



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM VLIVU VARNÍ VODY V TECHNOLOGII PIVA

STUDY OF THE INFLUENCE OF THE BREWING WATER IN THE BEER BREWING TECHNOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Burešová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1210/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lenka Burešová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Studium vlivu varní vody v technologii piva

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše na dané téma
2. Příprava modelových roztoků simulující varní vodu s různým složením
3. Vývoj a optimalizace metod pro stanovení celkového dusíku, organických kyselin, sacharidů a dalších základních chemických složek piva
4. Optimalizace technologie ležáckého piva ze základních surovin
5. Test opakovatelnosti výrobního procesu
6. Vaření piva s různou varní vodou
7. Analýza vzorků
8. Zpracování experimentálních dat

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Lenka Burešová
student(ka)

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá posouzením vlivu pH varní vody na vybrané parametry obsažené v pivu. Konkrétně byl sledován vliv složení vody na EPM, obsah organických kyselin, iso- α -hořkých kyselin a vitaminů skupiny B. Analýza organických kyselin byla provedena pomocí iontové chromatografie s vodivostním detektorem (IC). Kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) byla použita ke stanovení iso- α -hořkých kyselin a vitaminů skupiny B.

V teoretické části práce jsou blíže popsány a charakterizovány suroviny, ze kterých se pivo vyrábí – slad, chmel, voda a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Dále je věnována pozornost jednotlivým fázím v technologii výroby piva. Blíže popsány jsou také použité instrumentální metody.

Experimentální část se věnuje přípravě syntetické vody adicí chemikálií do deionizované vody. Takto vzniklé modely tvrdé a měkké vody byly použity při vaření světlého spodně kvašeného piva. V této kapitole je také podrobně popsán postup vaření piva a použité suroviny. V různých fázích pivovarského procesu byly odebrány vzorky sladiny, mladiny, mladého piva a stabilizovaného piva. Následně byly vzorky upraveny podle použité metody a analyzovány.

Z naměřených výsledků vyplývá, že pH vody ovlivnilo obsah analytů během výroby piva i ve finálním produktu. Tvrdá voda se projevila jako lepší extrakční činidlo a její složení (pH) pozitivně ovlivnilo určité procesy probíhající při vaření piva. Jedním z nich bylo získání sladiny o vyšší hodnotě EPM v porovnání s měkkou vodou. V pivu z tvrdé vody bylo také stanoveno větší množství vitaminů skupiny B. Naopak pH varní vody neovlivnilo isomeraci α -hořkých kyselin při chmelovaru.

KLÍČOVÁ SLOVA

varní voda, EPM, organické kyseliny, vitaminy B, iso- α -hořké kyseliny, HPLC, IC

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on evaluating the influence of brewing water pH on selected beer criteria. We specifically observed how the composition of water affects EPM, volume of organic acids, iso-alpha acids and B vitamins. Organic acids analysis was done with ionic chromatography (IC). Liquid chromatography with DAD detector (HPLC-DAD) was used to measure iso-alpha acids and B vitamins.

The theoretical part of my work describes and characterizes materials which were used during brewing – malt, hop, brewing water and yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. Then it focuses on individual phases of brewing technology. Specific attention was paid to used instrumental methods.

The experimental part is dedicated to synthetic water production by adding chemicals to deionized water. These models of hard and soft water were used for brewing pale bottom fermented beer. The whole procedure of brewing is also thoroughly described in this chapter as well as used raw materials. Samples of worts and beer were taken during different phases of brewing. Then they were modified according to the chosen method and analyzed.

According to the results water pH affects analytes volume during the beer manufacturing and in the final product. Hard water seemed to be a better extraction buffer and its composition (pH) positively affected some of the processes happening during beer production. One of them was obtaining higher EPM compared to soft water. The beer made from hard water also contained more vitamins B. On the contrary brewing water pH did not affect iso-alpha acids.

KEYWORDS

brewing water, EPM, organic acids, B vitamins, iso-alpha acids, HPLC, IC

BUREŠOVÁ, L. Studium vlivu varní vody v technologii piva. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky a za čas, který mi věnoval. Také za psychickou podporu a kreativitu, která mi v těžkých situacích občas chyběla.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1.	Situace pivovarství ve světě a ČR	8
2.1	Suroviny pro výrobu piva.....	9
2.1.1	Slad.....	10
2.1.2	Chmel	11
2.1.2.1	Chemické složení chmelu.....	12
2.1.3	Voda	14
2.1.4	Kvasinky.....	16
2.1.4.1	Svrchní a spodní pivovarské kvasinky	17
2.1.4.2	Ethanolové kvašení	17
2.1.4.3	Vliv složení varní vody na biochemické procesy.....	19
2.1.4.4	Významné metabolity vznikající během fermentace	20
2.1.4.5	Chemické složení buněčného materiálu pivovarských kvasinek	21
2.2	Technologie výroby piva.....	22
2.2.1	Příprava sladiny.....	22
2.2.2	Příprava mladiny	23
2.2.3	Kvašení mladiny a dokvašování piva.....	24
2.2.4	Homebrewing	25
2.3	Analytické metody pro analýzu látek obsažených v pivu	26
2.3.1	Chromatografie.....	26
2.3.2	Kapalinová chromatografie	26
2.3.2.1	Čerpadla	27
2.3.2.2	Zařízení pro dávkování vzorků	27
2.3.2.3	Detektory pro HPLC	27
2.3.2.4	Kolony ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	28
2.3.2.5	Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RPC)	28
2.3.3	Iontově-výměnná chromatografie	29
2.4	Analýza rozptylu (ANOVA)	29
3	CÍLE PRÁCE	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Laboratorní pomůcky a vybavení	31

4.1.1	Seznam chemikálií	31
4.1.2	Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů	32
4.2	Příprava syntetické vody	33
4.2.1	Příprava měkké vody	33
4.2.2	Příprava tvrdé vody	33
4.3	Technologie vaření	34
4.3.1	Rmutování	34
4.3.2	Chmelovar	35
4.3.3	Kvašení a zrání	35
4.4	Instrumentální metody	35
4.4.1	Metoda pro stanovení organických kyselin pomocí IC	36
4.4.2	Metoda pro stanovení vybraných vitaminů skupiny B	37
4.4.3	Metoda pro stanovení iso- α -hořkých kyselin	38
4.5	Statistická analýza dat	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	Vliv varní vody na základní kvantitativní ukazatele piva	40
5.2	Vliv tvrdosti varní vody na obsah organických kyselin v jednotlivých fázích výroby piva	42
5.3	Vliv tvrdosti varní vody na obsah vybraných vitaminů skupiny B v jednotlivých fázích výroby piva	47
5.4	Vliv tvrdosti varní vody na obsah iso- α -hořkých kyselin v jednotlivých fázích výroby piva	51
6	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	57
	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	62
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	63

1 ÚVOD

Pivovarství je spojeno s lidskou činností již od počátku civilizace. Pivo je celosvětově oblíbený alkoholický nápoj, který se připravuje z obilného sladu, vody, chmele a kvasinek. Jeho konzumace ve světě neustále stoupá a čeští konzumenti se řadí mezi největší spotřebitele. České pivovary mají u nás velkou tradici, avšak v dnešní době se i do tohoto odvětví dostala globalizace, takže téměř všechny velké pivovary jsou již součástí nadnárodních společností. V posledních letech zaznamenaly velký boom minipivovary. Ani svou produkcí, ani vybavením se nemohou rovnat větším konkurentům, ale i přesto si našly své místo na trhu prostřednictvím výroby pivních speciálů, které se těší větší a větší oblibě. A možná právě díky tomu se stále více rozvíjí tzv. homebrewing neboli vaření v domácích podmínkách. Domovarnictví je však limitováno dostupností vybavení a přístrojů pro výrobu piva a dostupnými technologiemi. Častým krokem domácího vaření piva je chemická úprava varní vody, neboť různé pivní styly upřednostňují různé složení a pH varní vody.

Technologie pivovarnictví se neustále vyvíjí a vylepšují, a to otevírá možnost zkoumat procesy během vaření piva více do hloubky. Jednou ze studovaných vlastností je i varní voda. Každý pivní styl si žádá jiné složení varní vody. Některé pivovary mají dokonce vlastní zdroje vody. Díky tomu jsou jejich produkty originály, které nelze snadno reprodukovat. Voda má také prokazatelný vliv na chemické a senzorické charakteristiky piva.

V současné době existuje menší množství publikací a článků, které popisují vliv pH a iontové síly varní vody na extrahovatelnost látek a průběh procesů při vaření piva. Jelikož je pivo vysoce komplexní matrice, kvantifikace a identifikace složek piva je pořád problematická, a proto si tato oblast zaslouží další výzkum a vývoj.

Cílem této diplomové práce je posouzení vlivu složení varní vody na vybrané analyty v technologii piva. Pro experimenty byla uvařena piva plzeňského typu z měkké a tvrdé syntetické vody a v průběhu výroby odebrány vzorky sladiny, mladiny, mladého a stabilizovaného piva. Následně byly vzorky podrobeny analýzám. Pro stanovení byly použity dvě separační techniky – HPLC a IC. Posouzení rozdílů mezi měkkou a tvrdou vodou bylo zajištěno statistickou metodou analýzy rozptylu (ANOVA).

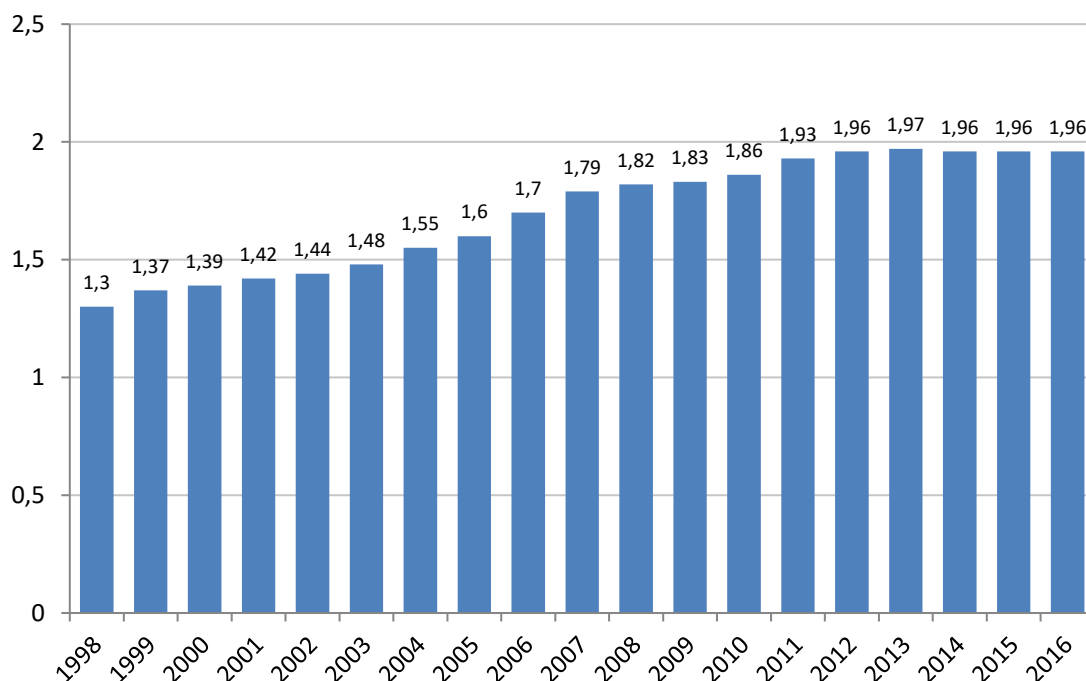
2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této diplomové práce stručně shrnuje informace potřebné k pochopení problematiky možného vlivu varní vody.

2.1. Situace pivovarství ve světě a ČR

Pivo je fermentovaný sycený alkoholický nápoj, připravovaný z ječného nebo pšeničného sladu, vody, chmele a kvasinek [1]. Je to jeden z nejvíce celosvětově oblíbených nápojů a zaujímá páté místo na žebříčku četnosti konzumace ve světě hned za čajem, kávou, mlékem a sodou [2].

Celosvětová produkce piva se v posledních letech drží těsně pod 2 miliardami hektolitřů za rok (viz Obrázek 1). Z Obrázku 2 je patrné, že český roční výstav se na světové produkci podílí spíše zanedbatelně. V roce 2016 se roční produkce vyšplhala na rekordních 20,5 milionů hl. V loňském roce došlo na tuzemském trhu k mírnému poklesu.

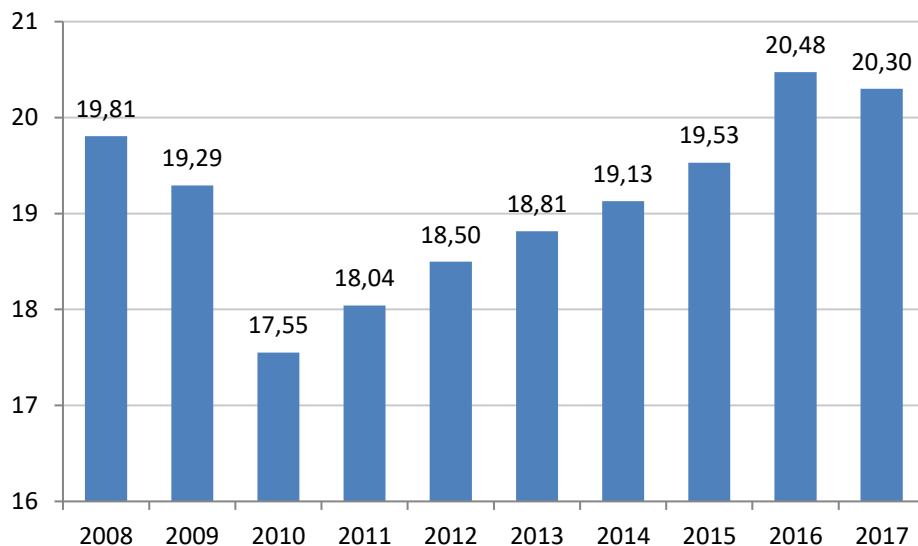


Obrázek 1: Světová produkce piva v miliardách hektolitřů

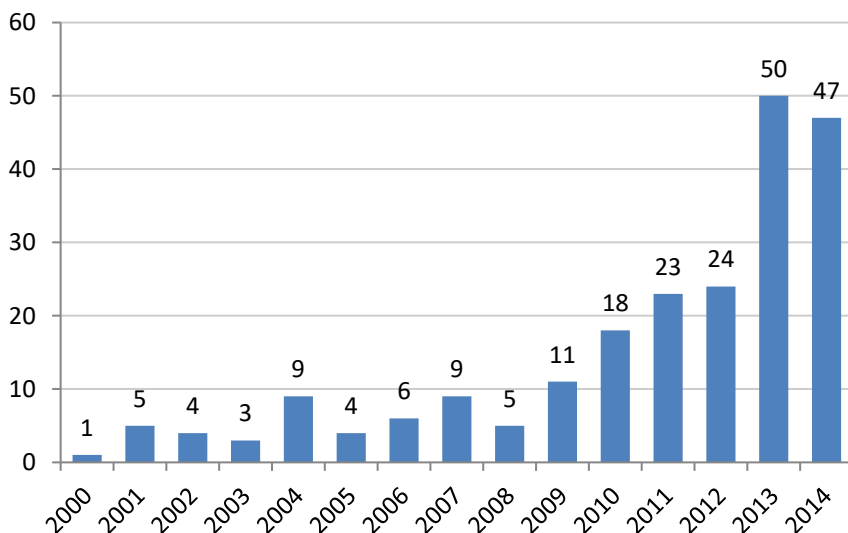
V České republice je trh rozdělen do dvou segmentů. První zaujímají velké pivovary, jejich počet je 45 a na českém výstavu se podílí z 98 %. Velkým hitem posledních let jsou minipivovary, k roku 2016 jejich počet čítal 370 (Obrázek 3). Jedná se o malé pivovary, jejichž roční výroba nepřesahuje 10 tisíc hl. Jejich obliba ve společnosti roste díky velké rozmanitosti pivních stylů, které připravují [3].

Rozmach domácího vaření piva je s boomem minipivovarů spojen. Ačkoli se to může zdát snadné, domovnictví s sebou přináší určité komplikace. Hlavní překážkou domovnictví není dostupnost surovin nebo znalosti, ale paradoxně to bývá legislativa. Zákon o spotřebních daních č. 353/2003 Sb. osvobozuje doma uvařené pivo od spotřební daně, pokud roční produkce nepřesáhne 200 l na domácnost. Dále pivo musí sládek vařit pouze pro svou spotřebu,

popř. pro členy domácnosti a osoby blízké. Pivo nesmí prodávat a zároveň musí výrobu piva oznámit na příslušném celním úřadu spolu s datem a místem zahájení výroby a očekávaným množstvím vyrobeného piva za rok. Dále je nezbytné vést evidenci o vyrobeném pivu, která musí být uschována 10 let [5].



Obrázek 2: Český výstav v milionech hektolitrů



Obrázek 3: Počet nově vzniklých pivovarů v ČR

2.1 Suroviny pro výrobu piva

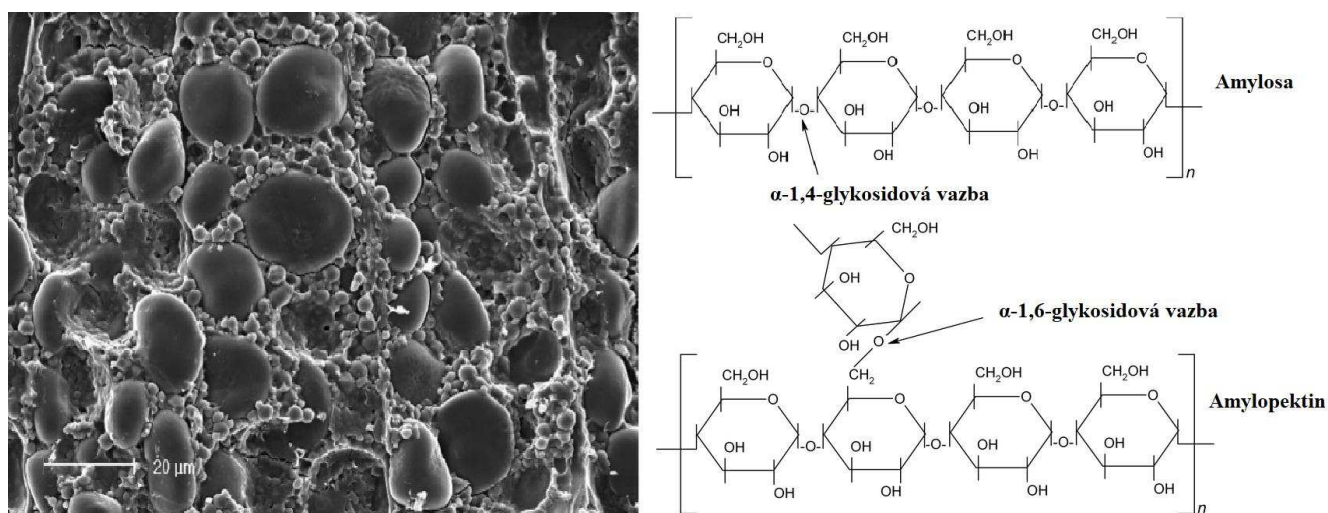
Mezi základní suroviny pro výrobu piva se řadí slad, voda, chmel a kvasinky. V následujících kapitolách budou popsány podrobněji.

2.1.1 Slad

Pro výrobu sladu jsou základními surovinami ječmen dvouřadý *Hordeum distichum* a voda, popř. při výrobě pšeničného piva pšenice. Hlavními produkty jsou světlé, tmavé a speciální slady [4, 5].

Ječné zrnko neboli obilka se skládá z obalových částí, pluch a plušek, zárodku (embrya), z něhož při klíčení vycházejí podněty k aktivaci enzymů v zrně, a z endospermu, který zaujímá největší část obilky [6].

Vlhkost sladu se u světlých sladů pohybuje kolem 3,5 %, u tmavých sladů asi 2 % [5]. Ve sladu jsou nejvíce zastoupeny sacharidy, které tvoří 80 % hmotnosti zrna. Výrazně převažují polysacharidy, škrobové α -glukany a neškrobové β -glukany. Přibližně 10 % hmotnosti ječného zrna tvoří neškrobové polysacharidy jako je celulóza, hemicelulóza, pentosany a lignin. Zvýšený obsah β -glukanů ztěžuje sladařské a následně pivovarské zpracování z důvodu snížené přístupnosti škrobových zrn enzymům, dále dochází ke zvyšování viskozity roztoků a snížení koloidní stability piva [1, 4]. Nejvíce variabilní složkou ze všech živin, jež se nachází v endospermu zrna, je škrob a jeho obsah je v průměru v rozmezí 60–65 % [6]. Škrob ječmene je tvořen dvěma složkami – amylosou a amylopektinem – v ječmeni jsou tyto složky v poměru 22 až 26 % amylosy a 74 až 78 % amylopektinu [7]. Amylosa je tvořena glukosovými jednotkami spojenými α -1,4 glykosidovými vazbami. Takto vzniklé dlouhé řetězce se formují do šroubovice. Amylopektin je složen z glukosových jednotek vázaných vazbami α -1,4, k větvení dochází každých 7 až 8 glukosových jednotek (vazba α -1,6) [5]. Dusíkaté látky jsou v zrně přítomny převážně ve formě rozpustných frakcí albuminů, globulinů, hordeinů a glutelinů. Pro sladařské a pivovarské účely je jejich obsah optimální v rozsahu 10 až 11,5 % [4].



Obrázek 4: Škrobové zrnko pod mikroskopem a struktura amylosy a amylopektinu

Hlavními enzymy, které se vyskytují ve sladu, jsou amylolytické enzymy štěpící škrob, tzv. amylasy [8]. Nejvýznamnějšími je α -amylasa a β -amylasa. α -Amylasy se vytváří v obilovinách během klíčení. Klíček produkuje látku podobnou kyselině gibberelové, která indukuje tvorbu hydrolytického enzymu v aleuronové vrstvě. V nenaklíčeném zrně enzym není přítomen. α -Amylasy štěpí α -1,4 glykosidické vazby uvnitř molekuly. Produkty jsou

dextriny a při delším působení enzymu také maltotriosa, maltosa, isomaltosa a glukosa [9]. Již v nenaklíčeném ječmeni je aktivní β -amylasa a její obsah při sladování stoupá [8]. Enzym štěpí od neredukujícího konce vazby α -1,4, produktem štěpení je maltosa [5].

Ve sladu jsou mimo jiné přítomny i vitaminy. Nejvýznamnější jsou vitaminy skupiny B, které se dostávají i do piva [10]. Vitamin B1 (thiamin) je ve sladu obsažen v rozmezí koncentrací 2–5 μg thiaminu na 1 g sladu. Riboflavinu (vitamin B2) obsahuje slad o něco více. Koncentrace riboflavinu ve sladu kolísá od 4 do 5,5 $\mu\text{g/g}$. Obsah vitaminu B3 (kyselina nikotinová) může být ve sladu 91–127 $\mu\text{g/g}$ [11].

Slad také obsahuje organické kyseliny, které jsou přítomny už v ječmeni. V procesu sladování se však hladina organických kyselin mění. Největší změny jsou patrné během klíčení a sušení sladu. Nejvíce se mění koncentrace kyseliny mléčné při nedostatečném provzdušňování při máčení a klíčení [12].

Organické kyseliny, fosforečnany a další látky ovlivňují pH sladu, a proto je tento parametr důležitým ukazatelem správně provedeného sladování. Hodnota pH sladu je měřena nepřímo, kdy je měřeno pH připravené tzv. kongresní sladiny, do které přechází extrahovatelné látky ze sladu. Hodnota pH kongresní sladiny ze světlých ječných sladů je 5,80–5,95. U sladů tmavých a barvicích je pH nižší (5,50–5,80) kvůli přítomnosti produktů Maillardovy reakce. Příliš nízké pH je způsobeno přítomností velkého množství sirných látek ve sladu a je indikátorem nedostačujícího stupně rmutování [13].

2.1.2 Chmel

Chmel je nenahraditelnou surovinou při výrobě piva, protože tomuto alkoholickému nápoji dává svou typickou hořkost a aroma [5].

Z botanického hlediska bývá chmel zařazován do čeledi rostlin konopovitých [5]. Chmel otáčivý se z morfologického hlediska rozlišuje na tři poddruhy – *Humulus japonicus*, *Humulus yunnanensis* a *Humulus lupulus* [5, 14]. Dnes se výhradně pěstuje chmel evropský kulturní (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus*) a v pivovarnictví se rozlišuje dále na subvariety červeňák nebo zeleňák dle zbarvení chmelové révy. V Evropě, konkrétně v České republice, Německu, Polsku a Slovinsku, se hojně pěstují červeňáky se svou červenou až fialovou barvou způsobenou pigmentací anthokyany. Zeleňáky, které jsou pěstovány v Anglii, USA nebo Austrálii, anthokyany neobsahují [5].

Chmel je vlhkomilná dvoudomá rostlina náročná na světlo. Pro pivovarské účely se pěstují pouze samičí rostliny, zatímco samčí se používají při šlechtění. Hlavními částmi chmelové rostliny jsou kořenová soustava, réva s pazochy, listy a květenství, jenž se v období vegetace přeměňuje v chmelové hlávky. Kořenová soustava je mohutná a dobře vyvinutá, její základ tvoří zdřevnatělá babka, ze které vyrůstají vedlejší oddenky nazývané vlky. Ty je nutné odstranit, aby nevyčerpávaly z půdy rezervní látky. Réva vyrůstá z babky po dobu jednoho vegetačního období a vine se pravotočivě podle vodícího drátku. Na postranních větévkách vyrůstá květenství, z květenství se vyvíjí chmelové hlávky. Skládají se ze stopky, vřeténka, pravých a krycích listenů. Při oplození rostliny obsahují navíc semeno [5, 15].

2.1.2.1 Chemické složení chmelu

Zralé chmelové hlávky obsahují řadu sekundárních metabolitů, pryskyřice, silice a fenolické látky [14].

Tabulka 1: *Průměrné složení sušených chmelových hlávek [14]*

Složka	obsah (% hm.)
α -kyseliny	2–17
β -kyseliny	2–10
Silice	0,5–3
Fenolické látky	3–6
aminokyseliny	0,1
Popel	10
vosky, mastné kyseliny	1–5
celulosa, lignin	40–50
monosacharidy	2
Pektiny	2
Proteiny	15
Voda	8–12

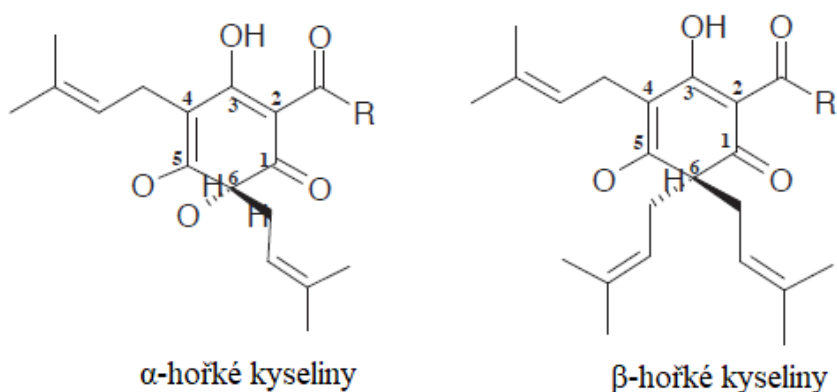
Obsah vody ovlivňuje vlastnosti chmelu během jeho skladování. Příliš vysušené chmelové hlávky s obsahem vody pod 10 % se drolí a dochází u nich ke ztrátám hořkých látek, které jsou důležité při výrobě piva. Naopak zvýšený obsah vody nad 12 % má za následek zvýšené riziko napadení mikroorganismy. Chmel také více podléhá oxidačním a polymeračním změnám [5].

Chmelových silic obsahuje chmel 0,5–3 % hm. Jedná se o směs látek různého chemického složení, fyzikálních vlastností a aroma, jejichž celkové množství a zastoupení jednotlivých složek je závislé na genetických vlastnostech odrůdy, podmínkách pěstování, sklizně i skladování. Chmelové silice udělují pivu charakteristickou vůni [16].

Fenolické látky reprezentují skupinu chemických látek, které jsou charakterizovány přítomností alespoň jednoho benzenového kruhu. Jedná se o taniny, flavonoidy, flavony, flavonoly, flavanonaly, flavanony, flavan-3-oly a proanthokyanidiny. Koncentrace v ležáckých pivech se pohybuje od 50 do 150 mg/l [17, 22]. Z toho až 80 % pochází ze sladu, chmelové polyfenoly se podílejí z 20 až 30 % na celkovém obsahu polyfenolů v pivu v závislosti na dávce a odrůdě použitého chmele [21, 22]. Polyfenoly mají redukční schopnosti, a tím zneumožňují oxidaci chmelových pryskyřic. Dále podporují čiření piva vylučováním kalů reakcemi s dusíkatými látkami v průběhu chlazení mladiny a fermentace a také mají vliv na hořkost piva. Fenolové sloučeniny s nižším stupněm kondenzace a vyšším počtem hydroxylových skupin mají příznivý účinek na redoxní vlastnosti mladiny a piva [22]. Jsou to antioxidanty,

zabraňují tvorbě zákalů nebiologické povahy a oddalují stárnutí chuti stočeného piva [18, 19]. Oxidací a kondenzací ztrácí polyfenolové sloučeniny své pozitivní vlastnosti [5]. Podílejí se na tvorbě zákalů vznikem komplexu flavanolů s proteiny, také přispívají k tmavší barvě a drsné chuti [5, 20].

Chmelové pryskyřice jsou z pivovarského hlediska nejdůležitější složky chmele, tvoří až 30 % hmotnosti suroviny. Jedná se o deriváty floroglucinolu a jejich transformační produkty, které se tvoří při chmelovaru. Jsou zodpovědné za intenzitu a charakter hořkosti piva, stabilizují pивní pěnu a díky antiseptickým účinkům zvyšují biologickou trvanlivost piva. Základními složkami jsou měkké chmelové pryskyřice (α -hořké kyseliny, β -hořké kyseliny), nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice. Obecně se jedná o látky chemicky podobné, nepolárního charakteru a citlivé na oxidaci. Nejdůležitější podíl na celkové hořkosti piva patří transformačním produktům chmelových α -hořkých kyselin, které se při chmelovaru izomerují na příslušné cis- a trans-iso- α -hořké kyseliny [5, 24].



Obrázek 5: Strukturní vzorce pryskyřic chmele [24]

α -Hořké kyseliny jsou slabé kyseliny, ve vodě a vodných roztocích velice obtížně disociují. Jsou tvořeny směsí sedmi známých analogů – humulon (35–70 %), kohumulon (20–55 %), adhumulon (10–15 %), prehumulon (1–10 %) a posthumulon (1–5 %). Jsou chemicky nestálé, a proto snadno podléhají izomeracím, oxidacím a transformacím postranních isoprenoidních řetězců. Izomerací, kdy se mění šestičlenný cyklus na pětičlenný, vznikají iso- α -hořké kyseliny [25]. Během varného procesu se formují iso- α -kyseliny ve dvou prostorových formách, cis- a trans- v poměru 2:1 ve prospěch stabilnější cis-formy. Vlivem působení faktorů ovlivňujících proces stárnutí ubývá rychleji forma trans-, což se projevuje jednak snížením hořkosti piva, jednak tvorbou senzoricky nežádoucích látek [26].

Ve chmelu jsou zastoupeny β -hořké kyseliny ve směsi analogů, z nichž nejvýznamnější jsou kolupulon (20–55 %), lupulon (30–55 %) a adlupulon (5–10 %). Obsah dalších analogů, prelupulon (1–3 %) a postlupulon, je velmi nízký [14, 27]. Jednotlivé analogy se strukturně liší radikálem R na druhém uhlíku aromatického jádra (viz Obrázek 5). Protože β -hořké kyseliny neobsahují terciární alkoholovou skupinu v aromatickém jádru, nemohou na rozdíl od α -hořkých kyselin při chmelovaru izomerovat. Přítomnost dalšího isoprenylového bočního řetězce způsobuje, že molekula jako celek má hydrofobnější charakter. β -Hořké kyseliny jsou proto ve vodě v porovnání s α -hořkými kyselinami mnohem méně rozpustné. Unikátní struk-

tura je na druhé straně zdrojem antimikrobiálních vlastností a schopnosti působit proti celé řadě mikroorganismů. Za nejdůležitější vlastnost β -hořkých kyselin, která určuje jejich chování během zpracování a skladování chmele i v průběhu výroby piva, lze považovat značnou nestabilitu v přítomnosti kyslíku a sklon k oxidačním reakcím. Ve větším rozsahu dochází k oxidačním změnám během dlouhodobého skladování nezpracovaných hlávek [14]. Nejdéle známými oxidačními produkty transformace jsou hulupony, které dosahují 50–75 % hořkosti iso- α -hořkých kyselin [14, 28]. Hulupony vznikají ve chmelu během dlouhodobého skladování a jsou společně s humulinony hlavními produkty přirozeného stárnutí chmele za přístupu vzduchu [14].

2.1.3 Voda

Pivo je složeno asi z 94 % z vody, proto se voda stává esenciální, byť často opomíjenou složkou při výrobě piva [29]. Platí, že voda musí splňovat parametry pro pitnou vodu (Vyhláška č. 83/2014 Sb.), tzn. že musí být zdravotně a hygienicky nezávadná, nesmí obsahovat mikroorganismy, chemické kontaminanty a nesmí zapáchat [30].

V přírodních vodách nejčastěji zastoupenými ionty jsou sodné, draselné, amonné, vápenaté, hořečnaté, manganaté, železnaté, železité a hlinité kationty. Významné anionty jsou chloridy, uhličitany, hydrogenuhličitany, dusitany, dusičnany, sírany, fosforečnany a křemičitany [5, 29]. Neboť se jedná o pitnou vodu, přítomnost toxických kovů je nežádoucí [29].

Ve vodách tvoří zpravidla převažující podíl soli vápníku a hořčíku. Dříve se pro obsah těchto solí užíval termín tvrdost vody [4]. Tento pojem vyjadřuje součet obsahu vápenatých, hořečnatých a barnatých iontů nebo se považuje za obsah všech kationtů s nábojem větším než jedna. Uhličitanová tvrdost vody, někdy také nazývána přechodná, odpovídá obsahu hydrogenuhličitanů vápníku a hořčíku. Během chmelovaru se hydrogenuhličitany alkalických kovů mění odštěpením oxidu uhličitého na více či méně rozpustné uhličitany. Neuhličitanová tvrdost vody (stálá) je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi kyseliny sírové, chlorovodíkové, dusičné, ale i jiných, které se varem nemění [4, 5].

Tabulka 2: Rozdělení vody podle celkové tvrdosti [31]

druh vody	mmol/l	německý stupeň (°D)
měkká voda	< 1,3	< 7
středně tvrdá voda	1,3–2,5	7–14
tvrdá voda	2,5–3,8	14–21,3
velmi tvrdá voda	> 3,8	> 21,3

Dalšími parametry, kterými je posuzována kvalita vody, je pH a iontová síla. Na poměru zastoupení vodíkových a hydroxidových iontů závisí aktuální hodnota pH [5]. Hodnota pH je definována jako záporný dekadický logaritmus hydroxionových kationtů.

$$pH = -\log[H_3O^+] \quad [5]$$

Iontová síla je suma všech elektricky nabitých částic v roztoku, ať už se jedná o anionty nebo kationty [32].

$$I = \mu = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2 = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad [32]$$

Kvůli těmto parametrům se rozlišují různé druhy pivovarských vod na základě typu vyráběného piva. Jedním z nich je voda plzeňská. Z hlediska tvrdosti vody je měkká, má malý podíl anorganických složek a je vhodná pro výrobu silně chmelených spodně kvašených piv. Mnichovská voda je řazena mezi vody střední až tvrdé, obsahuje malé množství chloridů a síranů a naopak vysoké množství uhličitánů a vápníku. Dortmundská voda je velmi tvrdá, zde převažuje neuhličitánová tvrdost vody nad uhličitánovou. U vody vídeňského typu převládá uhličitánová tvrdost vody, pro piva s přechodem mezi světlým a tmavým je velice tvrdá. Pro výrobu vysoce chmelených, svrchně kvašených světlých piv typu Ale se používá voda Burton on Trend. Tato voda vykazuje vysokou tvrdost s vysokým obsahem síranů [5].

Rozpuštěné soli jsou ve vodě zastoupeny sice v nízkých koncentracích, přesto výrazně ovlivňují senzorické vlastnosti piva, enzymatickou aktivitu při rmutování a regulují procesy během vaření, chlazení a kvašení mladiny [29].

Například Vápenaté ionty mohou být ve vodě zastoupeny ve vysokém množství (až 200 mg/l) [5]. Vápník je nezbytný, protože snižuje pH rmutu interakcemi s fosfáty a proteiny sladu. Snižování hodnoty pH je příznivé pro optimální činnost některých sladových enzymů – podporují stabilitu α -amylasy před tepelnou denaturací [5, 29]. Přidávání chloridu nebo uhličitanu vápenatého tlumí přibarvování rmutů, vyluhování barevných látek, polyfenolů a kyseliny křemičité při vyslazování, a tím se snižuje nebezpečí nadměrného přibarvování mladiny [5]. Nižší hodnoty pH snižují rychlost extrakce měkkých chmelových pryskyřic a jejich konverzi na rozpustnější iso formy. Mladina poté vykazuje menší hořkost a obsahuje méně konzervantů. Vápník je též nápomocný při precipitaci nežádoucích sloučenin dusíku během vaření piva (aminokyseliny a proteiny) a zabraňuje nadměrné extrakci dusíkatých látek ze sladu během rmutování [29]. Pozitivní význam má také ve flokulaci kvasnic [5]. Vápník iniciuje srážení oxalátu pocházejícího ze sladu za vzniku pивního kamene (šřavelanu vápenatého) [29]. Se šřavelany tak reaguje za vzniku nebiologických zákalů. Šřavelan vápenatý také způsobuje přepěňování piva, tzv. gushing [5].

Hořečnaté ionty v mladině a pivu z větší části pochází ze sladu, pouze asi třetina je z varní vody. Hořečnaté soli jsou více rozpustné než vápenaté a neovlivňují tolik hodnotu pH. Hořčík stimuluje při fermentaci aktivitu kvasničních enzymů a je kofaktorem pro některé enzymy. Vyšší koncentrace hořečnatých iontů může nepříznivě ovlivnit chuť piva [5].

Alkalické kovy, konkrétně sodné a draselné ionty, se vyskytují ve vodě v nižších koncentracích, do piva se dostávají spíše ze sladu. Sodík má důležitou roli při regulaci transportu draslíku v metabolismu kvasinek. Draslík vykazuje inhibiční účinky na některé sladové enzymy při přípravě mladiny, avšak má pozitivní fyziologický význam v průběhu kvašení. Hydrogenuhličitan a uhličitan sodný nepříznivě zvyšují hodnotu pH rmutů a mladiny, protože vznikající fosforečnany jsou rozpustné a mají alkalickou reakci. Piva po nich mívají drsnou příchut' [5].

Ve vodě jsou také přítomny v různých koncentracích kovy. Například manganaté ionty jsou v nízkých koncentracích důležité pro množení a látkovou výměnu kvasinek. Působí také jako kofaktory enzymů a pozitivně působí na proteolytické rozluštění sladu. Ve vyšších koncentracích však mají negativní účinky na vitalitu kvasinek. Obsah železnatých a železitých iontů je v přírodních vodách nízký. Vysoký obsah železa ve vodě používané při sladování zhoršuje kvalitu sladu. Slad má poté tmavší barvu, při rmutování se zpomaluje proces zcukření a způsobuje přibarvení rmutů, mladiny a pěny piva. Snižuje také plnost chuti a charakter hořkosti piva. Koncentrace nižší než 0,1 mg/l železa příznivě působí na biosyntézu enzymů dýchacího řetězce, ale vyšší koncentrace zvyšují degeneraci kvasinek během fermentace. Železnaté ionty se sice z velké části vyloučí v mlátě a kalech, ale vzhledem k jejich účasti na nebiologických zákalech a negativním sensorickým vlastnostem je nutné jejich obsah ve varní vodě upravovat. Zinečnaté ionty jsou zase důležité při kvašení mladiny. Podporují syntézu proteinů, růst kvasnic, stimulují fermentaci a omezují tvorbu sulfanu. Při vysokých koncentracích jsou však pro kvasinky toxické a zhoršují fyzikálně-chemickou stabilitu piva. Podobný toxický efekt byl pozorován také při vyšších koncentracích měďnatých iontů. Kationty hlinité, cínaté a olovnaté jsou pro kvasinky toxické, negativně ovlivňují fyzikálně-chemickou a sensorickou stabilitu piva. Do něj se dostávají jako rezidua herbicidů, které se používají k ochraně chmelu [5].

Síranové anionty jsou při kvašení zdrojem oxidu siřičitého, který vykazuje antioxidační aktivitu a má pozitivní vliv na koloidní a sensorickou stabilitu piva. Síran vápenatý a hořečnatý zvyšují v reakcích s fosforečnany kyselost rmutů a sladů a konkrétně síran hořečnatý má za následek nepříznivou hořkou chuť piva. Při koncentracích křemičitanu sodného nad 40 mg/l se zpomaluje fermentace a v pivu se tvoří zákal. Vysoké koncentrace tvoří pивní kámen a destabilizuje peptidy v pivu. Fosforečnany zase ovlivňují pH piva. Slad obsahuje v 1 kg 3–7 g fosfátů [5].

Co se týče halogenidů, chloridy mohou inhibovat flokulaci kvasinek. Chlorid sodný do určité míry zvyšuje plnost chuti piva, avšak při vysokých koncentracích způsobuje slanou a drsnou chuť. V koncentracích 400 mg/l a vyšších zpomaluje fermentaci a zhoršuje číření piva. Fluoridy přidávané do pitné vody v pivovarství nemají vliv na průběh kvašení, avšak již od 1 mg/l zvyšují intenzitu barvy piva, a to především v měkkých vodách [5].

Dusitany jsou meziproduktem biochemického rozkladu bílkovin a částečně vznikají při fermentaci redukcí dusičnanů. V pitné a pivovarské vodě je obsah dusitanových aniontů sledován, přípustná koncentrace je 0,1 mg/l, vyšší koncentrace může indikovat znečištění vody mikroorganismy. Zemědělství používající intenzivní hnojení způsobuje zvyšování dusičnanů ve spodních vodách. Samotné dusičnany škodlivé nejsou, ale mohou být redukovány na dusitany, které jsou toxické pro kvasinky. Proto mohou být dusičnany přítomny v pivovarské vodě do 50 mg/l, v některých zemích je hranice snížena až na polovinu [5].

2.1.4 Kvasinky

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří do pododdělení Ascomycotina (houby vřeckovýtrusné) jsou heterotrofní eukaryotní organismy s pevnou buněčnou stěnou [33, 34].

Kvasinky musí být vitální, zdravé a nesmí obsahovat kontaminanty, jako jsou bakterie nebo divoké kmeny kvasinek. Teplota, změny koncentrace kyslíku, vyšší koncentrace ethanolu,

pH, osmotický tlak, dostupnost živin, atd. jsou stresové faktory, se kterými se kvasinky během kvašení mladiny musí vypořádat [33, 35]. Stresové faktory mají vliv na konečnou chuť a kvalitu kvasných produktů [33]. Pro sládky je důležité, aby kvasinky produkovaly nepřetržitě žádaný senzorický profil pro daný druh piva, aby se po ukončení kvašení daly snadno oddělit od média a aby byly skladovatelné po delší dobu do dalšího fermentačního cyklu [35].

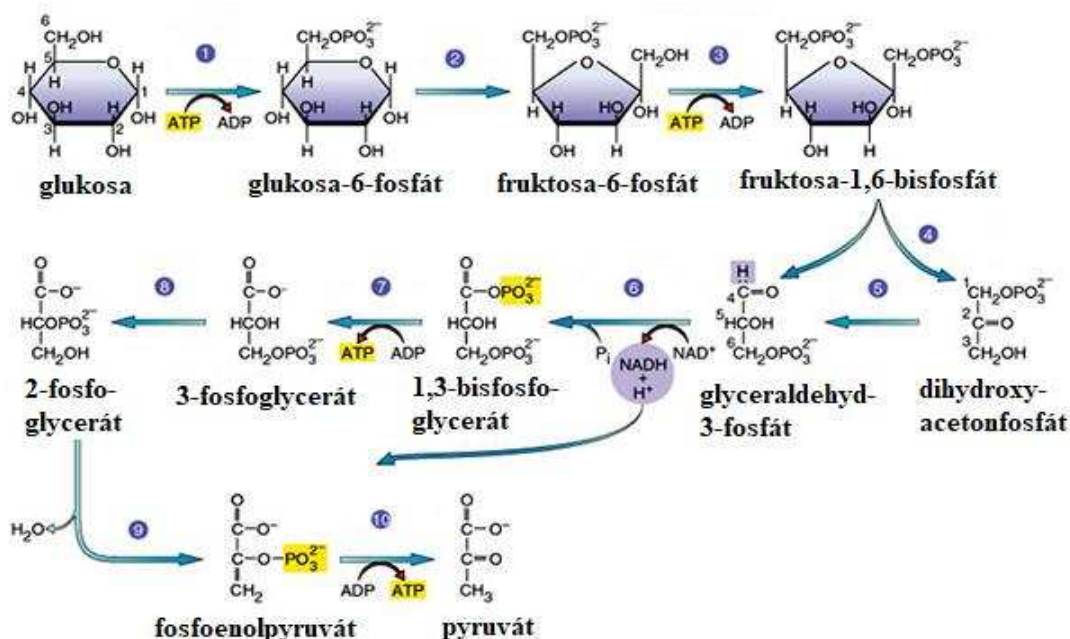
2.1.4.1 Svrchní a spodní pivovarské kvasinky

Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae carlsbergensis* nebo *uvarum* se používají při výrobě piva typu ležáků. Jejich optimální teplotní rozmezí je 7–15 °C, kvasnice sedimentují na dně kvasné nádoby a produkují vyšší koncentrace siřičitanů [33]. Svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se používají při výrobě piv typu Ale a dalších druhů piv s teplotou kvašení 18–22 °C, kdy po prokvašení jsou kvasinky vynášeny na povrch média do kvasničné deky [4, 5].

2.1.4.2 *Ethanolové kvašení*

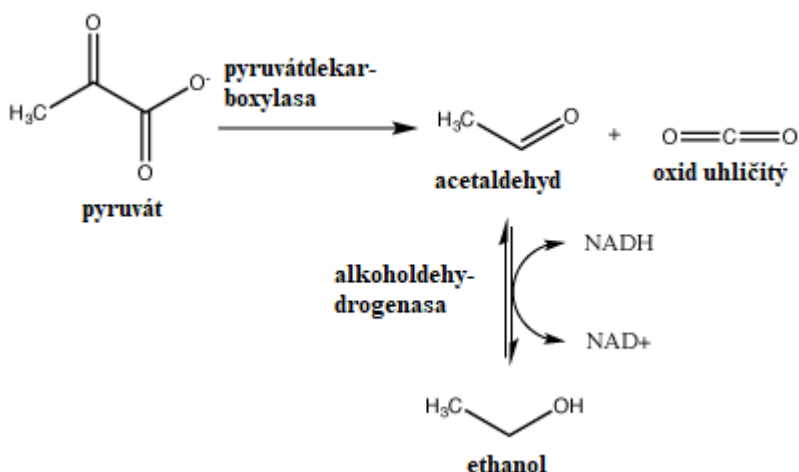
U kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou označovány jako mikroorganismy fakultativně anaerobní, se vyskytují dva různé způsoby využívání sacharidů – energeticky výhodnější aerobní dýchání (respirace) a anaerobní alkoholové kvašení (fermentace). Volba mezi těmito dvěma typy respirace je závislá zejména na dostupnosti kyslíku. U kvasinek se vyskytuje Pasteurův efekt, při kterém dochází ke zpomalení glykolýzy v aerobním prostředí. Veškerý pyruvát vzniklý glykolýzou je využit v Krebsově cyklu, fermentace je tedy potlačena. Tento efekt má odlišný vliv na fermentující kvasinky, mezi které patří i *Saccharomyces cerevisiae*. Pokud kvasinka roste v médiu s dostatkem glukosy a zdroji dusíku, pak se inhibice fermentace v exponenciální fázi růstu kvasinek neprojevuje. *Saccharomyces cerevisiae* využívá v exponenciální fázi aerobní respiraci přibližně z 3–20 %. Avšak při vyčerpání zdrojů dusíku a přechodu buněk do stacionární fáze dochází k potlačení fermentace a využití aerobního dýchání je zvýšeno o 25–100 %. Nedostatek dusíku, a tím způsobený nedostatek amonických iontů pravděpodobně vede k potlačení aktivity enzymu fosfofruktokinasy, který je významným regulátorem procesu glykolýzy [33].

Z Obrázku 6 je patrné, že z 1 molu glukosy se v průběhu glykolýzy vytváří dvě molekuly pyruvátu a 2 molekuly ATP [33]. Za anaerobních podmínek dochází při alkoholovém kvašení k dekarboxylaci pyruvátu enzymem pyruvátdekarboxylasou. Uvolněné elektrony jsou přijímány jinými organickými sloučeninami. Vzniklý acetaldehyd je redukován enzymem alkoholdehydrogenasou na ethanol (viz Obrázek 7). Při výrobě piva jsou kvasinky běžně vystaveny koncentraci ethanolu v rozmezí cca 3–6 % obj., při vaření piva o vysoké stupňovitosti může koncentrace dosahovat až 10 % obj. Nadměrné množství ethanolu způsobuje nežádoucí změny v metabolismu, stavbě buněk a v extrémních případech i buněčnou smrt. Buněčná membrána totiž ztrácí působením ethanolu svou propustnost, fluiditu a integritu [33].



Obrázek 6: Schéma glykolýzy

Uvolněná energie se skladuje ve formě sloučenin s makroergickými vazbami s vysokým obsahem volné energie, tj. energie využitelné. K těmto sloučeninám patří zejména ATP, NAD⁺ a jeho redukováná forma NADH. Část energie z chemických vazeb se odvádí ve formě tepla – z poměrně velkého množství sacharidů se jen malá část převádí na výstavbu buňky. Proto buňka redukuje acetaldehyd na ethanol, čímž získává NAD⁺ potřebný pro oxidaci glukosy [5].



Obrázek 7: Schéma ethanolového kvašení

Kvasinky získávají energii oxidací sacharidů [5]. Přitom preferují jednoduché cukry – glukosu a fruktosu – ty jsou vždy využívány jako první, neboť jsou do buněk transportovány pasivně difuzí a účastní se biosyntetických drah přímo. Na rozdíl maltosa, nejvíce zastoupený sacharid ve sladině, se do buněk dostává mnohem složitějším způsobem. Je k tomu třeba energie a správné genetické vybavení kvasinek. Až po spotřebování glukosy se začne produ-

kovat enzym maltasa, jejímž úkolem je hydrolýza maltosy uvnitř buňky na glukosu, která je dále zpracovávána. Rozklad maltotriosy je ještě komplikovanější. Pokud jsou kvasinky stresované, nemusí dojít k jejímu rozložení a maltotriosa zůstává v mladině. Dextriny jsou velké molekuly, do buněk nevstupují, zůstávají v médiu a tvoří tělo v chuti piva, tzv. chlebovitost [35].

2.1.4.3 Vliv složení varní vody na biochemické procesy

Minerální složení varní vody ovlivňuje činnost kvasinek. V sušině kvasinek je nejvíce zastoupeným majoritním prvkem fosfor, který je přibližně z poloviny vázán v nukleových kyselinách, bílkovinách, lipidech a vitamínech [5].

Nezbytný je pro kvasinky zinek, který působí jako kofaktor mnoha enzymů včetně alkoholdehydrogenasy. Zinek je obsažen ve sladu, po vyslazení se dostává část do sladiny, ale nejvíce ho zůstává v mlátu. Dalšími úkoly zinku jsou stimulace příjmu maltosy a maltotriosy a správná flokulace [13]. Zinek také pomáhá lépe snášet stresové podmínky. Při nedostatku zinku se kvasinky množí velmi málo nebo vůbec, proto se výrazně zpomaluje fermentace. Potřebné množství zinku pro optimální fermentaci se pohybuje v rozmezí 0,48–1,07 ppm [5].

Hořčík je kofaktorem více než 300 enzymů [13]. Je důležitý pro metabolické procesy, účastní se syntézy ATP. Pokud hořčík chybí, kvasinky nemohou růst. Stejně jako zinek chrání hořčík před stresem. Permeabilita membrán je ovlivněna Mg^{2+} ionty, které pozitivně ovlivňují toleranci buněk k ethanolu [33].

Antagonista hořčíku je vápník [33]. Ovlivňuje totiž fyziologii kvasinek potlačením aktivity enzymů závislých na hořčíku. Hlavní role vápníku je flokulace kvasinek po skončeném kvašení. Činí tak vazbami na buněčnou stěnu mikroorganismů [13].

Draslík se účastní osmoregulace, slouží jako kofaktor enzymů zapojených v oxidační fosforylaci, metabolismu proteinů a sacharidů [13].

Dalšími významnými prvky jsou sodík, síra, křemík a z minoritních a stopových prvků to je železo, mangan, měď.

2.1.4.4 Významné metabolity vznikající během fermentace

Alkoholy, estery, acetaldehydy, monoterpenoidy, organické kyseliny, glycerol, vicinální diketony nebo sirné sloučeniny produkované kvasinkami dávají vznik charakteristickým chuťovým a aromatickým profilům, čehož je využíváno při výrobě různých druhů pív [33].

Při kvašení vznikají kromě ethanolu a oxidu uhličitého další významné látky ovlivňující výslednou sensorickou chuť piva. Jedněmi z nich jsou vyšší alkoholy, které vznikají jako vedlejší produkty syntézy nebo katabolismu aminokyselin. Celkové množství vyšších alkoholů kolísá mezi 50–150 mg/l [5]. Převládají n-propanol, isobutanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, 2-phenylethanol a isoamylalkohol [33]. S metabolismem sacharidů je spojena tvorba glycerolu, kterého pivo může obsahovat až 1 g/l. Těkavé fenoly vznikají dekarboxylací fenolových kyselin sladu [5].

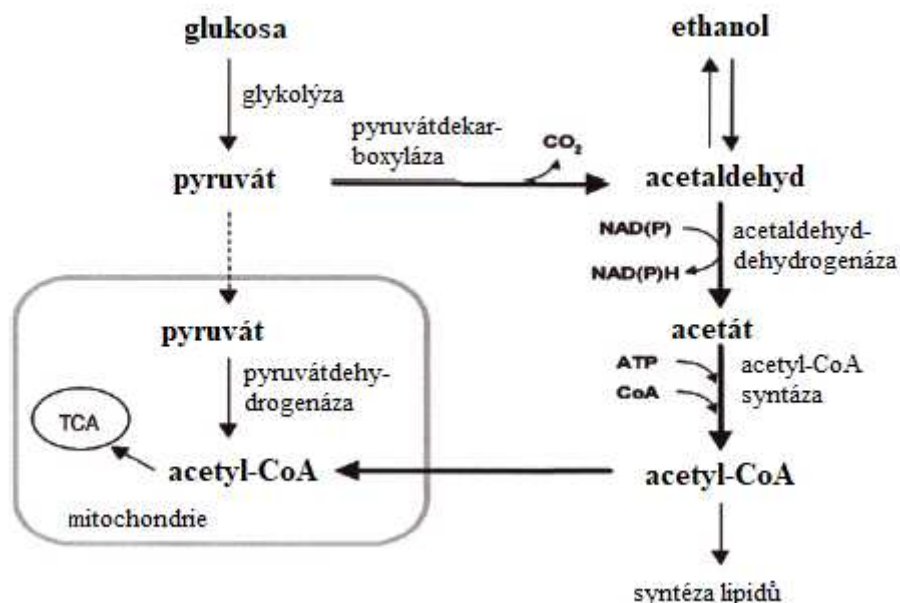
Další skupinou sensoricky významných látek jsou estery. Vznik esterů je spjat s metabolismem lipidů. Kvasinky vytváří dva typy esterů: estery octové kyseliny a estery mastných kyselin s ethanolem (ethylestery). Estery octové kyseliny vznikají pomocí alkoholacetyltransferasy z acetyl-CoA a alkoholu. Nejvyšší produkce esterů je v první fázi kvašení, kdy vznikají

kondenzací organických kyselin a alkoholů [33]. Ty mohou pocházet z meziproduktů přeměny sacharidů a jejich množství vzrůstá s koncentrací původního extraktu, zákalem mladiny a množstvím zkvasitelných cukrů. Celkový obsah esterů se pohybuje mezi 20–100 mg/l. Největší podíl tvoří ethylacetát, dále se v pivu nachází isoamylacetát, isobutylacetát, ethylkapronát a 2-fenylacetát [5].

Karbonylové látky se v pivu vyskytují v množství 10–50 mg/l. Nejvíce je zastoupen acetaldehyd, v nízké koncentraci glyoxal, methylglyoxal, furfural, benzaldehyd a další. Vicinální diketon biacetal je pro kulturní kvasinky extrémně toxický. Při slabé redukční schopnosti kvasinek zůstává biacetal v pivu a dává mu nepříjemnou vůni a chuť po čerstvém másle a medu [5].

Ze sirných sloučenin se nejvíce vyskytují sulfan a oxid siřičitý. Sulfan způsobuje v mladém pivu nepříjemnou vůni a chuť, později se ztrácí vymýváním proudem oxidu uhličitého při dokvašování. Sulfan navíc může reagovat s alkoholy nebo aldehydy za tvorby nežádoucích thiolů (merkaptanů). Oxid siřičitý v pivu pochází téměř výhradně z reakcí, při kterých jsou sírany v mladině redukovány kvasinkami během hlavního kvašení. Dalšími sirnými metabolity jsou dimethylsulfid (DMS) a dimethylsulfoxid (DMSO), thioalkoholy, sulfidy, disulfidy, thioestery a thioaldehydy [5].

Během fermentace se spotřebovávají aminokyseliny a do mladiny se vylučují organické kyseliny, které ovlivňují hodnotu pH piva. Platí, že menší buňky produkují více organických kyselin a spotřebovávají více bazických látek, což ovlivňuje pH. S velikostí buňky roste i produkce esterů kyseliny octové podmíněná zvýšenou aktivitou alkoholacetyltransferasy [36]. Na produkci organických kyselin má i vliv iontová síla varní vody, neboť tyto kyseliny jsou v rovnováze se svými solemi. Působí jako pufrý, a tak udržují pH. Mnoho kvasinek je schopno použít některé karboxylové kyseliny jako zdroje uhlíku pro růst. Také by mohly regulovat intracelulární pH buňky, a tím přispět k rovnováze intracelulárního náboje zvýšením příjmu K^+ iontů [37]. Těkavé kyseliny jsou až z 99 % zastoupeny octovou kyselinou (asi 200 mg/l), dále pak kyselinami propionovou, máselnou a hexanovou. Schéma vzniku kyseliny octové je znázorněno na Obrázku 8. Octová kyselina vzniká oxidací acetaldehydu. Reakce je katalyzována aldehyddehydrogenasou [33]. Zástupci netěkavých kyselin jsou kyseliny mléčná, pyrohroznová, jablečná, citronová a další. Vysoké koncentrace kyseliny mléčné jsou indikátorem mikrobiální kontaminace způsobené bakteriemi mléčného kvašení [5].



Obrázek 8: Schéma vzniku kyseliny octové a její další využití v buňce [13]

2.1.4.5 Chemické složení buněčného materiálu pivovarských kvasinek

Sušina buněk *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje obvykle: dusíkaté látky 45–60 %, cukry 15–37 %, lipidy 2–12 %, minerální látky 6–12 % a dále jsou přítomny některé vitaminy [34].

Voda tvoří hlavní část protoplazmy kvasinek, její obsah je obvykle 65–80 % [33]. Asi tři čtvrtiny z toho tvoří voda intracelulární a asi čtvrtinu voda hydratační a volná, která je vázaná povrchovými silami [5].

Sušina pivovarských kvasinek obsahuje velký podíl polysacharidů, převážně mannan a glukán [34]. Svrchní pivovarské kvasinky obsahují více glykogenu než kvasinky spodní [5].

Důležitou složku buněčných membrán tvoří lipidy. Jedná se o fosfolipidy a mastné kyseliny. Některé lipidy regulují permeabilitu buněčné stěny a ovlivňují transport substrátu do buňky. Steroly se podílí na stavbě buněčných membrán a zajišťují jejich konzistenci a propustnost, podílejí se na transportu aminokyselin, pyrimidinů a na respirační aktivitě kvasinek [5].

Kvasinky obsahují téměř všechny formy dusíkatých látek. Využívají dusík přítomný v mladině za účelem proteosyntézy a metabolismu dalších látek. Hlavní část dusíkatých látek tvoří jednoduché a složené bílkoviny s různými prostetickými skupinami. Většinou jsou v buňce přítomny jako apoenzymy [13, 35].

Vitaminy kvasinka používá jako součást kofaktorů enzymů [13]. Vitamin B2 (riboflavin) se účastní redoxních reakcí v Krebsově cyklu, β -oxidaci, transportu elektronů a dalších biochemických procesech [38]. Riboflavin je ve vodě rozpustný vitamin, který se nachází ve volné formě, ale i fosforylovaný jako FMN a FAD. Tyto biologicky aktivní formy jsou spojeny s enzymovými komplexy, které se podílí na různých metabolických procesech. Poškozené nebo mrtvé buňky mohou vitamin uvolňovat do prostředí, takže může snadno skončit během vaření piva i ve finálním výrobku [10]. Vitamin B2 je citlivý na světlo. Při studiu termostability riboflavinu bylo zjištěno, že v přítomnosti bivalentních kationtů (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ,

Ca^{2+}) a vhodném pH vitamin tvoří stabilní komplexy, které výrazně snižují tepelnou degradaci [39]. Vitamin B3 (niacin) je součástí koenzymů NAD^+ a NADP^+ účastnící se biochemických procesů. Ty mohou přijmout elektrony a redukovat se na NADH a NADPH [40].

2.2 Technologie výroby piva

Výroba piva se skládá z několika základních technologických postupů. Nejprve se připraví sladina z rozemletého sladu a vody. Následně je scezená sladina povařena s přísadkou chmelu a po zchlazení je vzniklá mladina zaočkována inokulem. Kvašení mladiny probíhá v určitém teplotním rozmezí. Následuje dokvašování piva, filtrace, pasterace, stáčení a expedice piva [13].

2.2.1 Příprava sladin

Nejdříve je nutné rozemlít slad ve šrotovnicích na sladový šrot tak, aby došlo k dokonalému vymletí endospermu sladových zrn na vhodné podíly částic a zároveň se zachovala celistvost obalových pluch [4]. Nepoškozené pluchy podmiňují tvorbu filtračního koláče při scezování a vyslazování mláta. Pokud dojde k rozemletí pluch, póry ve filtračním koláči se velmi rychle ucpávají a doba scezování se výrazně prodlužuje [13]. Navíc dochází k uvolnění látek, které zhoršují organoleptické vlastnosti piva. Mletí sladu probíhá za účelem zpřístupnění extraktivních látek sladu a urychlení jejich rozpouštění. Hlavní podíl extraktu sladin, který se uvolňuje ve varném procesu do roztoku, pochází z endospermu sladového zrna. Endosperm obsahuje převážně škrob, dále dusíkaté látky, neškrobové polysacharidy a enzymy. Množství a složení extraktu získaného ve varném procesu z rozemletého sladu závisí na vlastnostech odrůdy ječmene, ze které byl slad připraven, na stupni rozluštění sladu, výsledku mlecího efektu a technologii přípravy sladin [5].

Po rozemletí sladu je sladový šrot smíchán s varnou vodou o teplotě 35–38 °C. Dochází k tzv. vystírání [4]. Převod látek do roztoku při vystírání ovlivní celý další proces výroby piva i jeho kvalitu. Množství rozpuštěných látek závisí na sypání (množství a složení použitých surovin na várku) a na objemu vody v hlavním nálevu [4, 5]. Pro světlá piva se volí větší nálev, aby se získal řidší rmut, protože při rmutování se urychlují enzymové reakce, podporuje se činnost amylolytických enzymů a dochází rychleji ke zcukření sladin. Řidší vystírka dává větší množství „ušlechtilého“ extraktu, světlejší barvu sladin a jemnou chuť piva [5].

Po vystírání následuje rmutování, jehož cílem je převedení optimálního podílu extraktu surovin, především zkvasitelných cukrů, do roztoku působením amylolytických, proteolytických, kyselinotvorných a oxidačně-redukčních sladových enzymů. Pro správnou aktivitu enzymů je důležité dodržovat určité teplotní rozmezí [5]:

- 35–38 °C: Kyselinotvorná teplota. Podporuje rozpouštění látek extraktu a zpřístupňuje působení sladových enzymů.
- 45–50 °C: Peptonizační teplota. Je aktivní enzym štěpící β -glukany. Dochází k proteolýze a štěpení fosforečnanů.
- 60–65 °C: Nižší cukrotvorná teplota. Aktivita amylolytických enzymů, konkrétně β -amylasy. V roztoku se zvyšuje podíl redukujících cukrů.
- 70–75 °C: Vyšší cukrotvorná teplota. Zajišťuje optimální působení termostabilní α -amylasy. Klesá viskozita roztoku, přírůstek redukujících cukrů není již tak výrazný.
- 76–78 °C: Odrmutovací teplota. Inaktivace enzymů [1, 5].

Způsoby rmutování se dělí na dekokční a infuzní. Dekokční způsob rmutování se vyznačuje postupným vyhříváním jednoho až tří podílů rmutu. Po vystírání se část vystírky převede do rmutovací pánve, kde se zahřívá na technologicky důležité teploty (viz výše), poté se vrací zpět do vystírací pánve ke zbylému objemu. Tento postup se označuje jako jednormutový. V případě dvourmutového postupu se tento proces opakuje dvakrát, u třírmutového třikrát. Infuzní způsob zajišťuje rozpuštění a štěpení extraktu sladu s dlouhodobějším účinkem sladových enzymů bez povařování rmutu. Jedná se o zahřívání celého objemu vystírky ve vystírací pánvi, popř. rmutovacím kotli. Tento postup se používá spíše pro výrobu svrchně kvašených piv [4, 5].

Po odrmutování následuje scezování ve scezovací kádi. Jedná se o filtraci, při které se oddělují látky rozpuštěné při rmutování od nerozpustného podílu. Poté následuje vyslazování mláta horkou vodou a získané vodní výluhy, tzv. výstřelky se spojí s předkem a dávají celkový objem sladiny. Cílem scezování je získat čistou sladinu a maximum extraktu [5].

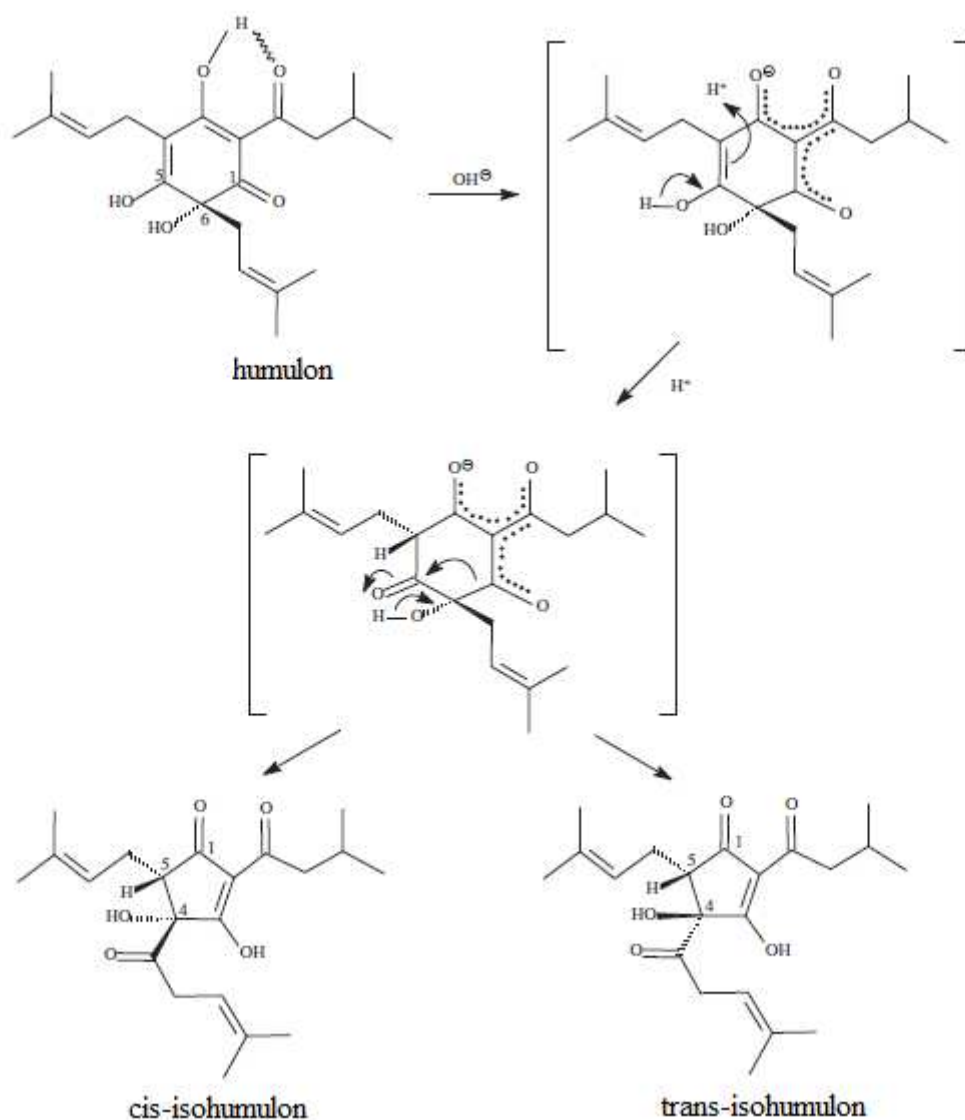
2.2.2 Příprava mladiny

Sladina se následně vaří s chmelem. Cílem chmelovaru je odpařit přebytečnou vodu a docílit tím obsahu extraktu mladiny, která odpovídá typu vyráběného piva, odpařit těkavé látky jako jsou chmelové silice a dimethylsulfid, inaktivovat enzymy, rozpustit a izomerovat hořké látky chmele a rozpustit další složky chmele, především fenolické látky [4, 5]. Varem se též médium strilizuje [13]. Také se snižuje pH mladiny a koagulují bílkoviny. Chmelení se provádí v jedné, dvou nebo třech dávkách chmele. Chmelovar může probíhat za atmosferického tlaku nebo dynamickým varem, kdy se tlak zvyšuje a snižuje. Výsledkem chmelovaru je mladina, která se filtrací odděluje od chmelového mláta. Před zakvašením je nutné mladinu ochladit na zákvasnou teplotu a dostatečně provzdušnit [5].

K charakterizaci hořkosti piva slouží IBU (Mezinárodní jednotka hořkosti). Je to veličina vyjadřující obsah hořkých látek (iso- α -hořké kyseliny, fenolické látky, atd.) v pivu v mg hořkých látek na litr piva [23].

Při chmelovaru se extrahují α -hořké kyseliny a dochází k tepelné konverzi na iso- α -hořké kyseliny. Vznikají dva stereoisomery – trans a cis (Obrázek 9) [41]. Beta kyseliny jsou velmi málo rozpustné ve vodě, což je dáno přítomností hydrofobních postranních řetězců v molekule. Při teplotě 100 °C a pH 5,6 je rozpustnost beta kyselin pouze 8,5 mg/l, přičemž rozpustnost alfa kyselin za stejných podmínek je přibližně 250 mg/l [14].

Značná část hořkých látek je z mladiny vyloučena při whirlpoolu, také během fermentace, zrání a závěrečné filtraci piva. Na izomeraci α -hořkých kyselin má vliv hodnota pH. Platí, že se zvyšujícím se pH (5,0 – 5,6) se zvyšuje stupeň isomerace. Kromě toho přítomnost křemičitanu vápenatého a hořečnatého v mladině rychlost isomerace zvyšuje. Naopak pokles isomerace je spojen s vysokou hustotou mladiny [41].



Obrázek 9: Mechanismus izomerace humulonů na isohumulon [41]

2.2.3 Kvašení mladiny a dokvašování piva

Kvašení neboli fermentace mladiny probíhá ve dvou fázích. V první fázi, která se nazývá hlavní kvašení, dochází k pomnožení pivovarských kvasinek a zkvašení podstatné části využitelných látek z mladiny. Ve druhé fázi fermentace, dokvašování a ležení piva, pomalu dokvašuje zbylý extrakt pod mírným tlakem, pivo se sytí oxidem uhličitým a číří [5].

Pro správný průběh hlavního kvašení je důležité složení mladiny, její koncentrace a stupeň provzdušnění, dále teplotní průběh, doba kvašení a vlastnosti použitého kmene kvasinek. Dále kvašení ovlivňuje druh fermentoru, způsob cirkulace, podmínky tlaku, atd. [5].

Na počátku je důležité, aby mladina byla dostatečně provzdušněna. Kvasinky spotřebovávají kyslík velice rychle. Kyslík je pro kvasinky nezbytný, protože ho potřebují k syntéze lipidů. Při nedostatku kyslíku kvasinky nemohou růst, negativně to ovlivňuje stabilitu piva a senzorické vlastnosti [35].

Podle druhu použitých kmenů kvasinek rozlišujeme kvašení spodní a svrchní. Svrchní hlavní kvašení trvá 2 až 8 dní, teplota by se měla pohybovat mezi 15–22 °C. Doba hlavního kvašení při použití kvasinek spodního kvašení je 7 až 12 dnů při studeném vedení v rozsahu teplot 5–9 °C, při teplém vedení se teplota pohybuje mezi 15–22 °C [4, 5]. Během tohoto období se postupně projeví tato čtyři stádia:

- Při **zapařování** se na hladině mladiny vytváří pěna, která je vyvolaná vznikajícím oxidem uhličitým [4, 5]. Začíná se tvořit od stěn kvasné nádoby během 12 až 24 hodin. Kvasinky se v tuto chvíli nacházejí v lag-fázi. Mírně klesá hodnota extraktu a pH, teplota mírně stoupá [5].
- Po 24 hodinách od zakvašení se tvoří **nízké až vysoké bílé kroužky**. Kvasinky se nachází v exponenciální fázi růstu. Dochází k maximálnímu vývinu oxidu uhličitého, pH klesá až na hodnotu 4,7, hodnota extraktu klesá o 0,8 až 1,2 % a teplota stále stoupá.
- **Vysoké hnědé kroužky** se tvoří třetí až pátý den od zakvašení mladiny. Hnědé zbarvení je způsobeno kaly vynášenými z kvasícího média. Kvasinky jsou ve stacionární fázi růstu. Hodnota pH stále klesá až na 4,4, extrakt klesá o 1,0 až 1,8 % za jeden den, teplota vzrůstá na maximum, na kterém se udržuje přibližně dva dny. V tuto chvíli je nutné začít s chlazením [5].
- **Propadání deky** na hladině média způsobuje aglutinace a sedimentace kvasnic. Tuto tmavou vrstvu pěny je nutné sbírat, protože látky v ní obsažené by negativně ovlivnily senzorické vlastnosti piva. Hodnota extraktu se snižuje pozvolna, kvasinky se na růstové křivce nachází ve zpomalení růstu [5].

Hlavní kvašení probíhá v kvasných nádobách v prostorách zvaných spilka. Pro hlavní kvašení stacionárním způsobem se používají otevřené a uzavřené kvasné nádoby různé konstrukce. Materiál kvasných kádí musí být vůči pivu indifferntní [5].

Dokvašování a zrání piva probíhá v ležáckých nádobách při nízké teplotě, teplota klesá z 5 °C na 2–0 °C. V prvních třech dnech je prokvašování zbylého extraktu nejrychlejší a extrakt klesá asi na polovinu. V dalším období je pokles extraktu již pozvolný. Dále se upravuje chuť a vůně mladého piva a přirozeným čiřením se vylučují vysokomolekulární látky z roztoku. Složení piva se optimalizuje a pivo získává koloidní stabilitu. Při tradiční technologii je obvykle doba dokvašování u výčepních piv 21 dnů, u ležáků je to až 70 dnů [5].

Po dokvašování se pivo dále upravuje, aby se zvýšila jeho kvalita a trvanlivost. Odstraňují se kvasnice, pivo se filtruje nejčastěji přes křemelinové filtry, dále se může odstředovat, pasteuruje se a poté se již stáčí do vhodných obalů [5]. Hodnota pH konečného piva se liší podle pivních stylů a pohybuje se v rozmezí 4,2–4,6. Neobvyklý pokles pH je zapříčiněn bakteriální kontaminací [35].

2.2.4 Homebrewing

Při domácím vaření piva je sládek často limitován z hlediska vybavení pivovaru. A proto převážně z počátku si zjednodušuje práci používáním sladových výtažků nebo mladinových extraktů, které rapidně zkracují proces vaření. Sladové výtažky se vyrábí zahuštěním sladiny na velice viskózní kapalinu. Mladinový extrakt je v podstatě zahuštěná mladina, kterou stačí pouze naředit vodou a zakvasit [5].

Pivovar je také poměrně náročný na prostor. Při výrobě ležáckých piv, které kvasí spodně při nízkých teplotách, je nutné chlazení. Ne každý má však možnost umístit kvasnou nádobu nebo stočené pivo v lahvích do lednice. Proto jsou mezi domovárníky oblíbené pivní speciály, které kvasí při pokojových teplotách a není nutné tak výrazné chlazení jako u piv svrchně kvašených [5].

2.3 Analytické metody pro analýzu látek obsažených v pivu

2.3.1 Chromatografie

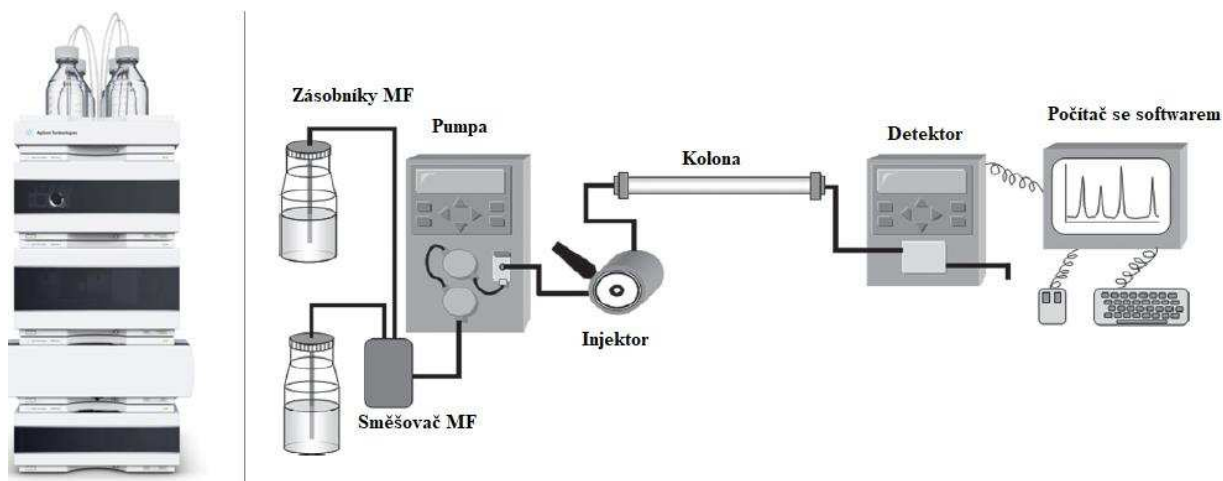
Chromatografie je metoda založená na separaci a identifikaci látek ve směsi [42]. Ve všech chromatografických systémech je jedna fáze nepohyblivá (stacionární) a druhá fáze (mobilní) se vůči stacionární fázi pohybuje spolu se separovanými látkami [43]. Z hlediska charakteru mobilní fáze rozlišujeme plynovou chromatografii (gas chromatography, GC) a kapalinovou chromatografii (liquid chromatography, LC). Jak v plynové, tak i kapalinové chromatografii může být stacionární fáze tuhá nebo kapalná [44].

Zatímco plynová chromatografie je vhodná především pro separaci těkavých, málo či středně polárních a tepelně stabilních látek, kapalinovou chromatografii lze použít i pro separaci látek tepelně nestálých, silně polárních nebo i iontových a vysokomolekulárních přírodních či syntetických polymerů. Kolonová vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) se v současné době používá často vzhledem k dobré reprodukovatelnosti, vysoké citlivosti a rychlosti separace, zejména při použití jemně zrněných částic náplně, vysokých pracovních tlaků a detektorů s průtočnými celami [44].

2.3.2 Kapalinová chromatografie

HPLC je v současné době přední separační technika určená pro chemickou analýzu, separaci a případné purifikaci vzorku [42]. Kapalinová chromatografie umožňuje ovlivňovat separaci jak volbou stacionární, tak i mobilní fáze, která se většinou aktivně účastní interakcí se separovanými látkami a se stacionární fází [44].

Kapalinové chromatografy se skládají z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci jeho složek a jejich následnou detekci, záznam a zpracování signálu. Schéma kapalinového chromatografu je na Obrázku 10. Mobilní fáze ze zásobníku je dávkována vysokotlakým čerpadlem na separační kolonu, která je umístěná v termostatu. Po projití kolonou jsou vzorky zaváděny do detektoru, kde jsou detekovány a zaznamenávány jako závislost odezvy detektoru na čase. Tomuto zápisu se říká chromatogram. K identifikaci látek se používá retenční čas, z výšek nebo ploch píků po kalibraci pomocí standardů látek je určena jejich koncentrace [44].



Obrázek 10: Chromatograf Agilent 1260 Infinity a zjednodušené schéma HPLC

2.3.2.1 Čerpadla

Čerpadla pro HPLC musí být konstruována z materiálů, která vykazují odolnost vůči chemické korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází. Také by měla být schopna dávkovat kapaliny bezpulzním způsobem, tzn. bez kolísání průtoku při pracovních tlacích, a to až do 30–40 MPa s nastavitelnými průtoky pro určitý typ kolon [44].

2.3.2.2 Zařízení pro dávkování vzorků

Vzorky se zavádějí na kolonu kapalinového chromatografu pomocí dávkovacích ventilů se smyčkou naplněnou vzorkem bez přerušení toku mobilní fáze. Přepínání poloh automatických dávkovačů je ovládáno elektricky nebo pneumaticky a plnění smyčky i její dávkování je řízeno počítačem, který se využívá i ke zpracování dat [44].

2.3.2.3 Detektory pro HPLC

Detektory pro HPLC lze rozdělit do dvou skupin: na detektory selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluátu, a na detektory univerzální, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku, tj. separované látky i mobilní fáze [44]. Spektrofotometrické detektory pracují v UV-VIS oblasti elektromagnetického záření. Detekované látky musí absorbovat záření vlnové délky použité k detekci [44].

Vysoce selektivní a specifické jsou fluorimetrické detektory [43]. Detekovaná látka v cele detektoru absorbuje budicí zařízení z UV oblasti, jehož část vyzáří ve formě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce, které se zpravidla měří pod úhlem 90° k záření budicímu. Jako zdroje budicího záření lze použít nízkotlaké rtuťové výbojky s interferenčním filtrem nebo lasery pro dosažení vysoké citlivosti detekce zejména v kapilární kapalinové chromatografii [44].

Univerzálním detektorem, který lze použít při gradientové eluci, je detektor rozptylu světla na tuhých částicích rozptýlených v proudu plynu po předchozím odpaření mobilní fáze (evaporative light-scattering detector, ELSD). K jeho úspěšné funkci je zapotřebí, aby všechny složky mobilní fáze měly dostatečně velkou těkavost oproti separovaným látkám [44].

2.3.2.4 Kolony ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Komerční kolony pro HPLC nejčastěji tvoří rovné bezešvé trubice vyrobené z leštěné nerezové oceli, případně z tvrzeného skla, titanu nebo pevného polymeru opatřeného na koncích fritami, které v koloně zadržují částice náplně. Rozměry kolon se řídí podle účelu použití. K analytickým separacím většinou slouží konvenční kolony o délce 10–25 cm a vnitřním průměru 3–4,6 mm s částicemi o velikosti 3–10 μm . Kratší kolony (o délce cca 3–6 cm) o stejném vnitřním průměru umožňují dosáhnout jednodušších separací za kratší dobu s významnou úsporou rozpouštědel. Separace na mikrokolonách o délce 15–25 cm a vnitřním průměru 1–2 mm umožňují ještě větší úspory mobilní fáze a dovolují vysokou hmotnostní citlivost detekce. Kolony používané pro gelovou chromatografii biopolymerů nebo syntetických polymerů jsou obvykle delší (25–100 cm) a širší (6–10 mm) než analytické kolony. Semipreparativní a preparativní kolony mají vnitřní průměr od 0,6 do 5 cm a pro průmyslové separace se používají spíše kolony s většími průměry [44].

Náplně se připravují jak z pórovitých anorganických materiálů, tak i z organických polymerů. Nejčastěji se používají materiály na bázi silikagelu, buď bez úprav, nebo jako nosiče, chemicky modifikovaného navázáním nepolárních nebo polárních stacionárních fází. Materiály na bázi silikagelu jsou méně stabilní v mobilních fázích o pH větší než 8,5. Proto se kromě silikagelu používají i jiné anorganické nosiče – oxid hlinitý, zirkoničitý, titaničitý nebo grafitický uhlík, které jsou chemicky odolnější a usnadňují tím separace bazických sloučenin, které většinou vyžadují mobilní fáze s vysokým pH (12–14). Pórovitost materiálů závisí na velikosti molekul separovaných látek [44].

2.3.2.5 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RPC)

Tento chromatografický mód se v současné době HPLC používá nejčastěji, protože zpravidla umožňuje úspěšné separace velmi pestré škály vzorků, obsahujících nepolární, středně nebo silně polární a někdy i iontové či ionizovatelné látky. Princip separace využívá polárních a disperzních interakcí mezi analyzovanými látkami, mobilní a stacionární fází. Stacionární fáze jsou nepolární či mírně polární – většinou chemicky modifikovaný silikagel s vázanými oktadecylovými, oktylovými či jinými alkylovými či alkylarylovými, ale i nitrilovými skupinami. Méně často se používá chemicky modifikovaný oxid zirkoničitý či titaničitý, anorganické nosiče potažené vrstvou nepolárních polymerů, částice zesíťovaných lipofilních organických polymerů či speciálně připraveného pórovitého grafitického uhlíku s dostatečnou mechanickou stabilitou, dobře definovanou a stabilní strukturou pórů [44].

Mobilní fáze jsou vždy polárnější než fáze stacionární a skládají se většinou z vody a jednoho či více polárních rozpouštědel rozpustných ve vodě, nejčastěji se jedná o methanol, acetonitril nebo THF. Charakter organického rozpouštědla a v menší míře i typ chemicky vázané nepolární stacionární fáze ovlivňují velikost retence i selektivitu separace [44].

Systémy s obrácenými fázemi jsou nejvhodnější pro separace látek, které se liší velikostí hydrofobních částí molekul, případně počtem a charakterem polárních funkčních skupin. Jsou tedy velmi vhodné pro separace členů homologických nebo oligomerních řad, pro separace isomerů však vykazují menší selektivitu než systémy s normálními fázemi [44].

2.3.3 Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie využívá jako stacionární fázi měniče iontů – ionexy. Jedná se o makromolekulární matrici nesoucí vhodné funkční skupiny, na které je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Tento protiion je vyměňován iontem stejného znaménka náboje obsaženým v kapalně fázi. Mezi ionty opačného náboje se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly [43].

Mobilní fáze musí obsahovat vhodné protiionty, které se separovanými ionty soutěží o interakce s opačně nabitými funkčními skupinami ionexů. Retence iontových látek klesá s rostoucí koncentrací protiiontů v mobilní fázi. K vodným mobilním fázím se často přidává organické rozpouštědlo a obvykle se pracuje při zvýšené teplotě, díky tomu se retence snižuje a mění se také selektivita separace organických iontových látek [45].

Ionexy, jejichž funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů, se nazývají anexy. Katexy mají funkční skupiny kyselé a slouží k výměně kationtů. Silné ionexy jsou ionizovány v celé oblasti pH, slabé katexy pouze v alkalické a slabé anexy pouze v kyselé oblasti pH [43, 45].

K detekci se obvykle používají detektory vodivostní. Avšak vzhledem k vysoce vodivému elučnímu činidlu by citlivost detektoru na ionty vzorku byla snížena. Proto se před detektor zařazuje supresor, který potlačuje jejich účinek [43].

2.4 Analýza rozptylu (ANOVA)

Analýza rozptylu (Analysis of variance) je statistická metoda, která slouží k posouzení rozdílů mezi více skupinami analyzovaných dat. Součástí je ověření vlivu náhodných faktorů na rozptyl dat. Základním úkolem této analýzy je posouzení účinků jednotlivých faktorů (kategorických nezávislých proměnných) na závisle proměnnou kvantitativního typu. Cílem analýzy rozptylu dat je zjištění, zda naměřené koncentrace analytů vykazují statisticky významný rozdíl mezi skupinami (měkkou a tvrdou vodou). Pro tento účel je vhodné použití jednofaktorové analýzy rozptylu, kdy je u každé skupiny testován jeden parametr, a to koncentrace určitého analytu. Úkolem je zjistit, zda jsou rozdíly mezi skupinami způsobeny koncentrací daného analytu, nebo náhodnými chybami. Proto se volí nulová hypotéza H_0 , která říká, že mezi skupinami rozdíl neexistuje. Pokud je tato hypotéza zamítnuta, znamená to, že daný parametr na rozdělení vzorků do skupin vliv má [46, 47].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo posouzení vlivu pH varní vody na vybrané parametry obsažené v pivu, konkrétně na stupňovitost piva a obsah organických kyselin, vitaminů B a iso- α -hořkých kyselin.

K analýzám byly použity vzorky pív, jež byly uvařeny v domácích podmínkách ze syntetické vody. Ke zhodnocení vlivu měkké a tvrdé vody byly použity metody kapalinové chromatografie s DAD detektorem a iontové chromatografie s vodivostním detektorem. K posouzení statisticky významných rozdílů byla použita analýza rozptylu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Laboratorní pomůcky a vybavení

4.1.1 Seznam chemikálií

Tabulka 3: *Standardy a ostatní chemikálie použité při stanovení organických kyselin*

Název	Mr (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Kyselina octová	60,05	1000 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	64-19-7
Kyselina mléčná	90,08	1000 ± 4 mg/l	FLUKA Analytical	Švýcarsko	50-21-5
Kyselina chloristá	100,46	99,9 %	SIGMA ALDRICH	Německo	7601-90-3

Tabulka 4: *Standardy a ostatní chemikálie použité při stanovení vitaminů B*

Název	Mr (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Riboflavin	376,36	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	USA	83-88-5
Niacin	123,11	≥ 99,5 %	SIGMA ALDRICH	Švýcarsko	59-67-6
Pyridoxin hydrochlorid	169,18	≥ 98 %	SIGMA ALDRICH	Německo	58-56-0
Kyanokobalamin	1 355,37	≥ 99,2 %	SIGMA ALDRICH	USA	68-19-9
Mravenčan amonný	63,06	≥ 99 %	SIGMA ALDRICH	USA	540-69-2
Acetonitril	41,05	99,9 %	SIGMA ALDRICH	Německo	75-05-8
Kyselina mravenčí	46,03	85 %	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	64-18-6/1

Tabulka 5: *Standard a ostatní chemikálie použité při stanovení iso-α-hořkých kyselin*

Název	Mr (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
ICS-I4	–	65,2 %	Labor Veritas	Švýcarsko	–
Kyselina fosforečná	98,00	85 %	SIGMA ALDRICH	Německo	7664-38-2
Na ₂ EDTA	372,24	99 %	SIGMA ALDRICH	Francie	6381-92-6
Methanol	32,04	≥ 99,9 %	SIGMA ALDRICH	Německo	67-56-1
Acetonitril	41,05	99,9%	SIGMA ALDRICH	Německo	75-05-8

Tabulka 6: *Chemikálie použité při přípravě syntetické vody*

Název	Mr (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Hexahydrát chloridu hořečnatého	203,3	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	7791-18-6
Hexahydrát chloridu vápenatého	219,08	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	7774-34-7
Tetrahydrát dusičnanu vápenatého	236,15	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	13477-34-4
Uhličitan vápenatý	100,09	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	471-34-1
Síran sodný	142,04	p.a.	Lachema	Česká republika	7757-82-6
Hydrogenuhlíčan draselný	100,12	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	298-14-6
Hydrogenuhlíčan sodný	84,01	p.a.	Lachema	Česká republika	144-55-8
Dihydrogenfosforečnan draselný	136,09	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	7778-77-0
Heptahydrát síranu hořečnatého	246,47	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	10034-99-8

4.1.2 Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů

- Automatické pipety, špičky
- Pasteurovy pipety
- Centrifugační zkumavky (50 ml)
- Plastové zkumavky (10 ml)
- Skleněné vialky, uzávěry se septem
- Mikrofiltry nylonové (průměr 0,45 µm)
- Injekční stříkačky (plastové, 5 ml)
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, nálevky,...)
- Šrotovník na slad (dvouválcový)
- Hrnc s termostatem Bielmeyer (27 l)
- Svezovací hrnc Bielmeyer (30 l)
- Nerezová chladicí smyčka
- Skleněné litrové láhve s uzávěrem
- Zařízení na stáčení piva
- Kvasné nádoby s kvasnými zátkami (8,5 l)
- Vortex
- HPLC Agilent 1260 Infinity
- IC 850 Professional
- Ultrasonic Compact cleaner PS03000A 2,5 l (PowerSonic s r.o.)
- Centrifuga Z 36 HK (HERMLE Labortechnik GmbH)
- Analytické váhy Kern AES 200-4C
- Refraktometr
- pH metr

4.2 Příprava syntetické vody

Pro vaření piva byla připravena syntetická voda adicí chemikálií do destilované vody. Takto byl vytvořen model měkké a tvrdé vody [48].

4.2.1 Příprava měkké vody

Měkká voda byla připravena ze tří zásobních roztoků – S1, S2 a S3. Zásobní roztoky byly připraveny v odměrných baňkách, do kterých byly převedeny navážky daných chemikálií uvedené v Tabulce 7. Poté byly odměrné baňky doplněny po rysku destilovanou vodou. Varní voda byla přichystána přidáním 10 ml S1, 9 090 ml S2 a 10 ml S3 a do celkového objemu 10 l byla doplněna destilovanou vodou [48].

Tabulka 7: Chemikálie použité pro přípravu měkké syntetické vody [48]

zásobní roztok	$\mu\text{eq}\cdot\text{l}^{-1}$	finální koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)		m (g)
		$\text{C}^{\text{Z}+}$	$\text{A}^{\text{Z}-}$	
S1				1 l
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	120	1,458	4,254	12,168
$\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160	3,206	5,672	17,500
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30	0,601	1,860	3,542
S2				5 l
CaCO_3	340	6,814	10,201	0,0936
S3				1 l
Na_2SO_4	230	5,288	11,046	16,334
KHCO_3	25	0,977	1,525	2,502
NaHCO_3	20	0,458	1,220	1,678

4.2.2 Příprava tvrdé vody

Tvrdá voda byla připravena ze čtyř zásobních roztoků – H1, H2, H3 a H4. Zásobní roztoky byly připraveny v odměrných baňkách, do kterých byly převedeny navážky daných chemikálií uvedené v Tabulce 8. Poté byly baňky doplněny po rysku destilovanou vodou. Do celkového objemu 10 l bylo pipetováno 100 ml H1, 9 090 ml H2, 100 ml H3 a 100 ml H4. Zbytek tvořila destilovaná voda [48].

Tabulka 8: *Chemikálie použité pro přípravu tvrdé syntetické vody* [48]

zásobní roztok	$\mu\text{eq}\cdot\text{l}^{-1}$	finální koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)		m (g)
		$\text{C}^{\text{Z}+}$	$\text{A}^{\text{Z}-}$	
H1				1 l
$\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	685	13,727	24,285	7,491
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100	2,004	6,200	1,181
H2				5 l
CaCO_3	1665	33,367	–	0,458
H3				1 l
KHCO_3	75	2,932	–	0,751
KH_2PO_4	30	1,173	2,910	0,408
NaHCO_3	270	6,207	–	2,268
Na_2SO_4	395	9,081	18,971	2,805
H4				1 l
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	815	9,904	39,143	10,044

4.3 Technologie vaření

V rámci studia vlivu varní vody na vybrané analyty bylo uvařeno pivo z měkké a tvrdé vody ve třech opakováních. Jednalo se o ležáky, tedy světlá spodně kvašená piva. V rámci technologie byl použit světlý plzeňský slad (sladovna Bernard, Rajhrad), chmelové pelety Sládek a spodní kvasinky Saflager S–23.

4.3.1 Rmutování

Navážka světlého plzeňského sladu (2 kg) byla rozemleta ve šrotovníku. Následně byl rozemletý slad přisypán do hrnce s vodou o teplotě 38 °C. Bylo provedeno rmutování infuzním způsobem dle postupu, který je uveden v Tabulce 9. Celý objem byl v 5minutových intervalech míchán vařechou. Po skončení procesu byl kompenzován odpar doplněním destilovanou vodou. Poté bylo provedeno scezování ve scezovací nádobě. Doba scezování byla přibližně 90 min. U sladiny byly následně refraktometrem změřeny hodnoty EPM a pH.

Tabulka 9: Proces rmutování

etapa	T (°C)	t (min)
vystírání	38	20
peptonizace	52	30
nižší cukrotvorná	62–64	30
vyšší cukrotvorná	72–74	20
odrmutování	80	15

4.3.2 Chmelovar

Celková doba chmelovaru byla 90 minut. K chmelení byly použity chmelové pelety. Do hrnce bylo převedeno 7 l sladiny. Sladina byla přivedena k varu a v daných časových intervalech byl přidáván chmel Sládek (obsah alfa kyselin 8,08 %), jak je uvedeno v Tabulce 10. Při chmelovaru nebyla varna zakrytá poklicí, aby mohly vytékat nežádoucí sirné látky, jako jsou DMS a thioly, které by nepříznivě ovlivňovaly senzorické vlastnosti výsledného piva [5].

Tabulka 10: Navážky chmelu a celkové IBU

Sládek	
t (min)	m (g)
90	8,75
60	8,75
15	11,38
IBU = 70	

Po ukončení tohoto postupu, byl uskutečněn whirlpooling mladiny z důvodu rychlejšího chlazení a lepšího vyčiření mladiny. Mladina byla zchlazena pomocí nerezové chladicí smyčky, která byla ponořena v mladině a v potrubí smyčky byla vedena studená voda. Poté bylo změřeno EPM a pH mladiny.

4.3.3 Kvašení a zrání

Mladina byla zchlazena na zákvasnou teplotu 14 °C a oddělena od kalu po chmelovaru do kvasné nádoby. Inokulum bylo připraveno rehydratací kvasinek Saflager S–23 (11,5 g) ve 200 ml sladiny po dobu 30 minut. Mladina byla zaočkována připraveným inokulem a provzdušněna. Kvasná nádoba byla uzavřena víkem s kvasnou zátkou a dána do lednice s nastavenou teplotou 14 °C.

Jako základní ukazatele ukončení kvašení byly propadlá deka na hladině mladého piva a ustálená nebo velmi pomalu klesající hodnota EPM. Hodnota EPM byla při stáčení piva v rozmezí 7,3–7,0 %. Po ukončené fermentaci bylo pivo stočeno do litrových lahví. U mladého piva bylo změřeno EPM a pH. Poté bylo stočené pivo uloženo do lednice s nastavenou teplotou 7 °C, kde bylo ponecháno k dokvašení a zrání po dobu tří týdnů.

4.4 Instrumentální metody

Pro stanovení vybraných analytů ve vzorcích, které byly získány v různých fázích vaření piva, byly použity dvě separační techniky – iontová chromatografie s vodivostním detektorem a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s DAD detektorem. Organické kyseliny byly stanovovány pomocí iontové chromatografie, zatímco vybrané vitaminy skupiny B a iso- α -hořké kyseliny byly analyzovány pomocí HPLC. V následujících podkapitolách budou jednotlivé metody podrobněji popsány.

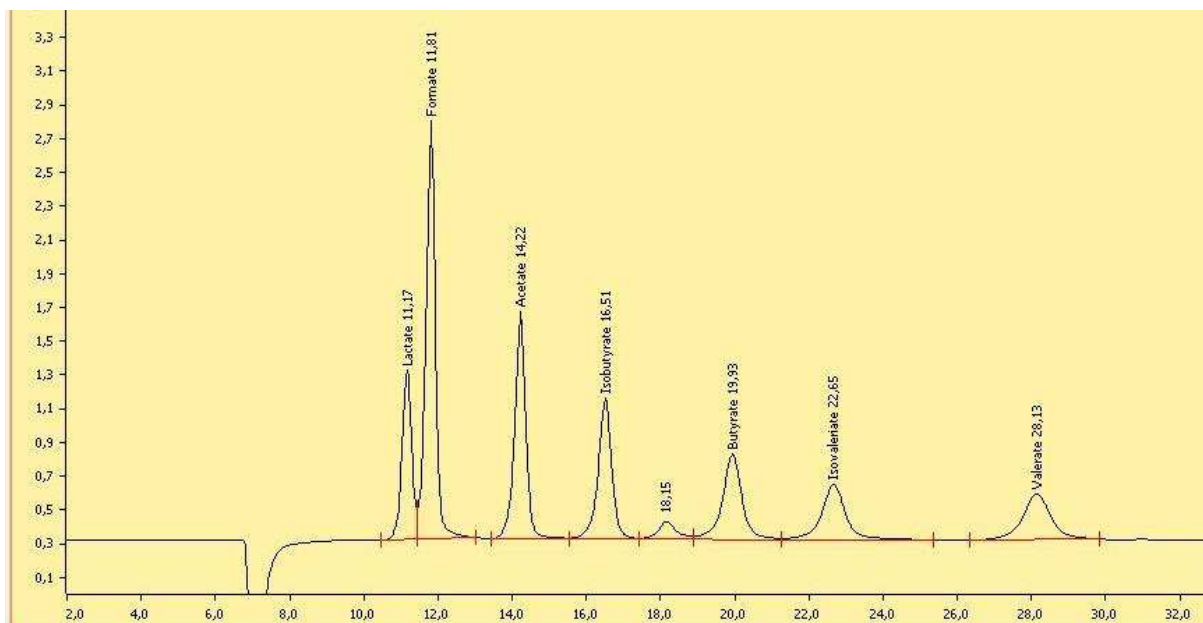
4.4.1 Metoda pro stanovení organických kyselin pomocí IC

Pomocí iontové chromatografie byly stanovovány kyselina mléčná a octová ve sladince, mladince, mladém a stabilizovaném pivu. Nastavení přístroje je shrnuto v Tabulce 11. Chromatogram standardů organických kyselin je na Obrázku 11. Retenční čas kyseliny mléčné byl 11,17 min, kyseliny octové 14,22 min.

Vzorky sladiny, mladiny, mladého piva a stabilizovaného piva byly nejprve odplyněny pomocí ultrazvuku přibližně 20 minut. Poté byly zfiltrány přes mikrofiltry s velikostí pórů 0,45 μm . Všechny vzorky byly naředěny 1:1 destilovanou vodou.

Tabulka 11: Parametry nastavení IC

Název a typ přístroje	850 Professional IC
Objem nástriku	20 μl
Průtok MF	0,6 ml/min
Složení MF	0,5 mmol HClO_4
Teplota	30°C
Tlak	5,27 MPa
Název a typ kolony	Metrosep Organic Acids – 250/7,8
Detektor	Conductivity detector



Obrázek 11: Chromatogram standardů organických kyselin

4.4.2 Metoda pro stanovení vybraných vitaminů skupiny B

Vzorky sladiny, mladiny, mladého piva a stabilizovaného piva byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD detektorem. Zacíleno bylo na riboflavin, niacin, pyridoxin a kobalamin. Podrobnější informace o nastavení přístroje obsahuje Tabulka 12. Pro lepší separaci sloučenin byla použita gradientová eluce. Nastavený gradient je uveden v Tabulce 13. Chromatogram standardů vitaminů B je na Obrázku 12. Retenční čas vitaminu B3 byl 2,16 min, vitaminu B2 8,66 min.

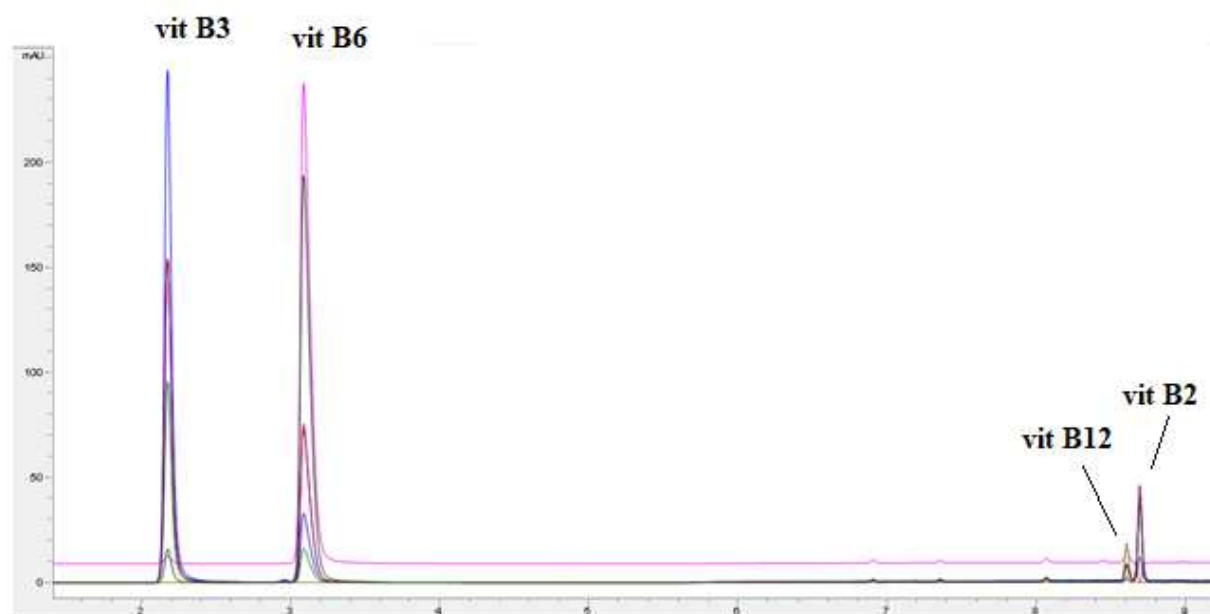
Vzorky sladiny, mladiny, mladého piva a stabilizovaného piva byly nejprve odplyněny pomocí ultrazvuku přibližně 20 minut. Poté byly zfiltrány přes mikrofiltry s velikostí pórů 0,45 μm . Následně byly vzorky převedeny do vialek a podrobeny analýze.

Tabulka 12: Parametry nastavení HPLC

Název a typ přístroje	HPLC Agilent 1260 Infinity
Objem nástriku	4 μl
Průtok MF	0,5 ml/min
Složení MF	A: 40 – 100 % 10 mM mravenčan amonný, 0,1 % kyselina mravenčí B: 0 – 60 % ACN, 0,1 % kyselina mravenčí
Kolona	Polar C18 (3,0x150 mm; 2,6 μm)
Teplota	40 °C
Detekce	260 nm, 270 nm, 271 nm, 292 nm, 360 nm
Detektor	DAD

Tabulka 13: Zvolený gradient MF

t (min)	MF	
	A (%)	B (%)
0.00	100	0
2.00	100	0
12.00	40	60
14.00	40	60
15.00	40	60
15.10	100	0
22.00	100	0



Obrázek 12: Chromatogram standardů vitaminů skupiny B (stanovení při 262, 271, 292 a 360 nm)

4.4.3 Metoda pro stanovení iso- α -hořkých kyselin

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla použita při stanovení obsahu iso- α -hořkých kyselin v mladíně, mladém a stabilizovaném pivu. Nastavení přístroje je uvedeno v Tabulce 14. Chromatogram standardu je na Obrázku 13. Retenční čas isokohumulonu byl 7,761 min, isohumulonu 10,012 min a isoadhumulonou 10,559 min.

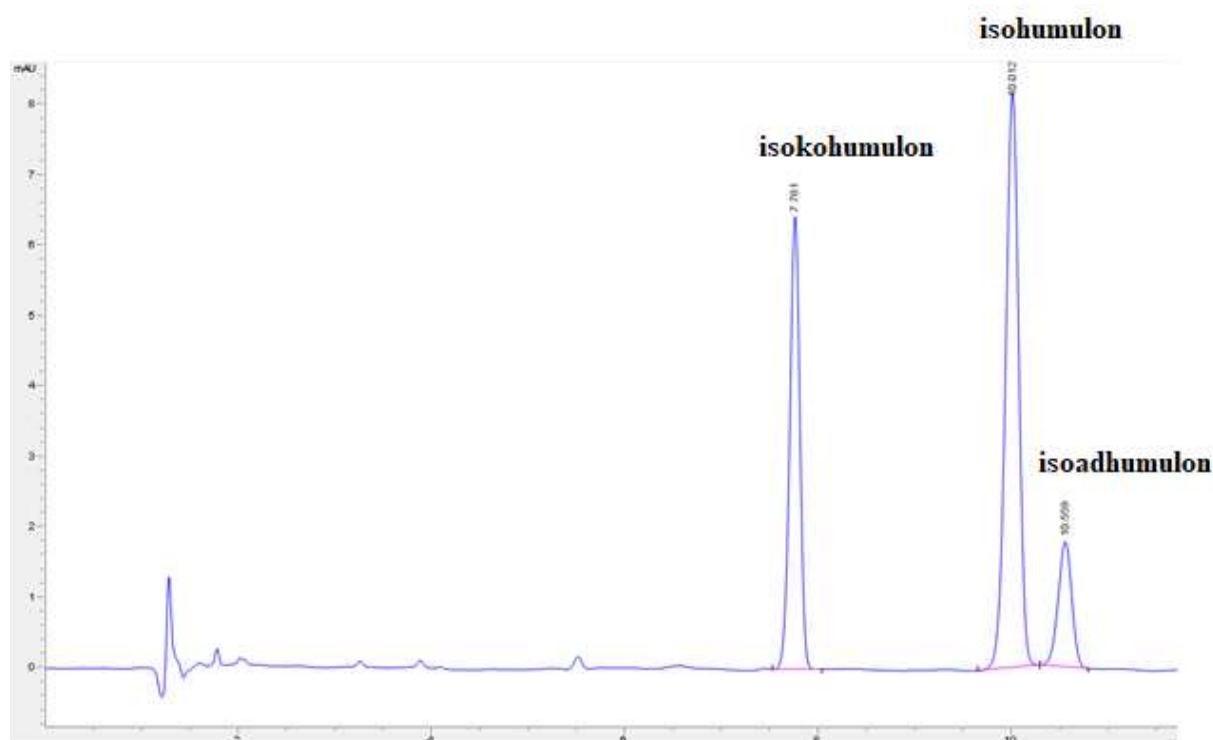
U vzorků mladiny, mladého a stabilizovaného piva byla provedena extrakce iso- α -hořkých kyselin – isohumulonu, isokohumulonu a isoadhumulonou. Do 50 ml centrifugační zkumavky bylo pipetováno 10 ml vzorku, 0,5 ml kyseliny fosforečné a 10 ml isooktanu. Zkumavka s obsahem byla 1 minutu vortexována. Poté byl přidán 1 ml methanolu a směs byla umístěna do vany ultrazvuku na 15 minut. Směs byla vložena do rotoru centrifugy a odstředěna po dobu 5 minut při 2 000 rpm. Po oddělení fází byly z horní fáze odebrány 4 ml průzrač-

ného supernatantu. Supernatant byl vysušen proudem dusíku a vyextrahované kyseliny byly následně rozpuštěny ve 2 ml methanolu. Obsah byl převeden do vialek.

Tabulka 14: Parametry nastavení HPLC

Název a typ přístroje	HPLC Agilent 1260 Infinity
Objem nástriku	4 μ l
Průtok MF	1 ml/min
Složení MF	35 %: 0,1 % H_3PO_4 , 0,2 mM Na_2EDTA 65 %: ACN
Kolona	Poroshell 120 EC – C18 (4,6x50 mm; 2,7 μ m)
Teplota	40°C
Detekce	270 nm
Detektor	DAD

Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Agilent Chemstation. Kalibrační křivka byla složena ze čtyř kalibračních bodů o koncentraci 4,2; 8,4; 16,8 a 33,6 mg/l. Vyhodnocení proběhlo pomocí lineární regrese a přesnost měřených analytů byla posuzována podle korelačního koeficientu R^2 , který u všech analytů dosahoval hodnot $R^2 > 0,999$.



Obrázek 13: Chromatogram standardu ICS-I4 (stanovení při 270 nm)

4.5 Statistická analýza dat

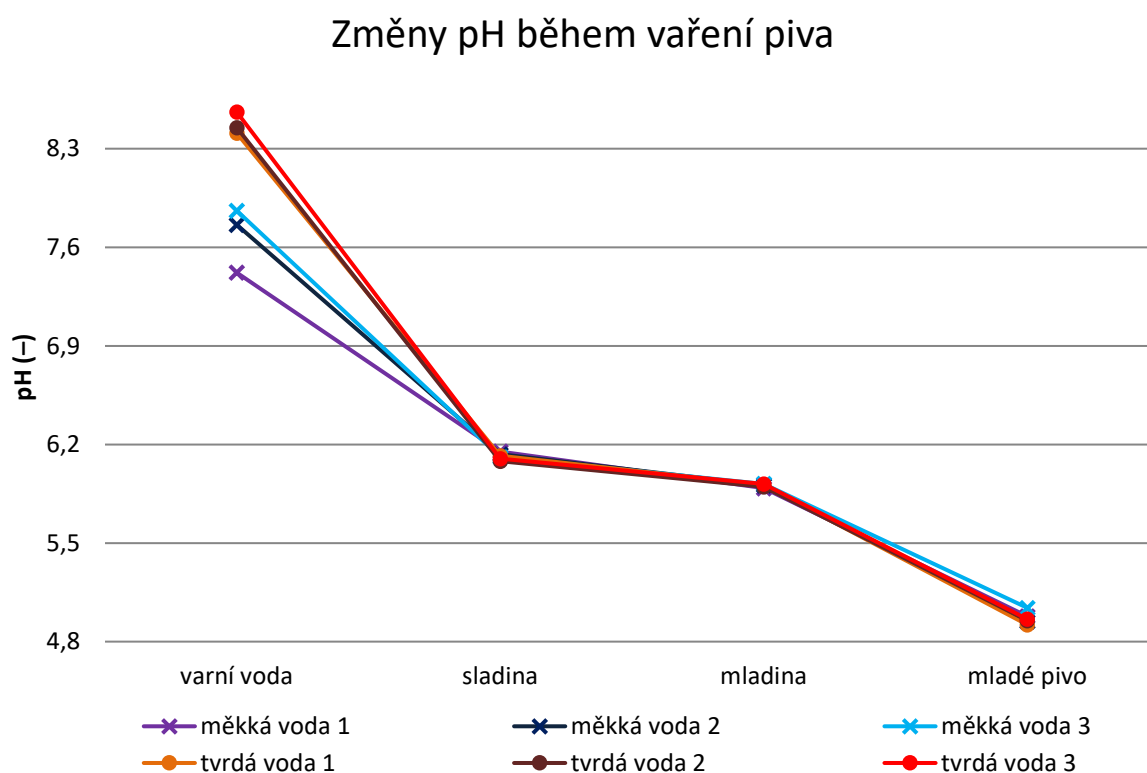
K posouzení statisticky významných rozdílů mezi naměřenými daty byla použita Analýza rozptylu (ANOVA, Analysis of variance) pomocí MS Excel a XLSTAT. Hladina statistické významnosti byla zvolena 95 %. Hodnota F_{krit} byla stanovena na 7,71. Pomocí boxových grafů byly zobrazeny průměrné hodnoty a rozptyl dat.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vliv varní vody na základní kvantitativní ukazatele piva

Před samotným vařením piva bylo změřeno pH připravených modelů syntetické vody. Průměrná hodnota pH měkké vody byla $7,68 \pm 0,23$, průměrná hodnota pH tvrdé vody byla vyšší, a to $8,47 \pm 0,08$. V porovnání s teoretickým pH byly naměřené hodnoty nižší. Teoretické pH modelu měkké vody bylo 7,83 a tvrdé vody 8,49 [48].

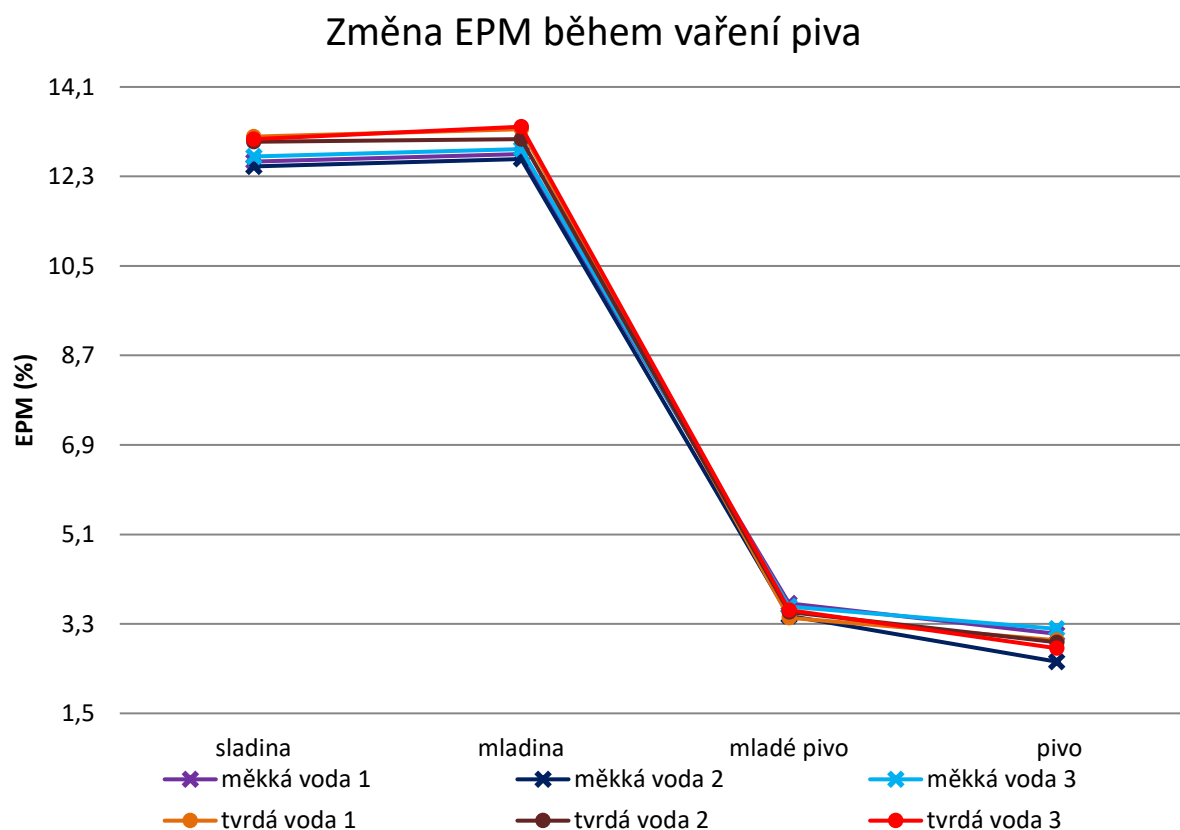
Z Obrázku 14 je patrné, že již při rmutování se rozdíl pH měkkých a tvrdých vod srovnal. Během rmutování klesá pH kvůli působení sladových enzymů, které z nukleových kyselin uvolňují fosforečnany. Ze sladu se také uvolňují organické kyseliny. Při chmelovaru se zvyšuje acidita mladiny srážením fosforečnanů v přítomnosti vápenatých a hořečnatých iontů. Ke snižování pH dále přispívají chmelové hořké kyseliny a produkty Maillardovy reakce. Při kvašení klesá pH aktivitou kvasinek, které spotřebovávají aminokyseliny a produkují organické kyseliny. Mění se pH také kvůli vznikajícímu oxidu uhličitému, který se v roztoku rozpouští za tvorby kyseliny uhličitě [5].



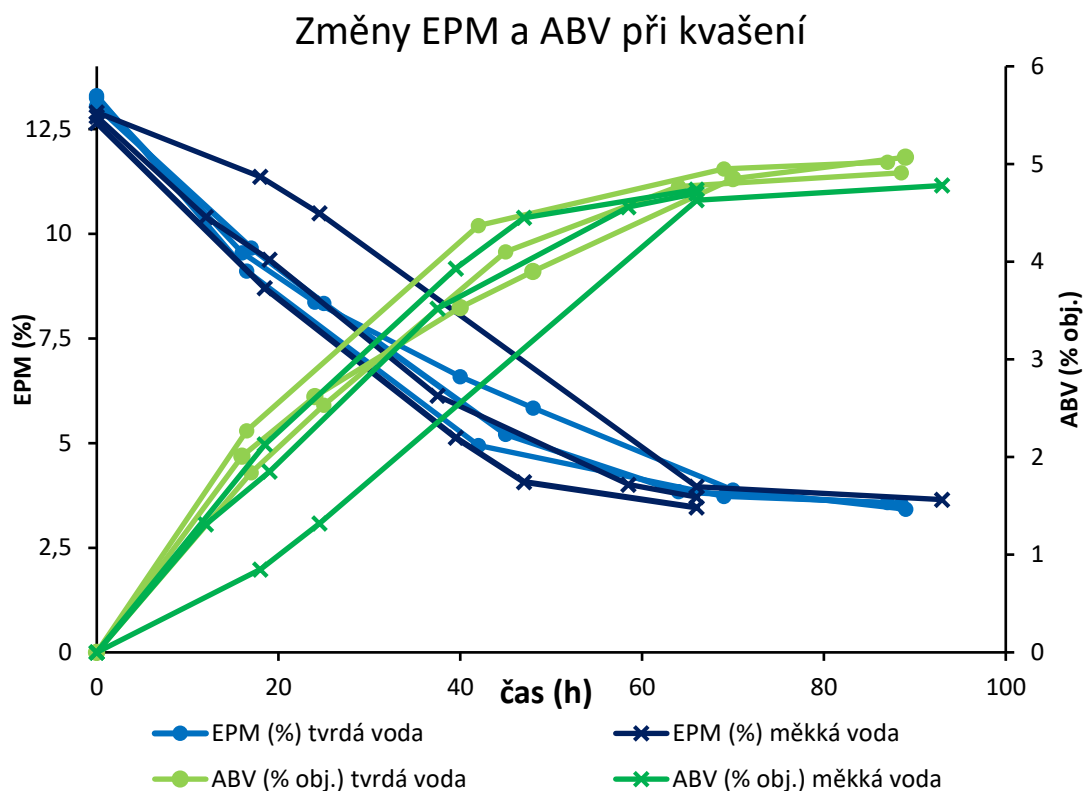
Obrázek 14: Změny hodnoty pH varní vody a v jednotlivých fázích vaření piva

Jako základní kvantitativní ukazatele při vaření piva byly zvoleny EPM (extrakt původní mladiny) a ABV (Alcohol by Volume). Extrakt původní mladiny byl použit pro vyjádření celkového obsahu sacharidů v médiu. Průměrná hodnota EPM sladiny z měkké vody byla $12,6 \pm 0,1$ %, EPM sladiny z tvrdé vody byl $13,05 \pm 0,05$ % (viz Obrázek 15). Vyšší výtěžnost v tvrdé vodě je dána vyšším obsahem Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů, které stabilizují α -amylasy a zvyšují jejich aktivitu [49, 50]. Po chmelovaru hodnota EPM mírně stoupla, důvodem pravděpodobně

byla extrakce látek z chmele. K velkému poklesu došlo při fermentaci, kdy kvasinky utilizovaly sacharidy za vzniku ethanolu a dalších metabolitů. Již mírnější pokles nastal během sekundární fermentace a zrání v lahvích, neboť kvasinky z velké části vyčerpaly substrát a již nebyly tolik vitální jako na počátku kvašení. Odchytky mezi jednotlivými vzorky mohou být zapříčiněny odlišnou koncentrací biomasy v lahvích. Na Obrázku 16 je znázorněn průběh kvašení všech vzorků mladiny. Jak kvasinky spotřebovávaly substrát, klesala i hodnota EPM a naopak rostla koncentrace ethanolu v médiu. Přibližně po 70 h kvašení se ustanovila rovnováha a změny byly už pouze pozvolné.



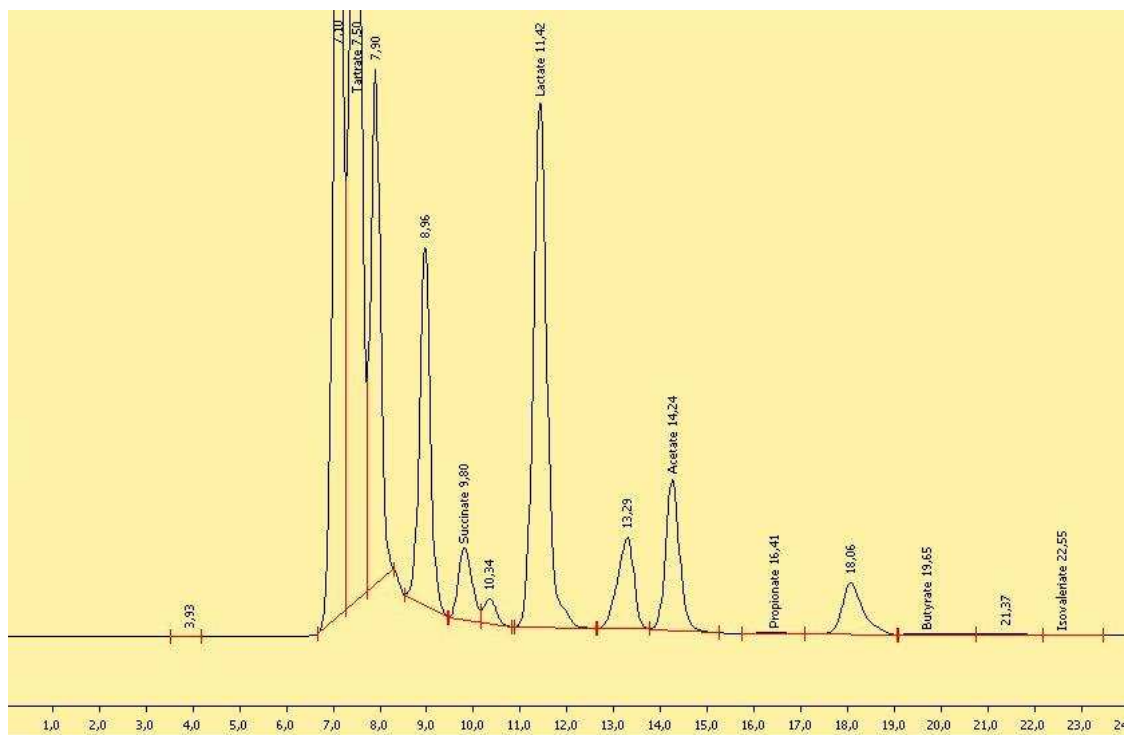
Obrázek 15: Změny hodnoty EPM v jednotlivých fázích vaření piva



Obrázek 16: Změny EPM a ABV v průběhu kvašení mladiny

5.2 Vliv tvrdosti varní vody na obsah organických kyselin v jednotlivých fázích výroby piva

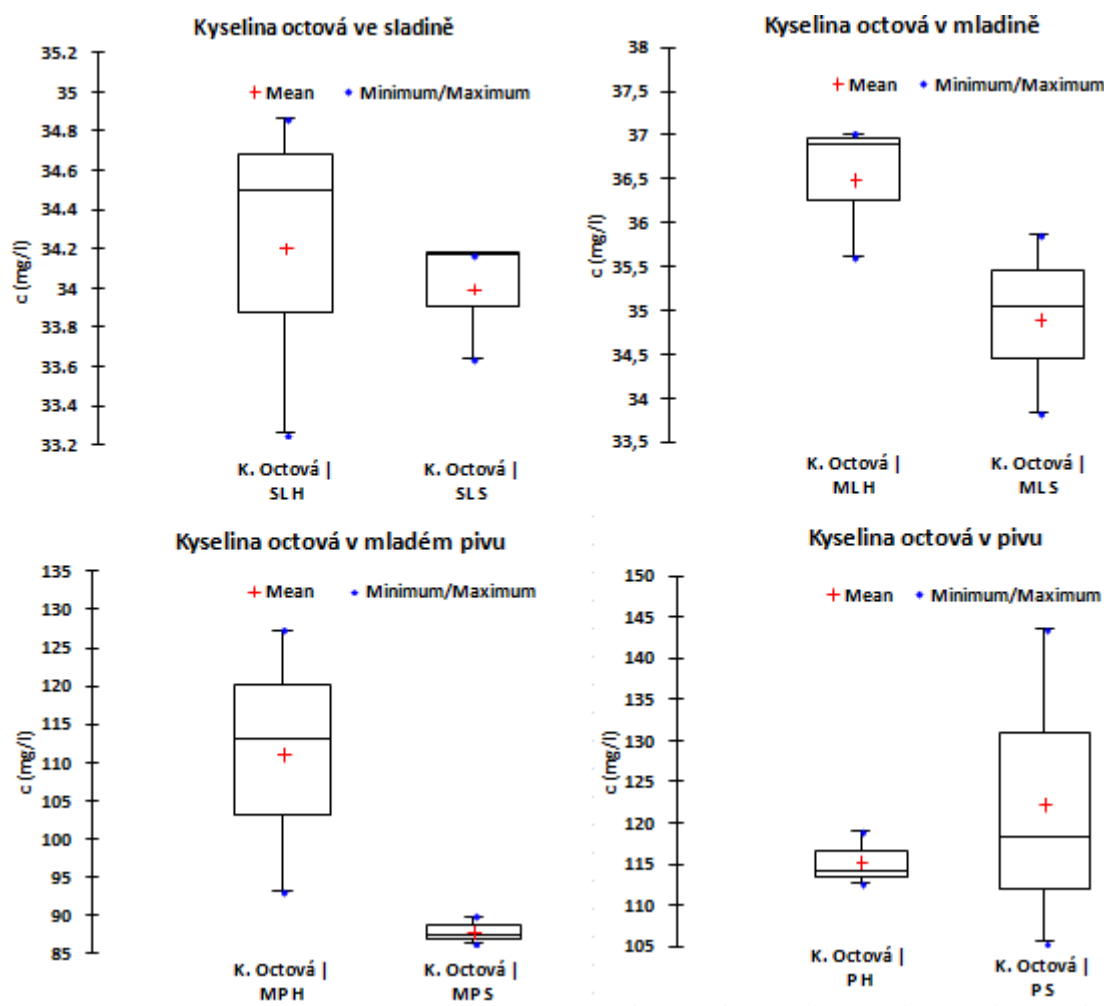
Výsledky analýz organických kyselin jsou uvedeny v Tabulkách 15 a 16. Grafické znázornění je uvedeno pomocí boxových grafů (Obrázek 18). Na Obrázku 17 je vzorový chromatogram vzorku č. 22 finálního piva z tvrdé vody. Retenční časy byly podobné retenčním časům standardů. Kyselina mléčná a octová jsou majoritními organickými kyselinami v pivu, a proto byly v pivu stanovovány [12].



Obrázek 17: Chromatogram vzorku piva

Tabulka 15: Výsledky stanovení kyseliny octové ve vzorcích

		kyselina octová c (mg/l)			$F_{krit} = 7,71$	
	druh vody	průměr	min	max	P	F
sladina	měkká	34,00	33,64	34,18	0,7063	0,1640
	tvrdá	34,21	33,26	34,87		
mladina	měkká	34,92	33,83	35,87	0,0998	4,5510
	tvrdá	36,51	35,61	37,02		
mladé pivo	měkká	87,91	86,40	89,94	0,0786	5,5162
	tvrdá	111,25	93,26	127,32		
pivo	měkká	122,42	105,56	143,49	0,5623	0,3982
	tvrdá	115,28	112,72	118,97		



Obrázek 18: Boxové grafy obsahu kyseliny octové ve fázích výroby piva z měkké (S) a tvrdé (H) vody

V rámci studia vlivu varní vody na obsah kyseliny octové nebyly nalezeny v žádné fázi výroby piva statisticky významné rozdíly (viz Tabulka 15). Kyselina octová byla stanovena už ve sladině. Jedná se o kyseliny vyextrahované ze sladu během rmutování. V obsahu kyseliny octové v měkké a tvrdé vodě nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Zatímco v měkké vodě zůstává koncentrace octové kyseliny v podstatě stejná jako ve sladině, v tvrdé vodě se objevil menší nárůst. Při kvašení a dozrávání dochází k prudkému zvýšení množství kyseliny octové v médiu. V lag-fázi růstu kvasinek a brzké fázi fermentace dochází k akumulaci kyseliny octové [36]. Během lag-fáze kvasinky využívají sacharidy aerobní respirací, vzniklý pyruvát je zpracováván a vstupuje do Krebsova cyklu. Po vyčerpání kyslíku z média je respirace potlačena a převládá anaerobní alkoholové kvašení. Pyruvát je přeměněn na ethanol a oxid uhličitý. Až ve stacionární fázi, kdy kvasinky spotřebovaly téměř veškerý substrát, opět převládá aerobní dýchání. Vzniklá kyselina octová je přeměněna na acetyl-CoA, který je využit v syntéze dalších organických kyselin v Krebsově cyklu nebo při syntéze lipidů. Použitý druh kvasinek, složení média a podmínky fermentace ovlivňují syntézu kyseliny octové [51].

Během fermentace došlo k výraznému zvýšení koncentrace kyseliny octové. Největší rozdíly byly naměřeny v mladém pivu, nicméně analýza rozptylu neukázala statisticky významné rozdíly v rámci dat. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsobený rozdílným poměrem minerálů

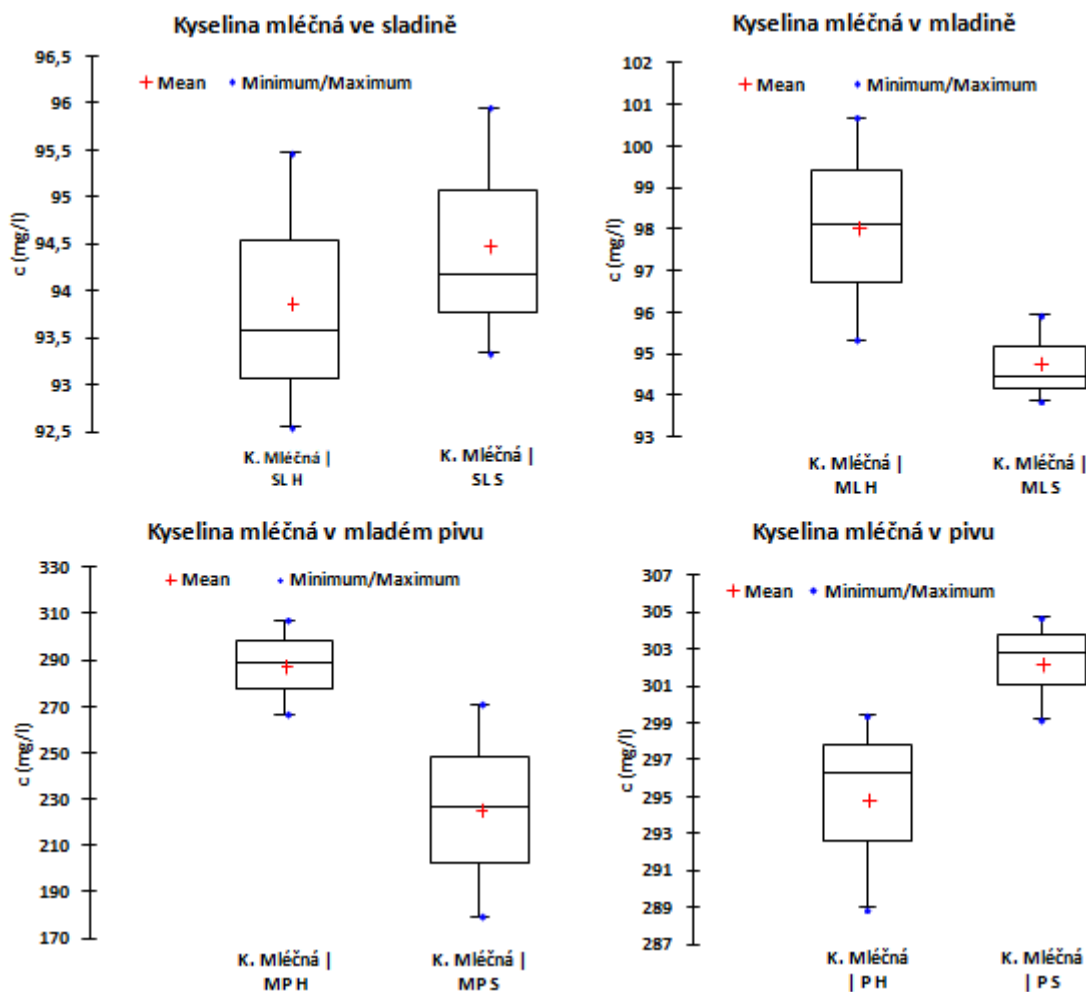
v tvrdé a měkké vodě, což může buď pozitivně, nebo negativně ovlivňovat úroveň syntézy organických kyselin. Situace se však vyrovnala v pivu a kvasinky v měkké vodě dohnaly ztrátu při sekundárním kvašení.

Zahraniční publikované články uvádí koncentrace kyseliny octové v pivu v rozmezí od 30 do 200 mg/l [33, 36, 51, 53]. Koncentrace kyseliny octové v pivech uvařených z měkké a tvrdé vody v rámci této diplomové práce se pohybovala od 106 do 144 mg/l.

Vysoké koncentrace kyseliny octové mohou značit i přítomnost octových bakterií rodu *Acetobacter* nebo *Gluconobacter*. Jelikož se jedná o striktní aeroby, v nasyceném pivu oxidem uhličitým se nemohou množit a růst, ale mohou přežívat. Za přístupu kyslíku oxidují ethanol na kyselinu octovou. Vysoký obsah kyseliny octové v pivu má negativní vliv na sensorické vlastnosti, protože kyselina má charakteristické aroma a způsobuje nepříjemnou pachutí na jazyku [5].

Tabulka 16: Výsledky stanovení kyseliny *mléčné* ve vzorcích

kyselina mléčná		c (mg/l)			$F_{krit} = 7,71$	
	druh vody	průměr	min	max	P	F
sladina	měkká	94,49	93,35	95,95	0,6203	0,2874
	tvrdá	93,87	92,55	95,48		
mladina	měkká	94,74	93,86	95,92	0,1181	3,9418
	tvrdá	98,04	95,33	100,67		
mladé pivo	měkká	225,55	179,34	271,00	0,0988	4,5894
	tvrdá	287,48	266,54	306,74		
pivo	měkká	300,06	299,22	304,71	0,1020	4,4690
	tvrdá	298,37	288,99	299,44		



Obrázek 19: Boxové grafy obsahu kyseliny mléčné ve fázích výroby piva z měkké (S) a tvrdé (H) vody

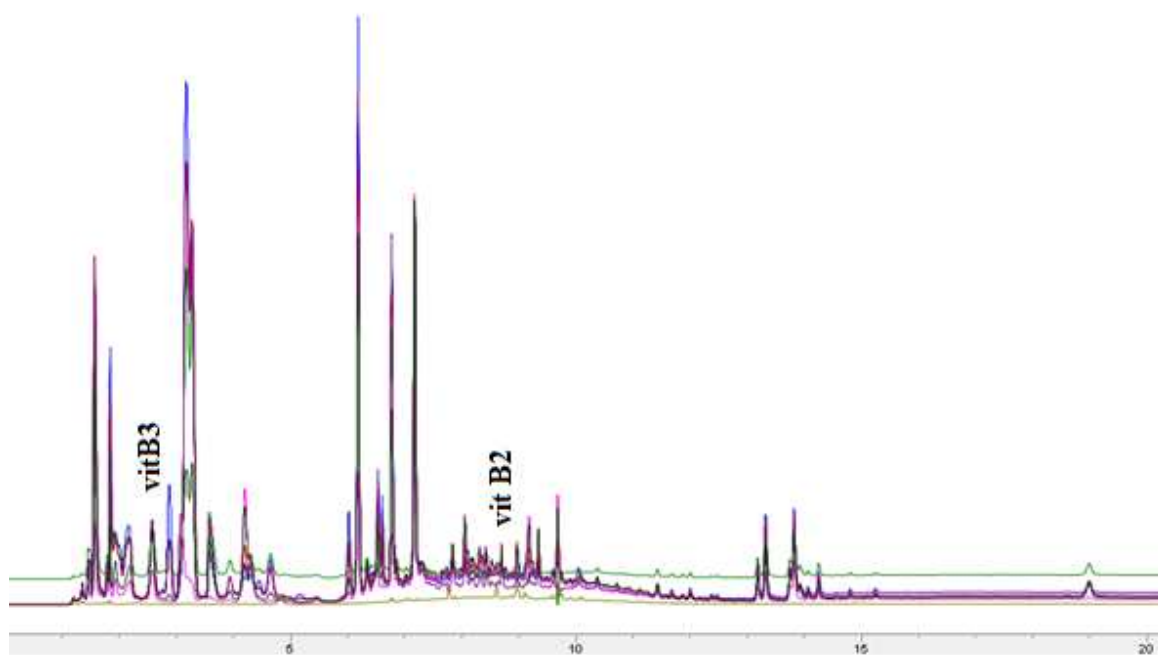
Výsledky stanovení kyseliny mléčné ve vzorcích jsou uvedeny v Tabulce 16 a s tím související boxové grafy jsou na Obrázku 19 (viz výše). Kyselina mléčná byla stanovena stejně jako kyselina octová už ve sladině. Může se skládat ze dvou izomerů – D-kyseliny mléčné, která pochází z ječmene a její obsah kolísá při sladování, a L-kyseliny mléčné, která je bakteriálního původu [36, 52]. Rozdíly ve složení varních vod neměly na obsah kyseliny mléčné vliv (viz Tabulka 16). Vysoké teploty chmelovaru nezpůsobily pokles kyseliny mléčné, v tvrdé vodě se koncentrace mírně zvýšila, což by mohlo souviset s extrakcí organických kyselin z chmelu. Vysoká produkce nastala při fermentaci činností kvasinek. Stejně jako u kyseliny octové i zde byl stejný trend v rozdílu měkké a tvrdé vody v mladém pivu a pivu. V mladém pivu bylo v tvrdé vodě více kyseliny mléčné než v měkké ($P = 0,0988$, $F = 4,5894$). Opačná situace nastala v pivu, kdy koncentrace kyseliny mléčné v tvrdé vodě zůstala stejná, v měkké vodě byly stanoveny vyšší koncentrace ($P = 0,1020$, $F = 4,4690$).

Různé články uvádějí velké rozsahy koncentrace kyseliny mléčné v pivu. Konkrétně v ležácích se toto rozpětí pohybuje od 37 do 233 mg/l, u piv typu ale 44–276 mg/l a u tmavých silných piv se koncentrace pohybovala mezi 276 a 292 mg/l [36, 52]. Obsah kyseliny mléčné v pivech uvařených z měkké a tvrdé vody byl v porovnání se zahraniční literaturou spíše vyšší, pohyboval se od 289 do 305 mg/l.

Mléčné bakterie mohou být důvodem vysokých koncentrací kyseliny mléčné. Mohou se pomnožovat už ve sladině, mladině i během dokvašování. Daří se jim v rozmezí pH 4 až 7. Optimální teplota růstu je 20 až 30 °C, avšak vyskytují se i kmeny psychrofilní, které mohou růst při nízkých teplotách během kvašení a zrání piva [5].

5.3 Vliv tvrdosti varní vody na obsah vybraných vitaminů skupiny B v jednotlivých fázích výroby piva

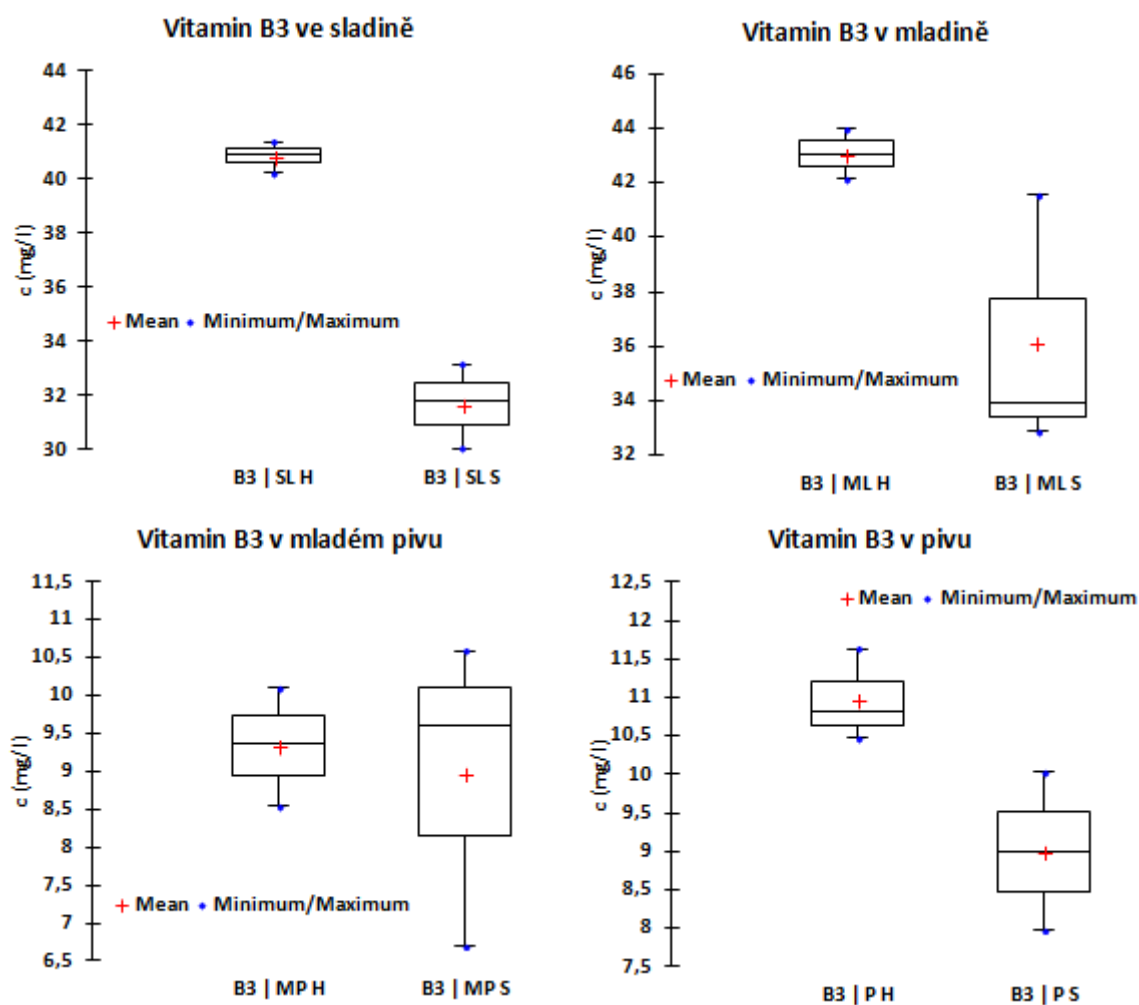
V rámci pozorování vlivu varní vody na obsah vitaminů skupiny B byly stanovovány vitaminy B2 (riboflavin), B3 (niacin), B6 (pyridoxin) a B12 (kyanokobalamin). Koncentrace posledních dvou zmíněných vitaminů byla ve všech vzorcích pod mezí detekce. Naopak vitaminy B2 a B3 byly stanoveny ve všech vzorcích. Výsledky analýz stanovených vitaminů skupiny B jsou uvedeny v Tabulkách 17 a 18. Pro větší názornost jsou uvedeny i boxové grafy (Obrázek 21, 22). Na Obrázku 20 je chromatogram vzorku. Retenční časy vitaminů ve vzorcích (vitamin B3 t_r = 2,158 min, B2 t_r = 8,664 min) odpovídaly retenčním časům standardů.



Obrázek 20: Chromatogram *spikovaného* vzorku (stanovení při 262, 271, 292 a 360 nm)

Tabulka 17: Výsledky stanovení obsahu vitamínu B3 ve vzorcích

vitamin B3 c (mg/l)					$F_{krit} = 7,71$	
	druhy vody	průměr	min	max	P	F
sladina	měkká	31,68	30,07	33,18	0,0007	92,2144
	tvrdá	40,85	40,25	41,36		
mladina	měkká	36,13	32,92	41,56	0,0674	6,2091
	tvrdá	43,05	42,14	43,97		
mladé pivo	měkká	8,97	6,70	10,59	0,7838	0,0861
	tvrdá	9,34	8,54	10,11		
pivo	měkká	8,99	7,97	10,02	0,0448	8,3243
	tvrdá	10,97	10,47	11,63		



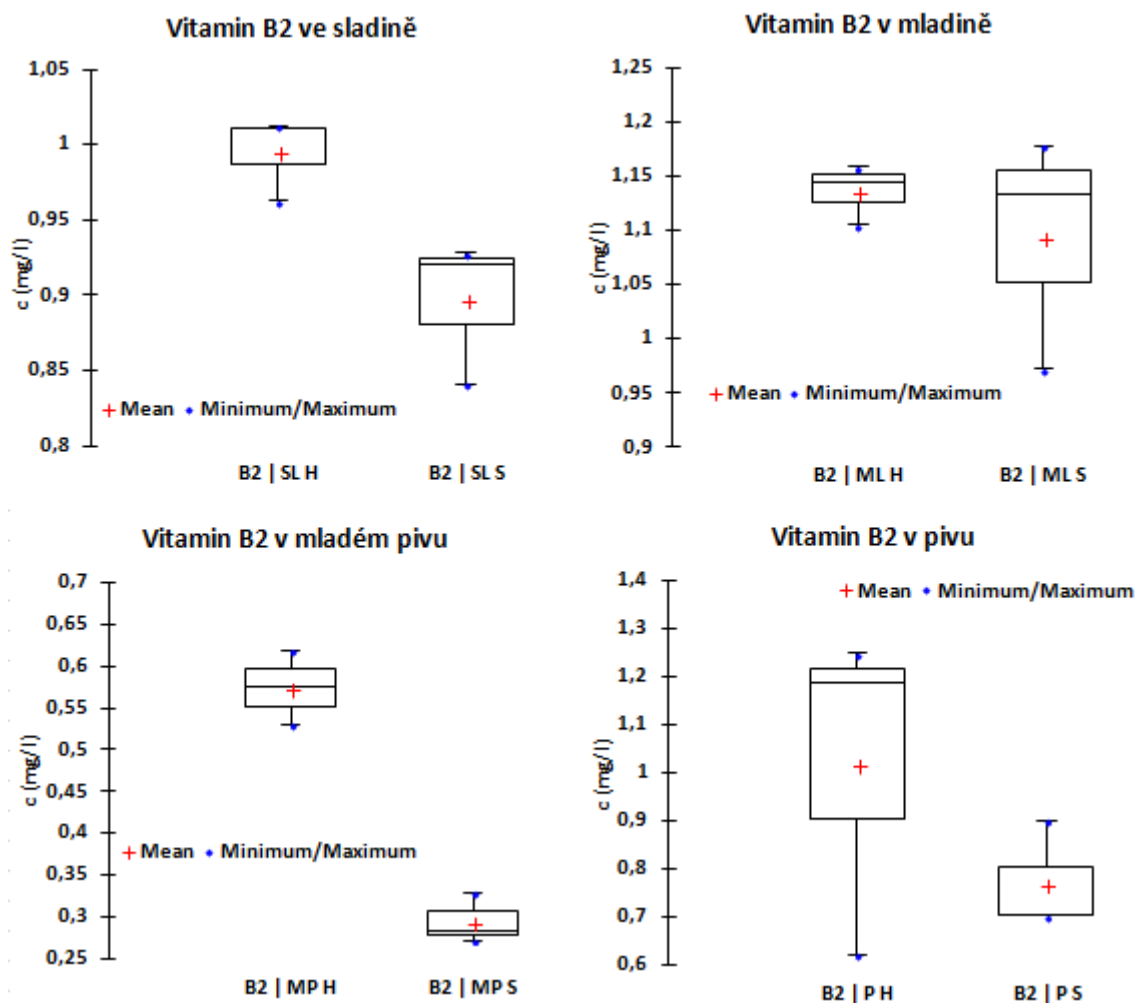
Obrázek 21: Boxové grafy s obsahem vitamínu B3 ve fázích výroby v měkké (S) a tvrdé (H) vodě

Při stanovení vitamínu B3 byly ve sladince zjištěny statisticky významné rozdíly mezi tvrdou a měkkou vodou ($P = 0,0007$, $F = 92,214$). Tvrdá voda zřejmě fungovala jako lepší extrakční činidlo díky rozdílnému pH a iontové síle. V přítomnosti kvasinek hladina vitamínu B3 rapidně klesla, neboť kvasinky vitamin v mladince využívají při biochemických procesech a k syntéze kyseliny nikotinové nedochází [5]. Mírně zvýšená koncentrace vitamínu ve stabilizovaném pivu v tvrdé vodě mohla být způsobena uvolněním buněčného obsahu při autolýze kvasinek. Neboť podmínky domácího vaření jsou omezené, nemohly být zajištěny stejné podmínky dozrávání v lahvích kvůli různé koncentraci biomasy.

Dostupná literatura uvádí obsah vitamínu B3 v pivu 5 mg/l [5]. Naměřené hodnoty jsou vyšší v porovnání s literaturou, a to 8 – 12 mg/l. Vysoký obsah vitamínu může být dán tím, že pivo po stočení nebylo dále nijak upravováno na rozdíl od komerčních piv, která se filtrují a často i pasterují.

Tabulka 18: Výsledky stanovení obsahu vitamínu B2 ve vzorcích

vitamin B2 c (mg/l)					$F_{krit} = 7,71$	
	druhy vody	průměr	min	max	P	F
sladina	měkká	0,90	0,84	0,93	0,0385	9,2210
	tvrdá	1,00	0,96	1,01		
mladina	měkká	1,09	0,97	1,18	0,5513	0,4221
	tvrdá	1,14	1,11	1,16		
mladé pivo	měkká	0,29	0,27	0,33	0,0008	83,2461
	tvrdá	0,57	0,53	0,62		
pivo	měkká	0,77	0,70	0,90	0,3008	1,4099
	tvrdá	1,02	0,62	1,25		



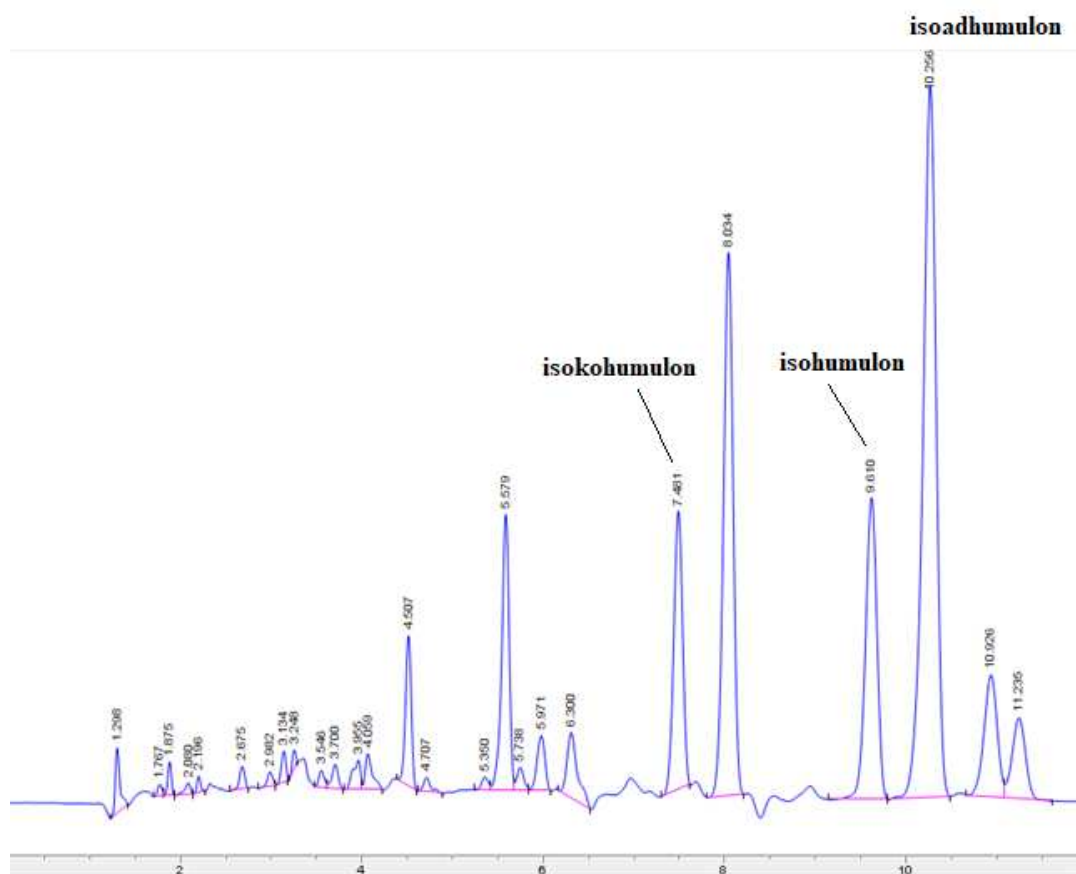
Obrázek 22: Boxové grafy s obsahem vitaminu B2 ve fázích výroby v měkké (S) a tvrdé (H) vodě

Při studiu vlivu varní vody na obsah vitaminu B2 byl pozorován velmi podobný trend jako v případě vitaminu B3. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny ve sladíně a mladém pivu (viz Tabulka 18). V tvrdé vodě se vitamin B2 ze sladu vyextrahoval lépe, než v měkké vodě. Příčinou zřejmě mohlo být rozdílné pH varní vody. Riboflavin je termostabilní vitamin, díky tomu během chmelovaru nedošlo k jeho ztrátám. Při kvašení došlo k určitému poklesu obsahu vitaminu, největší rozdíl byl pozorován v měkké vodě. V tvrdé vodě k tak vysokým ztrátám nedošlo zřejmě díky tomu, že riboflavin tvoří stabilní komplexy s ionty Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} [39]. V pivu koncentrace vitaminu stoupla pravděpodobně uvolněním riboflavinu při autolýze kvasinek.

Dostupná literatura uvádí koncentraci riboflavinu v pivech 0,25 mg/l [26]. Při srovnání stanovených hodnot a literatury jsou stejně jako v případě vitaminu B3 koncentrace vitaminu B2 několikanásobně vyšší – 0,6 až 1,2 mg/l. Opět je důvodem zřejmě vynechání postfermentačních úprav.

5.4 Vliv tvrdosti varní vody na obsah iso- α -hořkých kyselin v jednotlivých fázích výroby piva

Výsledky analýz iso- α -hořkých kyselin jsou uvedeny v Tabulkách 19, 20 a 21. Vzorový chromatogram vzorku č. 1 mladiny z měkké vody je uveden na Obrázku 23. Oproti standardu došlo k menšímu urychlení v eluci iso- α -hořkých kyselin ve vzorku. Retenční čas isokohumulonu byl 7,481 min, isohumulonu 9,610 min a isoadhumulon 10,256 min.

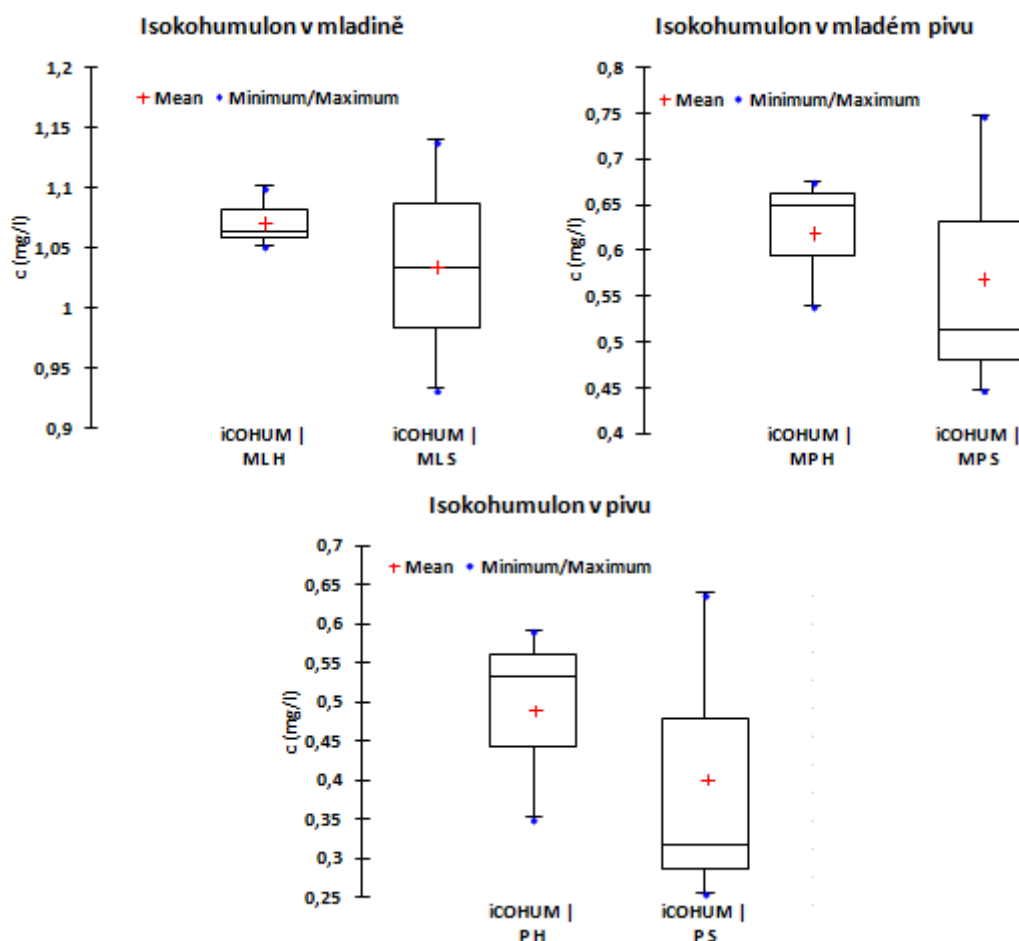


Obrázek 23: Chromatogram vzorku piva (stanovení při 270 nm)

Byl sledován účinek varní vody na nejvíce zastoupené analogy iso- α -hořkých kyselin isohumulon, isokohumulon a isoadhumulon. Analýza rozptylu neukázala žádné statisticky významné rozdíly v měkké a tvrdé vodě u žádného stanovovaného isomeru. Isomery hořkých kyselin nejsou stabilní a z boxových grafů (Obrázek 24, Obrázek 25 a Obrázek 26) je patrné, že dochází k jejich postupné degradaci v čase. Navíc v domovarnických podmínkách není možné dosáhnout takové výtěžnosti isomerů α -hořkých kyselin. Z celkového množství hořkých látek chmele se do výsledného piva dostane maximálně 30 %, přičemž přibližně 20 % zůstane v chmelovém mlátu, 20–30 % je zachyceno v kalech a 20–30 % se při fermentaci naváže na kvasinky a do kvasné deky. Isomeraci také ovlivňuje doba chmelovaru (ideálních je 90 minut) a hodnota EPM (čím vyšší stupňovitost sladiny, tím větší výtěžnost) [5].

Tabulka 19: Výsledky stanovení isokohumulonu ve vzorcích

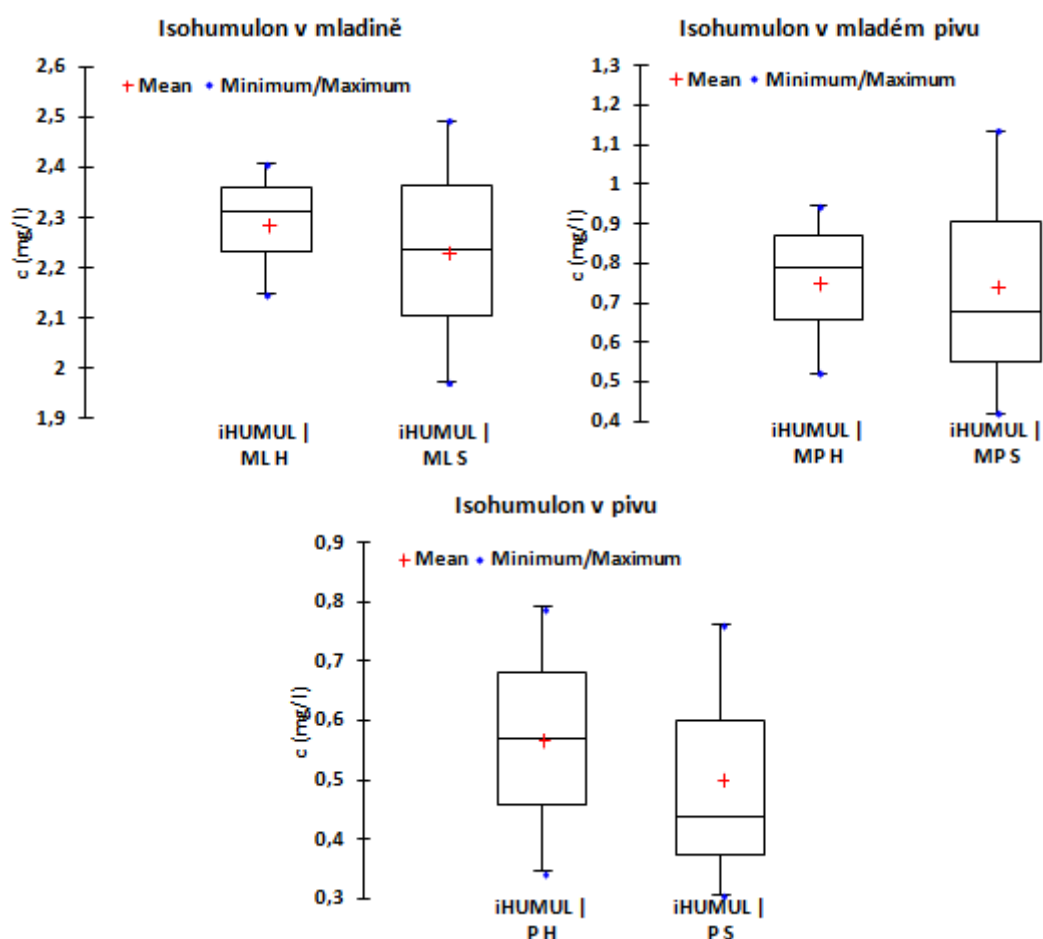
isokohumulon c (mg/l)					$F_{\text{krit}} = 7,71$	
	druh vody	průměr	min	max	P	F
mladina	měkká	1,04	0,93	1,14	0,5836	0,3545
	tvrdá	1,07	1,05	1,10		
mladé pivo	měkká	0,57	0,45	0,75	0,6376	0,2590
	tvrdá	0,62	0,54	0,67		
pivo	měkká	0,40	0,26	0,64	0,5619	0,3991
	tvrdá	0,49	0,35	0,59		



Obrázek 24: Boxové grafy s obsahem isokohumulonu v měkké (S) a tvrdé (H) vodě

Tabulka 20: Výsledky stanovení isohumulonu ve vzorcích

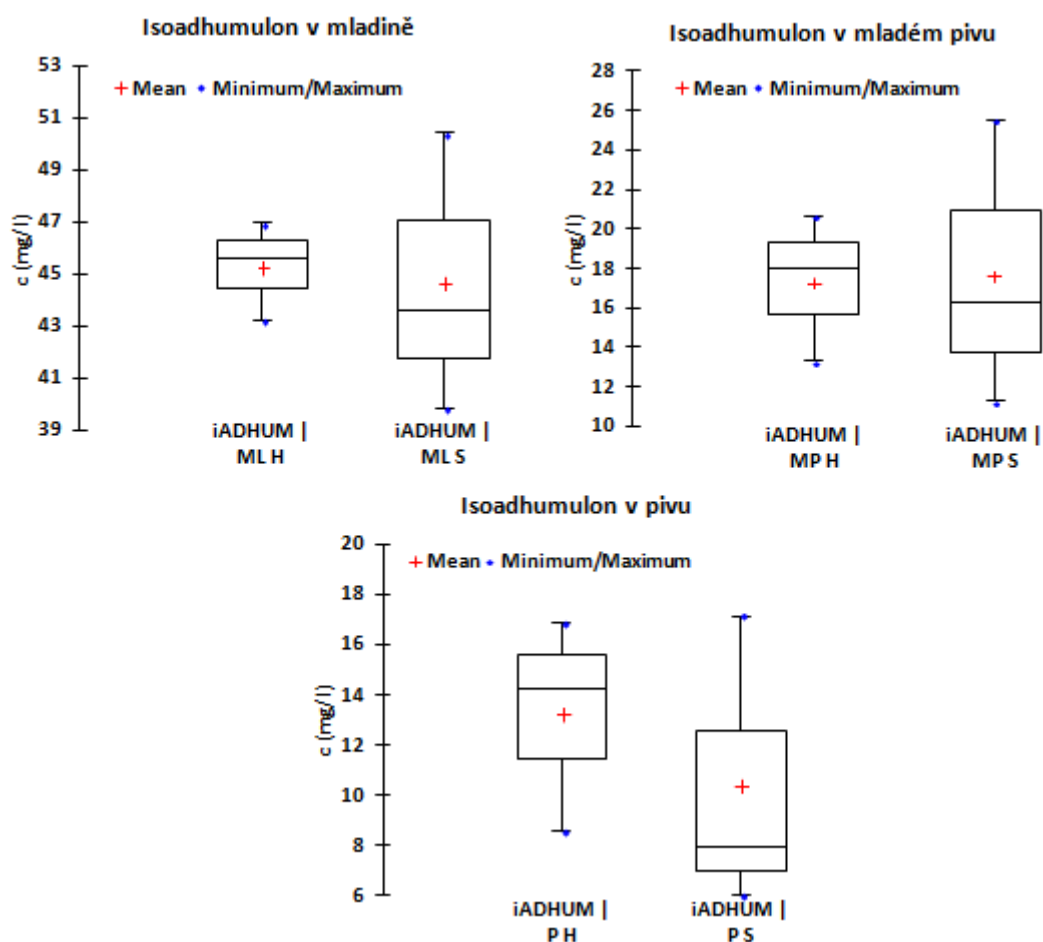
isohumulon c (mg/l)					$F_{\text{krit}} = 7,71$	
	druh vody	průměr	min	max	P	F
mladina	měkká	2,23	1,97	2,49	0,7584	0,1085
	tvrdá	2,29	2,15	2,41		
mladé pivo	měkká	0,74	0,42	1,13	0,9758	0,001
	tvrdá	0,75	0,52	0,94		
pivo	měkká	0,50	0,31	0,76	0,7393	0,1273
	tvrdá	0,57	0,34	0,79		



Obrázek 25: Boxové grafy s obsahem isohumulonu v měkké (S) a tvrdé (H) vodě

Tabulka 21: Výsledky stanovení isoadhumulonů ve vzorcích

isoadhumulon c (mg/l)					$F_{\text{krit}} = 7,71$	
	druh vody	průměr	min	max	P	F
mladina	měkká	44,63	39,83	50,44	0,8564	0,0372
	tvrdá	45,26	43,22	46,96		
mladé pivo	měkká	17,68	11,26	25,55	0,9472	0,0050
	tvrdá	17,35	13,33	20,68		
pivo	měkká	10,36	6,02	17,15	0,5314	0,4681
	tvrdá	13,25	8,59	16,90		



Obrázek 26: Boxové grafy s obsahem isoadhumulonů v měkké (S) a tvrdé (H) vodě

6 ZÁVĚR

Varní voda je jednou ze základních surovin při výrobě piva a znalost jejího složení a pH je nezbytné pro správný průběh celého varního procesu.

V podmínkách domácího pivovaru bylo uvařeno celkem 6 várek světlého spodně kvašeného piva plzeňského typu, konkrétně 3 piva z měkké a 3 piva z tvrdé syntetické vody. Hodnota pH měkké vody byla o osm desetin nižší než pH tvrdé vody. V průběhu vaření byly odebrány vzorky sladiny, mladiny, mladého a finálního piva, které po dobu 3 týdnů zráló v lednici. V těchto fázích byla změřena hodnota pH a EPM. Také byla provedena analýza organických kyselin pomocí IC s vodivostním detektorem, vybraných vitaminů skupiny B a iso- α -hořkých kyselin pomocí HPLC s detektorem diodového pole. Pro posouzení rozdílu mezi měkkou a tvrdou vodou byla zvolena statistická analýza dat (analýza rozptylu), přičemž hladina významnosti byla 95 %.

Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že pH varní vody mělo vliv na extrakci látek při sladování. Sladina připravená z tvrdé vody měla EPM vyšší než 13 %, zatímco sladina, která byla připravena z vody měkké, měla v průměru EPM rovno 12,6 %. Složení tvrdé vody mělo totiž příznivější vliv na aktivitu amylas při rmutování. Současně vyšší koncentrace zkvasitelných cukrů je pro technologii výroby výhodnější, neboť mladina může být více prokvašena, a tím je získán produkt s vyšším obsahem alkoholu. Lze tedy říci, že tvrdá voda je z hlediska výtěžnosti EPM a ABV výhodnější.

Organické kyseliny jsou významnými acidulanty, neboť snižují hodnotu pH a ovlivňují organoleptické a senzorické vlastnosti piva. Jsou obsaženy již ve sladu a jejich obsah kolísá během výroby piva. Analýza byla zaměřena na kyselinu octovou a mléčnou jako majoritní zástupce organických kyselin v pivu. Tyto kyseliny byly stanoveny ve sladině, mladině, mladém i stabilizovaném pivu. Vliv měkké a tvrdé vody na obsah kyseliny mléčné a octové nebyl prokázán. Během vaření piva sice docházelo k výkyvům v obsahu organických kyselin, ale na finální produkt složení varní vody vliv nemělo.

Dále byl studován vliv pH varní vody na obsah vitaminů skupiny B. Byly stanovovány vitaminy B2, B3, B6 a B12, poslední dva zmíněné byly pod mezí detekce. Vitaminy skupiny B jsou přítomny již ve sladu a největší změny koncentrace se dějí během kvašení. U vitaminu B2 byl prokázán vliv složení varní vody ve sladině a mladém pivu. Tvrdá voda byla lepším extrakčním činidlem a bivalentní ionty obsažené v tvrdé vodě tvořily stabilní komplexy s vitaminem B2. Ve stabilizovaném pivu ANOVA neprokázala statisticky významné rozdíly kvůli velkému rozptylu dat. Je možné, že další měření by ukázala opak. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny i u vitaminu B3, konkrétně ve sladině a stabilizovaném pivu. Stejně jako u vitaminu B2 byly vyšší koncentrace naměřeny v tvrdé vodě. Z provedených analýz vyplývá, že pH varní vody mělo vliv na obsah vitaminů B v pivu.

Z isomerů α -hořkých kyselin byly stanovovány nejvíce zastoupené analogy isohumulon, isokohumulon a isoadhumulon, které se nejvíce podílí na hořkosti piva. Největší koncentrace iso- α -hořkých kyselin byly naměřeny v mladině a v průběhu dalšího zpracování jejich obsah klesal. Na základě analýz obsahu iso- α -hořkých kyselin v průběhu vaření piva nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi měkkou a tvrdou vodou. Složení varní vody tedy nemělo vliv na stabilizované pivo.

Z naměřených výsledků plyne, že varní voda má určitý vliv na zkoumané parametry. Ve finálním výrobku – stabilizovaném pivu – bylo zjištěno, že tvrdá voda je vhodnější z hlediska lepší výtěžnosti EPM a obsahu vitaminů B. Je pravděpodobné, že složení varní vody bude mít vliv i na další parametry v pivu, a proto si tato problematika zaslouží další zkoumání. Předmětem dalšího výzkumu by mohlo být zastoupení jednotlivých sacharidů nebo například výtěžnost chmelovaru při vaření v domácích podmínkách.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VIVIAN, Adriana Fu, Caroline Tiemi AOYAGUI, Diogo NOIN DE OLIVEIRA a Rodrigo Ramos CATHARINO. Mass spectrometry for the characterization of brewing process. Food Research International [online]. 2016, **89**(1), 281-288 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916303222?via%3Dihub>
- [2] FILLAUDEAU, Luc, Pascal BLANPAIN-AVET a Georges DAUFIN. Water, wastewater and waste management in brewing industries. Journal of Cleaner Production [online]. 2006, **14**(5), 463-471 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652605000041>
- [3] Češi berou útokem malé pivovary. Asociace malých a středních podniků a živnostníků ČR [online]. Praha: QCM, 2017 [cit. 2018-04-28]. Dostupné z: <http://amsp.cz/cesi-berou-utokem-male-pivovary/>
- [4] KADLEC, Pavel. Technologie potravin II. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [5] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ a Tomáš LEJSEK. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [6] ZHANG, Guoping a CHENGDAO LI [EDITORS]. Genetics and improvement of barley malt quality [online]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2009 [cit. 2018-04-12]. ISBN 978-364-2012-792.
- [7] ZAVŘELOVÁ, Marta. Složení zrna ječmene z hlediska potravinářského využití. *Kvasný průmysl*. 2014, **60**(5), 127-130. ISSN 2570-8619.
- [8] HLAVÁČEK, Ivan, Blanka KRÁLOVÁ a Josef MOŠTEK. Stanovení aktivity α -amylasy a β -amylasy ve sladu. *Kvasný průmysl*. 1979, **25**(11), 241-245. ISSN 2570-8619.
- [9] NENTWICHOVÁ, Marie a Alice DOLEŽALOVÁ. Nové metody pro kontrolu sladu. Stanovení α -amylasy ve sladu. *Kvasný průmysl*. 1984, **30**(2), 25-28. ISSN 2570-8619.
- [10] HUCKER, Barry, Lara WAKELING a Frank VRIESEKOOOP. The Quantitative Analysis of Thiamin and Riboflavin and Their Respective Vitamers in Fermented Alcoholic Beverages. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2011, **59**(23), 12278-12285 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1021/jf202647x. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf202647x>
- [11] STRINGER, W. J. Vitamins in beer. Journal of the Institute of Brewing [online]. 1946, **52**(2), 81-90 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.1946.tb01573.x>
- [12] Changes in organic acid levels during malting. Journal of the Institute of Brewing [online]. 1996, **102**(5), 161-166 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00904.x>
- [13] ESSLINGER, Hans Michael, , ed. Handbook of brewing processes, technology, markets [online]. [Online-Ausg.]. Weinheim: Wiley-VCH, 2009 [cit. 2018-04-28]. ISBN 978-352-7623-488. Dostupné z: <http://www.users.on.net/~bradandpam/EB/EB.pdf>
- [14] KROFTA, Karel a Alexandr MIKYŠKA. Beta kyseliny chmele, význam a využití. *Kvasný průmysl*. 2014, **60**(4), 96-105. ISSN 2570-8619.
- [15] RYBÁČEK, Václav. *Chmelářství*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).

- [16] PERPÈTE, Philippe, Laurent MÉLOTTE, Stéphane DUPIRE a Sonia COLLIN. Varietal Discrimination of Hop Pellets by Essential Oil Analysis I. Comparison of Fresh Samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1998, **56**(3), 104-108. DOI: 10.1094/ASBCJ-56-0104. ISSN 03610470. Dostupné také z: <http://www.asbcnet.org/publications/journal/vol/abstracts/0921-05a.htm>
- [17] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, petr HULÍN, Marcel KARABÍN a Pavel DOSTÁLEK. Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech J. Food Sci.* [online]. 2007, **25**(4), 182–188 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00311.pdf>
- [18] PIAZZON, Alessandro, Monica FORTE a Mirella NARDINI. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(19), 10677-10683 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1021/jf101975q. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf101975q>
- [19] ZHAO, Haifeng, Wenfen CHEN, Jian LU a Mouming ZHAO. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(3), 1150-1158 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.028. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460901022X>
- [20] ARON, Patricia M. a Thomas H. SHELLHAMMER. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *Journal of the institute of brewing* [online]. 2010, **116**(4), 369–380 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x>
- [21] VAN SUMERE, C.F., K. VANDE CASTEELE, W. HUTSEBAUT, E. EVERAERT, L. COOMAN a W. MEULEMANS. RP-HPLC analysis of flavonoids and the biochemical identification of hop cultivars. *EBC Monograph XIII, EBC Symposium on hops, Freising-Weihenstephan, 1987*, 146-175.
- [22] LERMUSIEAU, G., C. LIÉGEOIS a S. COLLIN. Reducing power of various hop varieties. *Cerevisia* [online]. 2001, **26**(1), 33-41 [cit. 2016-05-09]. ISSN 0770-1713. Dostupné z: https://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Lermusieau_2001_Cerevisia_reducing_power_hop_varieties.pdf
- [23] OLADOKUN, Olayide, Amparo TARREGA, Sue JAMES, Katherine SMART, Joanne HORT a David COOK. The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food chemistry* [online]. 2016, **205**(15), 212-220 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616303740?via%3Dihub>
- [24] KROFTA, Karel, Světlana VRABCOVÁ, Alexandr MIKYŠKA a Marie JURKOVÁ. Vliv oxidačních produktů beta kyselin chmele na hořkost piva. *Kvasný průmysl*. 2013, **59**(10-11), 306-312. ISSN 2570-8619.
- [25] MEILGAARD, M. HOP ANALYSIS, COHUMULONE FACTOR AND THE BITTERNESS OF BEER: REVIEW AND CRITICAL EVALUATION. *Journal of the Institute of Brewing*. 1960, **66**(1), 35-50. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1960.tb01696.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1960.tb01696.x>
- [26] OLŠOVSKÁ, Jana, Marie JURKOVÁ a Pavel ČEJKA. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin: Část 2. Stanovení cis/trans- izomerů iso- α -

- hořkých kyselin v pivu metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie. *Kvasný průmysl*. 2012, **58**(4), 94-99. ISSN 2570-8619.
- [27] VERZELE, M. 100 YEARS OF HOP CHEMISTRY AND ITS RELEVANCE TO BREWING. *Journal of the Institute of Brewing*. 1986, **92**(1), 32-48. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04372.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04372.x>
- [28] REGAN, J. P. a J. A. ELVIDGE. CHEMISTRY OF HOP CONSTITUENTS. PART XXXIII REACTIONS OF β -ACIDS. *Journal of the Institute of Brewing*. 1969, **75**(1), 10-14. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1969.tb03175.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1969.tb03175.x>
- [29] COMRIE, A. A. D. Brewing liquor. *Journal of the institute of brewing* [online]. 1967, **73**(4), 335-346 [cit. 2018-04-19]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.1967.tb03050.x>
- [30] EUMANN, M. a C. SCHAEBERLE. Chapter 5 – Water. *Brewing materials and processes: a practical approach to beer excellence* [online]. Amsterdam: Elsevier, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016, s. 97-111 [cit. 2018-04-21]. ISBN 012799954X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127999548000058>
- [31] KRÜGER, E. a H. M. ANGER. Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft. 3. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co, 1990. ISBN 3-925673-75-X.
- [32] SOLOMON, Theodros. The Definition and Unit of Ionic Strength. *Journal of Chemical Education* [online]. 2001, **78**(12), 1691-1692 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1021/ed078p1691. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed078p1691>
- [33] VONTROBOVÁ, Eva, Jana KOPECKÁ, Gabriela ROTKOVÁ a Dagmar MATOULKOVÁ. Factors Influencing the Production of Sensory Active Substances in Brewer's and Wine Yeast. *Kvasný Průmysl* [online]. 2017, **63**(4), 173-189 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.18832/kp201720. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp201720.html>
- [34] KOPECKÁ, Jana, Dagmar MATOULKOVÁ a Miroslav NĚMEC. Kvasinky a jejich využití. *Kvasný průmysl* [online]. 2012, **58**(11-12), 326-335 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.18832/kp2012029. Dostupné z: https://www.kvasnyprumysl.cz/artkey/kpr-201211-0001_Kvasinky_a_jejich_vyuziti.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dkvasinky%2Bin%253Aname%2Bkey%2Babstr%2Bpdf%26sfrom%3D0%26spage%3D30
- [35] RUSSELL, I. Chapter 4 – Yeast. *Brewing materials and processes: a practical approach to beer excellence* [online]. Amsterdam: Elsevier, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016, s. 77-96 [cit. 2018-04-22]. ISBN 978-0-12-799954-8. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127999548000046>
- [36] COOTE, N. a B. H. KIRSOP. The content of some organic acids in beer and other fermented media. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1974, **80**(5), 474-483 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x>
- [37] TORIJA, María Jesús, Gemma BELTRAN, Maite NOVO, Montse POBLET, Nicolas ROZÈS, Albert MAS a José Manuel GUILLAMÓN. Effect of Organic Acids and Nitrogen Source on Alcoholic Fermentation: Study of Their Buffering Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(4), 916-922 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1021/jf020094r. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020094r>

- [38] HUCKER, Barry, Lara WAKELING a Frank VRIESEKOP. Vitamins in brewing: presence and influence of thiamine and riboflavin on wort fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2016, **122**(1), 126-137 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1002/jib.293. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.293>
- [39] SHERAZ, Muhammad Ali, Sadia Hafeez KAZI, Sofia AHMED, Zubair ANWAR a Iqbal AHMAD. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* [online]. 2014, **10**(4), 1999-2012 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.3762/bjoc.10.208. ISSN 1860-5397. Dostupné z: <http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/10/1/208>
- [40] COLE, Laurence a Peter R. KRAMER. Vitamins and Minerals. Human physiology, biochemistry, and basic medicine [online]. Boston: Academic Press, 2016, s. 165–175 [cit. 2018-05-07]. ISBN 0128036990. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128036990000372>
- [41] JASKULA, Barbara, Guido AERTS a Luc DE COOMAN. Potential impact of medium characteristics on the isomerisation of hop α -acids in wort and buffer model systems. *Food Chemistry* [online]. 2010, **123**(4), 1219-1226 [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610006643?via%3Dihub>
- [42] SNYDER, Lloyd R., Joseph J. KIRKLAND a John W. DOLAN. Introduction to modern liquid chromatography [online]. 3rd ed. Hoboken: John Wiley, 2010 [cit. 2018-05-06]. ISBN 978-047-0508-183. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470508183>
- [43] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Ostrava: P. Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902-1550-5.
- [44] Kol. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999, 348 s. ISBN 80-902-4329-0.
- [45] PAI, Tapasya V., Siddhi Y. SAWANT, Arindam A. GHATAK, Palak A. CHATURVEDI, Arpita M. GUPTA a Neetin S. DESAI. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, **52**(3), 1414-1423 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1007/s13197-013-1152-2. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1152-2>
- [46] PYTELA, Oldřich. 2003. Chemometrie pro organické chemiky. Vyd. 4. Pardubice: Univerzita Pardubice, 211 s. ISBN 80-719-4539-0.
- [47] ECKSCHLAGER, Karel. 1991. Chemometrie. 1. vyd. Praha: Universita Karlova, 156 s. ISBN 80-706-6487-8.
- [48] SMITH, E.J., W. DAVISON a J. HAMILTON-TAYLOR. Methods for preparing synthetic freshwaters. *Water Research* [online]. 2002, **36**(5), 1286-1296 [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902783>
- [49] SABOURY, Ali Akbar, Setareh GHASEMI a Mohammad Umar DAHOT. Thermodynamic study of magnesium ion binding to alpha amylase. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* [online]. 2005, **42**(5), 326-329 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/3533/1/IJBB%2042\(5\)%20326-329.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/3533/1/IJBB%2042(5)%20326-329.pdf)
- [50] KARBASSI, F. A. A. a F. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylase. *Thermochimica Acta* [online]. 2000, **362**(1-2), 121-129 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1016/S0040-6031(00)00579-7. ISSN 00406031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603100005797>
- [51] WALKER, Graeme M. Yeast physiology and biotechnology. 2nd. New York: J. Wiley, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9.

- [52] WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages. Journal of the Institute of Brewing [online]. 1976, **82**(2), 84-92 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03731.x>
- [53] ZHANG, Yanqing, Shiru JIA a Wujiu ZHANG. Predicting acetic acid content in the final beer using neural networks and support vector machine. Journal of the Institute of Brewing [online]. 2012, **118**(4), 361-367 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1002/jib.50. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.50>
- [54] OLŠOVSKÁ, Jana, Dagmar MATOULKOVÁ, Pavel ČEJKA a Marie JURKOVÁ. Pivo a zdraví. *Kvasný průmysl* [online]. 2014, **60**(7-8), 174-181 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: https://www.kvasnyprumysl.cz/artkey/kpr-201407-0001_Pivo_a_zdravi.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dpivo%2Ba%2Bzdrav%25ED%2Bin%253Aauth%2Bname%2Bkey%2Babstr%26sfrom%3D0%26spage%3D30

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Světová produkce piva v miliardách hektolitrů.....	7
Obrázek 2: Český výstav v milionech hektolitrů	8
Obrázek 3: Počet nově vzniklých pivovarů v ČR	8
Obrázek 4: Škrobové zrno pod mikroskopem a struktura amylosy a amylopektinu	9
Obrázek 5: Strukturní vzorce pryskyřic chmele [24]	12
Obrázek 6: Schéma glykolýzy.....	17
Obrázek 7: Schéma ethanolového kvašení	17
Obrázek 8: Schéma vzniku kyseliny octové a její další využití v buňce [13]	20
Obrázek 9: Mechanismus izomerace humulonů na isohumulon [41].....	23
Obrázek 10: Chromatograf Agilent 1260 Infinity a zjednodušené schéma HPLC	26
Obrázek 11: Chromatogram standardů organických kyselin	36
Obrázek 12: Chromatogram standardů vitaminů skupiny B (stanovení při 262, 271, 292 a 360 nm).....	37
Obrázek 13: Chromatogram standardu ICS-I4 (stanovení při 270 nm).....	38
Obrázek 14: Změny hodnoty pH varní vody a v jednotlivých fázích vaření piva	40
Obrázek 15: Změny hodnoty EPM v jednotlivých fázích vaření piva	41
Obrázek 16: Změny EPM a ABV v průběhu kvašení mladiny.....	42
Obrázek 17: Chromatogram vzorku piva	43
Obrázek 18: Boxové grafy obsahu kyseliny octové ve fázích výroby piva z měkké (S) a tvrdé (H) vody.....	44
Obrázek 19: Boxové grafy obsahu kyseliny mléčné ve fázích výroby piva z měkké (S) a tvrdé (H) vody.....	46
Obrázek 20: Chromatogram spikovaného vzorku (stanovení při 262, 271, 292 a 360 nm)....	47
Obrázek 21: Boxové grafy s obsahem vitamínu B3 ve fázích výroby v měkké (S) a tvrdé (H) vodě	48
Obrázek 22: Boxové grafy s obsahem vitamínu B2 ve fázích výroby v měkké (S) a tvrdé (H) vodě	50
Obrázek 23: Chromatogram vzorku piva (stanovení při 270 nm)	51
Obrázek 24: Boxové grafy s obsahem isokohumulonu v měkké (S) a tvrdé (H) vodě.....	52
Obrázek 25: Boxové grafy s obsahem isohumulonu v měkké (S) a tvrdé (H) vodě	53
Obrázek 26: Boxové grafy s obsahem isoadhumulonů v měkké (S) a tvrdé (H) vodě	54

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ELSD – detektor rozptylu světla

DAD – detektor diodového pole

DMS – dimethylsulfid

DMSO– dimethylsulfoxid

IBU – mezinárodní jednotka hořkosti

IC – iontový chromatograf

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

RPC – chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

THF – tetrahydrofuran

UV-VIS – ultrafialová a viditelná oblast