
	395,3	
	372,3	

Tab. 11. Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační přímky vitamínu B₂

Koncentrace standardu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mAVs]	Průměrná plocha [mAVs]
1	77,7	71,33
	70,9	
	65,4	
2,5	135,4*	193,65
	191,3	
	196,0	
5	310,2*	377,40
	370,7	
	384,1	

* tyto hodnoty byly pro další výpočty zanedbány

Tab. 12. Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační přímky vitamínu B₃

Koncentrace standardu [μg·ml ⁻¹]	Plocha píku [mAVs]	Průměrná plocha [mAVs]
1	24,1	23,37
	22,8	
	23,2	
2,5	44,1	52,87
	55,3	
	59,2	
5	123,2	122,80
	124,1	
	121,1	