

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Jana Vosmeková

Univerzita Pardubice  
Fakulta Chemicko-technologická

Pivovarnictví a analýza piva  
Bakalářská práce

2022

Jana Vosmeková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Vosmeková**  
Osobní číslo: **C19130**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Pivovarnictví a analýza piva**  
Téma práce anglicky: **Brewing and beer analysis**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na výrobu piva a na základní parametry, které se využívají pro hodnocení kvality piva. Při sledování kvality piva se věnujte látkám přirozeně se vyskytujícím v pivu, ale rovněž látkám nežádoucím. Dále se zaměřte na analytické metody, které se pro stanovení těchto biologicky aktivních látek v pivu používají.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Pivovarnictví a analýza piva jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2022

Jana Vosmeková v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za veškerou pomoc a trpělivost při studiích.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se věnuje charakteristice Českého piva, jeho výrobě a látkám v pivu obsaženým. Dále se zabývá parametry určenými pro hodnocení kvality piva a analytickými metodami, které se používají pro stanovení látek přirozeně se v pivu vyskytujících. V neposlední řadě je práce věnována i látkám, které výslednou kvalitu piva mohou zhoršit.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Pivo, pivovarnictví, kvalita piva, hořké látky, polyfenoly, dimethylsulfid

## **TITLE**

Brewing and beer analysis

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with the characteristics of Czech beer, its production and the substances contained in beer. Further, the parameters intended for the evaluation of beer quality and analytical methods that are used to determine substances naturally occurring in beer are discussed. Last but not least, the work is devoted to substances that can worsen the resulting quality of beer.

## **KEYWORDS**

Beer, brewing industry, beer quality, bitter substances, polyphenols, dimethyl sulfide

## OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....</b>	<b>11</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA PIVA.....</b>	<b>13</b>
1.1 DRUHY PIV .....	13
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ PIVA.....	14
1.2.1 Minerální látky.....	14
1.2.2 Vitaminy .....	15
1.2.3 Bílkoviny .....	15
1.2.4 Sacharidy .....	15
1.2.5 Nukleové kyseliny .....	15
1.2.6 Polyfenolické látky .....	15
1.2.7 Hořké chmelové látky .....	16
1.2.8 Oxid uhličitý .....	16
<b>2 SUROVINY NA VÝROBU PIVA .....</b>	<b>17</b>
2.1 SLAD .....	17
2.1.1 Druhy sladu.....	17
2.1.2 Náhražky sladu .....	19
2.2 CHMEL .....	19
2.2.1 Chemické složení chmele .....	20
2.2.2 Chmelové výrobky.....	21
2.3 PIVOVARSKÁ VODA .....	22
2.4 PIVOVARSKÉ KVASINKY .....	22
<b>3 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA.....</b>	<b>24</b>
3.1 VÝROBA SLADU .....	24
3.2 PROCES VÝROBY PIVA .....	26
3.2.1 VÝROBA MLADINY .....	26
3.2.1.1 Šrotování sladu .....	26
3.2.1.2 Vystírání.....	27
3.2.1.3 Rmutování.....	27
3.2.1.4 Scezování sladiny .....	28
3.2.1.5 Chmelovar.....	28
3.2.1.6 Čištění a zchlazování mladiny .....	29
3.2.2 KVAŠENÍ MLADINY .....	30



3.2.2.1	Hlavní kvašení .....	30
3.2.2.2	Dokvašování a zrání.....	31
3.2.2.3	Moderní technologie kvašení.....	31
3.2.3	ZÁVĚREČNÉ ÚPRAVY .....	32
3.2.3.1	Filtrace .....	32
3.2.3.2	Stabilizace .....	32
3.2.3.3	Pasterace .....	33
3.2.3.4	Stáčení.....	33
<b>4</b>	<b>ANALÝZA PIVA.....</b>	<b>34</b>
4.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	34
4.2	Spektrofotometrie .....	35
4.3	ANTIOXIDANTY .....	35
4.3.1	Antioxidační kapacita .....	35
4.3.1.1	Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH.....	36
4.3.1.2	Stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS.....	36
4.3.1.3	Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP .....	37
4.4	POLYFENOLICKÉ LÁTKY .....	37
4.4.1	Stanovení polyfenolických látek kapalinovou chromatografií .....	38
4.4.1.1	Stanovení xanthohumolu .....	38
4.4.2	Stanovení polyfenolů spektrofotometricky.....	39
4.5	TĚKAVÉ LÁTKY .....	40
4.5.1	Dimethylsulfid .....	40
4.5.2	Stanovení dimethylsulfidu plynovou chromatografií .....	41
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1:</b> Plzeňský slad [21].....	18
<b>Obrázek 2:</b> Barevný slad [21].....	18
<b>Obrázek 3:</b> Chmel otáčivý ( <i>Humulus lupulus</i> ) [28].....	20
<b>Obrázek 4:</b> Chmelové výrobky [35].....	21
<b>Obrázek 5:</b> Schéma výroby piva [38].....	24
<b>Obrázek 6:</b> Struktura xanthohumolu [79].....	38
<b>Obrázek 7:</b> Vzorec dimethylsulfidu .....	40
<b>Tabulka 1:</b> Taxonomie pivovarských kvasinek [18].....	22

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ČR – Česká republika

EPM – extrakt původní mladiny

CKT – cylindrokónický tank

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

DPPH – 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl

ABTS – kyselina (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátová)

XN – xanthohumol

IXN – isoxanthohumol

CPE – extrakce s využitím teploty zákalu micelárních roztoků

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

CMC – karboxymethylcelulóza

DMS – dimethylsulfid

## ÚVOD

Pivo je slabě alkoholický pěnivý nápoj hořké chuti vyrobený ze sladu, chmele a vody a je zkvašený pomocí kulturních pivovarských kvasinek. Sladařství a pivovarnictví patří v našem státě k významným oborům potravinářského průmyslu s mnoholetou tradicí a patří mezi nejznámější na světě [1].

V České republice se pivo považuje za jeden z českých symbolů, protože od roku 2008 je České pivo chráněno zeměpisným označením (CHZO). Účelem tohoto označení je zachovat dobré jméno a kvalitu piva vyráběného na území ČR. Tímto označením se za České pivo nesmí vydávat nápoje, které byly vyrobeny jiným technologickým postupem a z jiných surovin, a nemají tedy charakteristické vlastnosti splňující požadavky Českého piva. České pivo se od zahraniční produkce liší svými sensorickými vlastnostmi, ale i způsobem výroby. Dodržováním podmínek výroby a použitých surovin kontroluje Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) [2, 3].

V Českém pivu dominuje chuť sladu a chmele. Je zde slabá příchut' pasterizace, kvasnic nebo esterů. Nesmí zde být přítomny cizí vůně či příchutě. Pivo má střední až silný říz. I plnost je střední až vysoká, právě díky obsahu nezskvašeného zbytku extraktu. Nejdůležitější vlastností Českého piva je jeho hořkost, která je střední až vyšší s mírnou až lehkou trpkostí. Pro České pivo je typická i vyšší koncentrace polyfenolů a vyšší hodnota pH [3].

# 1 CHARAKTERISTIKA PIVA

## 1.1 DRUHY PIV

Piva lze rozdělit podle různých faktorů. Jedním z faktorů, které výrazně ovlivňuje výslednou chuť piva, je způsob kvašení [4]. Rozeznáváme piva spodně a svrchně kvašená, přičemž proces přípravy těchto piv je podobný, pouze se liší typem použitých kvasinek a teplotou kvašení. Spodní kvasinky kvasí při nižších teplotách, zatímco svrchní kvasinky mohou kvasit i při teplotách přes 22 °C. Hlavní rozdíl mezi těmito kvasinkami spočívá v jejich schopnosti zpracovávat a přeměňovat jednoduché sacharidy obsažené v mladině [4, 5].

Spodně kvašená piva neboli ležáky jsou světově nejpopulárnějším druhem piva a v ČR tvoří největší část produkce. Tento druh piva se nechává kvasit při nižších teplotách, nejčastěji při teplotě mezi 5 až 9 °C. Po kvašení leží v chladu, kde dochází k jeho zrání (proto se nazývá „ležák“) a při nízkých teplotách jsou i skladovány. U těchto piv převažuje vůně a chuť po sladu a chmelových hořkých a aromatických látkách [4, 5].

Svrchně kvašená piva jsou populární především v anglosaských zemích. Vyznačují se menším řízem a chudší pěnou, což je způsobeno nižším obsahem oxidu uhličitého, právě z důvodu kvašení při vyšších teplotách (15 až 25 °C). Svrchně kvašená piva se ještě podle chuti a místa jejich vzniku rozdělují na IPU (indické světlé pivo), APU (americké světlé pivo) a stout (pivo vyrobené z praženého sladu s typickou tmavou až černou barvou) [4, 5].

Dalším způsobem dělení piv je podle obsahu extraktu původní mladiny (EPM) neboli podle stupňovitosti. Stupňovitost tedy nevyjadřuje procenta alkoholu, ale EPM, což je množství látek, které se uvolní při vaření mladiny ze sladu a chmele. Piva s vyšším obsahem EPM (piva s vyšším stupněm) se vyznačují hutnějším a plnějším dojmem. Česká desítka představuje pivo výčepní, dvanáctky jsou ležáky a speciální piva jsou piva s obsahem nad 13 % EPM [1, 4, 5].

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 248/2018 Sb. (Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí) rozlišuje česká legislativa piva dle EPM na stolní (EPM do 6 % m/m), výčepní (EPM 7–10 % m/m), ležák (spodně kvašené, EPM 11–12 % m/m), plné (svrchně kvašené, EPM 11–12 % m/m) a silné (dříve speciální, EPM min. 13 % m/m) [6].

Podle obsahu alkoholu se piva dělí na nízkoalkoholická (obsah alkoholu 0,5–1,2 % v/v) a nealkoholická (obsah alkoholu nejvýše 0,5 % v/v). Dále se piva dělí podle barvy na světlá (vyrobená především ze světlých sladů), tmavá a polotmavá, která jsou vyrobená z tmavých, karamelových, popř. barevných sladů ve směsi se světlými slady a poslední skupinou jsou piva řezaná, která vznikají smícháním piva světlého a tmavého [6].

## **1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ PIVA**

Chemické složení piva záleží především na složení mladiny a stupni prokvašení. Důležitou roli hraje také kvalita výchozích surovin a použité technologie při výrobě, protože většina látek obsažených v pivu pochází ze surovin použitých při výrobě nebo vznikají až během samotné výroby. Na kvalitu má vliv i případná nežádoucí kontaminace, která je způsobena nežádoucími mikroorganismy, které se do piva mohou dostat z kontaminovaných surovin nebo během výroby [7, 8].

Z chemického hlediska se dá pivo označit jako nápoj, který obsahuje širokou škálu chemických sloučenin, které určují jeho chuť, pěnu a barvu. Pivo obsahuje více než 90 % vody, dále je obsažen ethanol a makromolekulární látky, jako jsou bílkoviny, sacharidy, lipidy a nukleové kyseliny. Mezi chuťové složky piva patří iso- $\alpha$ -hořké kyseliny a aromatické silice pocházející z chmele, spolu s estery, organickými kyselinami, sloučeninami obsahující síru a vicinálními diketony z kvasnic. Pěnovost piva závisí na přítomnosti oxidu uhličitého a povrchově aktivních látek, jako jsou polypeptidy pocházející ze sladu a chmelové hořké kyseliny. Barva piva je způsobena produkty Maillardovy reakce vznikající převážně během procesu hvozdění sladu. Významnými složkami jsou také polyfenolové látky, vitaminy, antioxidanty, minerální látky a oxid uhličitý [8, 9].

### **1.2.1 Minerální látky**

Hlavními zdroji minerálních látek obsažených v pivu jsou obiloviny (převážně slad), voda a chmel. V pivu se vyskytují jak kationty (vápník, hořčík, sodík a draslík), tak anionty (sírany, dusičnany, fosforečnany, chloridy a křemičitany). V menší míře je v pivu obsaženo železo, měď, zinek a mangan [10]. Pivo je také důležitým zdrojem selenu [11].

### **1.2.2 Vitaminy**

Svým vyváženým obsahem může pivo pokrýt značnou část doporučené denní dávky vitaminů. Obsahuje hlavně vitaminy skupiny B (B<sub>1</sub> – thiamin, B<sub>2</sub> – riboflavin, B<sub>3</sub> – niacin, B<sub>5</sub> – kyselina pantothenová, B<sub>6</sub> – pyridoxin, B<sub>9</sub> – kyselina listová, B<sub>12</sub> – kobalamin), dále vitamin H (biotin), kyselinu folovou a cholin. Většina z těchto vitaminů pochází ze sladu [8].

### **1.2.3 Bílkoviny**

Obsah čistých bílkovin v pivu se pohybuje kolem 3–5 g/l. Zdrojem bílkovin v pivu je slad a pivovarské kvasinky. Aminokyselinový profil zahrnuje téměř všechny esenciální aminokyseliny. Obsah aminokyselin se pohybuje v mezích 300–500 mg/l [8].

### **1.2.4 Sacharidy**

Sacharidy představují hlavní energetickou složku piva a pocházejí z obilovin, ze kterých se vyrábí slad (ječmen, pšenice, rýže nebo kukuřice). Obsah sacharidů v pivu je velké množství (3 do 61 g/l) a může pokrýt značnou část jejich doporučené denní dávky. Celkový obsah sacharidů však zaleží na druhu piva. Ležáky obsahují kolem 10–30 g/l a piva typu Ale obsahují kolem 15–60 g/l sacharidů. Nealkoholická piva vyráběná krátkým kvašením mají vyšší obsah zkvasitelných cukrů (asi 55 g/l) [8, 12].

### **1.2.5 Nukleové kyseliny**

Nukleové kyseliny zvyšují močopudnost piva, mají vliv na krevní tlak a srdeční aktivitu a jejich obsah v pivu je maximálně 1,8 mg/l [8].

### **1.2.6 Polyfenolické látky**

Pivo je nápoj bohatý na různé skupiny polyfenolických látek, jejich obsah se pohybuje okolo 100–200 mg/l [8]. Mezi nejvýznamnější polyfenoly obsažené v pivu patří flavonoidy, taniny (trísloviny), fenolové kyseliny, flavony a flavonoly. Dále je zde obsažen xanthohumol a jiné příbuzné prenylflavonoidy, které pocházejí z chmele a přispívají k výsledné chuti a aromatu piva. Mají převážně antioxidační účinky a u xanthohumolu byly prokázány také antikarcinogenní účinky [13]. Flavonoidy (převážně katechin a epikatechin) jsou zodpovědné za svíravost piva a jejich žádoucí koncentrace je v rozmezí 1–20 mg/l [13].

### **1.2.7 Hořké chmelové látky**

Mezi nejvýznamnější hořké látky, které se do piva dostávají z chmele, patří humulon a lupulon. Tyto látky se vyznačují antioxidačními a konzervačními účinky, a protože ovlivňují sekreci žluče jsou významné pro podporu trávení. Kromě toho mají sedativní až narkotické účinky [8]. Hořké látky dodávají pivu typickou hořkou a chmelovou chuť, přispívají k celkové vůni a chuti piva, zvyšují stabilitu pěny a díky své antimikrobiální aktivitě prodlužují trvanlivost konečného piva [14]. Jejich obsah v pivu dosahuje koncentrací až 40 mg/l [8].

### **1.2.8 Oxid uhličitý**

Oxid uhličitý je přirozenou součástí piva [8]. Část  $\text{CO}_2$  vzniká v procesu hlavního kvašení a část při dokvašování mladiny. Z nutričního hlediska se ale jedná o bezcennou látku. Ovlivňuje stabilitu pěny a trvanlivost piva. V pivu způsobuje tzv. říz, kdy po jeho požití má člověk v ústech štiplavý pocit. Z fyziologického hlediska má  $\text{CO}_2$  vliv na prokrvení ústní sliznice, zvýšení tvorby slin, povzbuzení produkce kyseliny chlorovodíkové v žaludeční sliznici a podporu vylučování látek odváděných močí ledvinami [8, 15].



## 2 SUROVINY NA VÝROBU PIVA

### 2.1 SLAD

Sladem se rozumí naklíčená a usušená obilná zrna, která dodávají pivu jemnou a nasládlou chuť. Základem pro výrobu sladu je voda a obiloviny, které jsou zdrojem cukru. Obiloviny jsou zdrojem škrobu, který se pomocí enzymů během sladování přeměňuje na zkvasitelné cukry a ty se následně v procesu výroby piva přeměňují na alkohol a CO<sub>2</sub> [17, 18]. Nejpoužívanější obilovinou pro výrobu sladu je sladovnický ječmen *Hordeum vulgare*. Hlavními složkami ječného zrna jsou škrob (60–65 %), bílkoviny, lipidy, vláknité složky a minerální látky. Dále obsahuje vysoký podíl enzymů, které se podílejí na odbourávání škrobu [16-18]. Pro výrobu piva se v ČR ve většině případů využívají ječné slady plzeňského typu a v menším podíle se využívají slady bavorské, karamelové nebo barvicí [17, 18].

Sladovnický ječmen musí být plně životaschopný, protože po namočení ječmene ve vodě musí nejméně 96 % obilek během několika dní vyklíčit. Vlhkost ječmene během skladování musí být kolem 13 %. Pokud by tomu tak nebylo, mohlo by dojít k nežádoucímu rozvoji mikroorganismů, které by mohly být příčinou kontaminace piva. Ječmen by měl mít také nízký obsah dusíku (do 2 %). Sladovníci dávají přednost větším baculatým obilkám, protože tato obilka obsahuje více škrobu [19].

#### 2.1.1 Druhy sladu

Různé druhy sladů se získávají vhodným výběrem odrůdy ječmene a úpravami technologie výroby během procesu máčení a klíčení ječmene (nebo jiné obiloviny). Během těchto procesů lze regulovat biosyntézu a aktivitu sladových enzymů, které působí na určité složky extraktu. Tvorba barevných a aromatických látek se reguluje v procesu hvozdění sladu, kdy se naklíčená obilná zrna suší [18]. Podle teploty sušení získává slad svou výslednou barvu. Při nižších teplotách se vyrábějí světlé slady a postupným zvyšováním teploty barva sladu tmavne. Při výrobě světlého sladu plzeňského typu není teplota sušení vyšší než 85 °C. Naopak tmavý slad se praží při teplotě až 240 °C [20].



**Obrázek 1:** Plzeňský slad [21]



**Obrázek 2:** Barevný slad [21]

Celosvětově se vyrábějí především světlé slady plzeňského typu (obrázek 1) pro výrobu světlých piv a tmavé slady (obrázek 2) mnichovského typu pro výrobu tmavých piv. Přechod mezi světlým a tmavým sladem představuje slad vídeňského typu. Dále existují ještě speciální slady, které slouží k výrobě speciálních piv. Mezi tyto slady patří slad diastatický, proteolytický, nakuřovaný, lihovarský, karamelový a barvicí slad. Při výrobě proteolytického sladu dochází ke zkvašení pomocí mléčných kultur, takže zlepšuje kyselost a pěnivost výsledného piva. Tento typ sladu se však v ČR nevyrábí. Při výrobě nakuřovaného sladu se v procesu hvozdění používá při dosušení kouř z rašeliny. Tento typ sladu se však více používá k výrobě whisky a pouze výjimečně k výrobě piva. V případě jeho využití pro výrobu piva, se ale slad dosušuje pomocí kouře z bukového dřeva nikoliv z rašeliny [18, 22, 23].

### 2.1.2 Náhražky sladu

Pro výrobu sladu v pivovarnictví se z obilovin nejvíce využívá ječmen, avšak mohou se použít i jiné suroviny, které obsahují zkvasitelné cukry nebo polysacharidy, které se na ně musí nejdříve převést. Náhražky sladu označované jako surogáty mají za úkol nahradit extrakt sladu, který se získá z levnější a dostupnější suroviny, než je sladovnický ječmen [18, 22]. Surogáty se používají buď škrobnaté nebo cukerné. Jako škrobnaté náhražky se využívají nesladové obiloviny jako je kukuřice, rýže, pšenice, oves, čirok, žito a triticales či nesladové pseudoobiloviny jako je pohanka a quinoa. Jako cukerné náhražky se používají cukerné sirupy na bázi sacharózy, které se získávají z cukrové třtiny nebo cukrové řepy [22, 24].

Tyto surogáty se používají především z ekonomických důvodů, protože jsou levnější než extrakt získaný ze sladového ječmene. Náhražky se využívají spíše při výrobě speciálních piv, nikoliv ale při výrobě značkových piv jako je např. České pivo, které musí být vyrobeno pouze ze sladovnického ječmene. V ČR se surogáty téměř nepoužívají [18, 22]. V Americe se k výrobě sladu nejčastěji používá kukuřice a proso, v Asii rýže a v Africe čirok [24].

## 2.2 CHMEL

Chmel je jedna ze tří základních surovin, která se používá při výrobě piva. Určuje jeho typické vlastnosti, protože z chmele pochází hořká a chmelová chuť. Dále se podílí na udržení stability pěny a slouží ke konzervaci piva. Předpokládá se, že chmel působí v pivu jako antiseptikum [25, 26].

Chmel otáčivý *Humulus lupulus* L. (obrázek 3) je vytrvalá, dvoudomá popínavá rostlina patřící do čeledi *Cannabinaceae* [25]. Pěstování chmele vyžaduje zvláštní klimatické podmínky, protože je to rostlina náročná na světlo, vláhu, teplotu a vlastnosti půdy. K pivovarským účelům se pěstují pouze samičí rostliny chmele evropského (*Humulus lupulus* var. *europaeus*). Chmelové odrůdy se rozdělují podle zbarvení chmelové hlávky na červeňáky, pěstované na Žatecku, a na zeleňáky pěstované v zahraničí, hlavně v Anglii, Belgii a Americe [25, 27].

V České republice je pěstování chmele státně kontrolováno a řízeno. Pro pěstování chmele jsou povoleny pouze 3 pěstitelské oblasti, ze kterých se sklizený chmel může použít pro pivovarnické účely. Jedná se o Žatecko a Ústěcko v Čechách a Tršicko u Olomouce na Moravě [27].



Obrázek 3: Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*) [28]

### 2.2.1 Chemické složení chmele

Zralé chmelové hlávky obsahují různé sekundární metabolity, jako jsou pryskyřice, silice a polyfenolické látky. Hlavními složkami chmelových pryskyřic jsou prenylové polyketidy a  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořké kyseliny [29]. Dále chmel obsahuje vodu, sacharidy, lipidy, dusíkaté látky, minerální látky a některá barviva (chlorofyl a ve stopovém množství i karotenoidy) [18].

Chmelové pryskyřice patří k nejdůležitějším složkám chmele a chmelových výrobků. Jsou nositelem typické hořké chuti a intenzita této hořkosti je ovlivněna dávkou chmele použitou v procesu chmelování, kdy se do mladiny přidává chmel. Dále podporují pивní pěnu a chrání pivo před případnou nežádoucí kontaminací mikroorganismy, které by mohly způsobit kažení piva. Za hořkost piva jsou zodpovědné především iso- $\alpha$ -hořké kyseliny, které vznikají termickou izomerací  $\alpha$ -hořkých kyselin v procesu chmelovaru. Samotné  $\alpha$ -hořké kyseliny, které jsou obsaženy v lupulinových žlázách chmelových hlávek tedy nejsou tak hořké a jejich intenzivní hořká chuť vzniká až po jejich izomerizaci (iso- $\alpha$ -hořké kyseliny jsou cca 10krát hořčejší než samotné  $\alpha$ -hořké kyseliny) [18, 19, 30].

Další skupinou látek obsažených v chmelových hlávkách jsou polyfenolické látky, které jsou přirozenými antioxidanty a přispívají k výraznosti a říznosti piva. Podílejí se na jeho stabilitě, pěnivosti a na odolnosti proti stárnutí a oxidaci. Uplatňují se v procesu technologie chmelovaru při srážení vysokomolekulárních bílkovin, kdy zabraňují vzniku zákalu piva. Mají silné antioxidační, antikarcinogenní, protimikrobiální, protitrombózní a další pozitivní vlastnosti pro lidské zdraví [31]. Polyfenoly obsažené v chmelu se dělí na fenolické kyseliny (např. kyselina ferulová), flavonoly (např. kvercetin, rutin a kempferol) a flavonoidy (např. katechin a epikatechin) [32, 31]. Další významnou složkou jsou prenylované flavonoidy, mezi které řadíme i xanthohumol [31, 33]. Xanthohumol má významné účinky proti stárnutí, cukrovce, zánětu, mikrobiální infekci a rakovině [33].

V neposlední řadě jsou pro výrobu piva důležité chmelové silice, což jsou sekundární metabolity vylučované v lupulinových žlázách chmele, které dodávají pivu chuťové a aromatické vlastnosti [34]. V procesu chmelovaru však velká část těchto látek vytěká, čímž se v pivu sníží chmelové aroma, což je pro česká piva typické. Pokud chce pivovar vyrobit pivo s výraznějším chmelovým aromatem, tak se chmel přidává ještě na konci procesu chmelovaru [17].

### 2.2.2 Chmelové výrobky

Chmel se do piva přidává v různých formách. Dříve se v pivovarnictví používaly sušené hlávky samičích rostlin chmele evropského. Dnes usušené hlávky využívá jen několik málo sládků. V současné době většina pivovarů využívá spíše chmelové výrobky (obrázek 4), protože jsou daleko stabilnější než samotné usušené chmelové hlávky a při jejich transportu a skladování nedochází k chemickým změnám, které by mohly zhoršit jejich kvalitu [27].

Mezi chmelové výrobky patří např. mletý a granulovaný chmel. Mletý chmel se vyrábí tak, že se hlávkový chmel usuší, rozdrťí na velikost částic pod 2 mm a následně se lisuje a balí pod inertní atmosférou do obalů nepropouštějící vlhkost, vzduch a světlo. Granulovaný (peletovaný) chmel je vlastně mletý chmel, který je upravený ve vysokotlakých granulátorech do tvaru granulí či pelet a stejně balený jako mletý chmel se dále distribuuje. Dále se využívají různé chmelové extrakty a izoextrakty, které se využívají k tzv. studenému chmelení až do hotového piva [27].



Obrázek 4: Chmelové výrobky [35]

## 2.3 PIVOVARSKÁ VODA

Voda je v pivovarnictví jednou z nejdůležitějších surovin, protože se jí při výrobě spotřebuje objemově největší množství a tvoří cca 90 % piva [9, 17, 18]. Největší část vody se spotřebuje ve sladovnách k máčení ječmene, v pivovarech k mytí a čištění (hlavně ve sklepech, spilce a stáčírňách), dále k chlazení a v kotelnách. Na její kvalitě závisí kvalita sladu i kvalita výsledného piva. V pivovarnictví se rozlišují 3 druhy vod [17, 18].

1. **Varná voda**, která se používá pro přípravu piva jako jedna ze základních surovin. Svými vlastnostmi z hlediska zdravotní a hygienické nezávadnosti musí splňovat požadavky na pitnou vodu, protože na vlastnostech vody závisí i průběh výroby a kvalita piva [18].
2. **Mycí a sterilizační voda** se používá k mytí a sterilizaci. Musí být bez jakýkoliv mikroorganismů, chemických kontaminantů a nesmí zapáchat [18].
3. **Provozní voda** se používá pro provozní účely. Jedná se o vodu, která se přidává např. do parních generátorů nebo při chlazení piva [18].

## 2.4 PIVOVARSKÉ KVASINKY

Pivovarské kvasinky patří do čeledi *Saccharomycetaceae* a rodu *Saccharomyces* (tabulka 1). Podle pivovarské mikrobiologické společnosti European Brewery Convention (EBC) jsou pivovarské kvasinky definovány jako kulturní kvasinky používané k produkci spodně nebo svrchně kvašených piv [18].

**Tabulka 1:** Taxonomie pivovarských kvasinek [18]

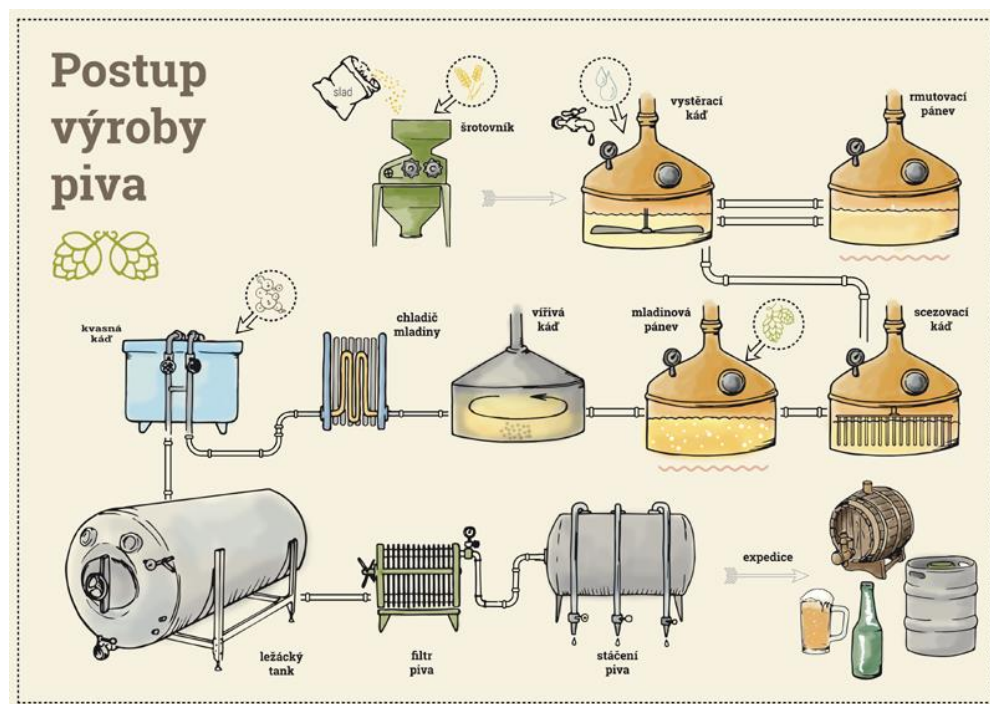
Říše	Fungi
Kmen	Ascomycotina
Podkmen	Saccharomycotina
Třída	Saccharomycetes
Řád	Saccharomycetales
Čeleď	<i>Saccharomycetaceae</i>
Rod	<i>Saccharomyces</i>

Kvasinky jsou jednou z nejdůležitějších ingrediencí pro výrobu piva, protože bez jejich použití by nevznikl kvašený nápoj [20, 36]. Za anaerobních podmínek přeměňují zkvasitelné cukry obsažené v mladině na ethanol a oxid uhličitý. Dále produkují i řadu nezbytných žádoucích látek, které přispívají k celkové chuti piva [37]. Jedná se o různé těkavé a netěkavé složky, které jsou v pivu obsažené většinou jen ve stopovém množství, ale přispívají k celkové chuti piva [36].

Při kvašení piva se využívají dva druhy pivovarských kvasinek. Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae carlsbergensis* nebo *Saccharomyces uvarum*, které slouží pro výrobu piva typu ležáků a svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* využívané pro výrobu piva typu „ale“, „porter“, „stout“. Tyto kvasinky se vzájemně liší svými vlastnostmi, což se odráží v jejich technologickém použití. Spodní pivovarské kvasinky na konci kvašení sedimentují na dno kvasných nádob. Svrchní kvasinky jsou naopak po skončení kvašení vynášeny vznikajícím CO<sub>2</sub>, který vzniká během fermentace na povrch, a vytvářejí tzv. kvasničnou deku. Dále se liší použitou teplotou během kvašení, jak již bylo popsáno v kapitole 1.1 [18, 20, 36].

### 3 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA

Vaření piva je složitý proces, zahrnuje zpracování čtyř surovin, jako je ječný slad, pivovarská voda, chmel nebo jiné chmelové výrobky a pivovarské kvasinky. Pivo vzniká řízeným kvašením neboli fermentací cukerného roztoku, který se vaří s chmelem. Vlastní proces vaření piva je uveden na obrázku 5 [20, 26].



Obrázek 5: Schéma výroby piva [38]

#### 3.1 VÝROBA SLADU

Hlavním cílem sladování je aktivovat enzymy v zrně, které rozštěpí škrob a další látky obsažené v zrně během procesu rmutování. Škrob se rozštěpí na jednoduché sacharidy, které jsou nezbytnými látkami v procesu kvašení, kdy dochází k jejich přeměně na ethanol a  $\text{CO}_2$  [39].

Před samotným sladováním musí být surový ječmen zbaven veškerých nečistot a příměsí, jako jsou např. kamínky, písek, prach, kovové částice, cizí zrna, pluchy, úlomky zrn a jiných dalších nežádoucích látek. Dále se ječmen třídí podle velikosti zrn, protože zrna různých velikostí absorbují vlhkost různou rychlostí. Je tedy důležité, aby zpracovávaná zrna ječmene měla stejnou velikost, čímž se usnadní následující postup máčení, a zlepší se tím i kvalita sladu. Po důkladném vyčištění v různých separátorech a třídících strojích se ječmen suší na obsah vlhkosti 12 % a skladuje se na půdách či v silech [25, 40].



Samotný proces sladování se skládá ze tří technologických kroků, a to máčení, klíčení a hvozďení [17]. Máčení je proces, při kterém je surový ječmen zbavený všech nečistot ponořen do vody. Cílem procesu máčení je zvýšit obsah vody v ječném zrně z původních 12-15 % na cca 42-48 % [17, 22], čímž dochází k zahájení enzymových reakcí a klíčení zrna. Důležitá je v tomto procesu kvalita vody, která musí splňovat požadavky na pitnou vodu [25]. Máčení ječmene probíhá v celonerezových náduvnicích s kónickým dnem, které jsou opatřené přívodem a výstupem vody, vypouštěcími ventily, odvzdušňovacím otvorem pro odvod CO<sub>2</sub> a přívodem vzduchu pro provzdušňování. V průběhu máčení se musí provádět vzdušné přestávky, kdy se vypustí voda a zrno se provzdušňuje. Kyslík je zde důležitý pro klíčení zrna. Také se musí odsávat CO<sub>2</sub>, který vzniká při dýchání zrna [22, 25].

Po dosažení potřebného obsahu vody dochází ke klíčení, jehož cílem je vyrobit zelený slad [25]. Během klíčení ječmene se aktivují 3 důležité skupiny enzymů: amylázy, proteázy a β-glukanázy. Každý z těchto enzymů má během sladování a následného vaření piva důležitou funkci. Amylázy přeměňují škrob, který je přítomen v endospermu zrna na fermentované cukry, proteázy rozkládají proteiny a uvolňují volný aminodusík a β-glukanázy degradují buněčnou stěnu endospermu, čímž umožní přístup dalších enzymů k endospermu [39]. Dříve se klíčení provádělo na humnech, což jsou prostorné větrané místnosti, většinou sklepy. Ječmen byl zde rozestřen v nízkých vrstvách (cca 20–30 cm) [17], které se musely v průběhu klíčení provětrávat pravidelným přehazováním hromad, neboť během klíčení vzniká metabolické teplo a CO<sub>2</sub>, který brzdí aerobní dýchání a mohl by celý proces klíčení i úplně zastavit [17, 41]. Tento způsob však vyžadoval hodně lidské práce, a proto se dnes už téměř nevyužívá. V současné době většina pivovarů využívá moderní systémy, kde klíčení probíhá v klíčících skříních, z nichž nejrozšířenější je Saladinova skříň. Celý proces klíčení je zde plně automatický, jak přísun kyslíku, který je pro klíčení zrna nezbytný, tak odstraňování CO<sub>2</sub>. Pro udržení optimální teploty během procesu klíčení je prostor klimatizován [17, 25].

Poslední fází při výrobě sladu je sušení neboli hvozďení zeleného sladu. Cílem hvozďení je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu. Během sušení dochází ke snížení obsahu vody pod 4 % a zastavení chemických a biologických transformací, ke kterým dochází během klíčení. Dále zde vznikají vonné, chuťové a barevné látky dodávající sladu charakteristickou barvu a chuť, která je typická pro požadovaný typ sladu. Sušení probíhá na hvozdech, které mohou být jednolískové, dvoulískové nebo třílískové. Dnes se převážně využívají vysokovýkonné jednolískové hvozdy. Teplota sušícího vzduchu se během sušení postupně zvyšuje, neboť vlhký zelený slad je velmi citlivý na

vysokou teplotu. Teplota použitá během finální fáze sušení ovlivňuje výslednou barvu a chuť sladu a je typická pro daný druh, protože čím vyšší teplota se použije, tím tmavší slad se získá. Světlé slady se suší při teplotách do 85 °C, např. barvicí slady se praží při teplotách až 240 °C a tím získají svoji typickou tmavou barvu [17, 18, 25, 40].

Po sušení se ze sladu na odkličovače odstraňují kořínky (sladový květ), poškozená zrna a slad se leští. Sladový květ získaný jako odpad při výrobě sladu se využívá jako krmivo a ve fermentačních technologiích. Vyrobený slad by měl být před použitím ve varně skladován nejméně čtyři týdny [17, 25].

## **3.2 PROCES VÝROBY PIVA**

Výroba piva se dělí do tří výrobních úseků, zahrnující výrobu a kvašení mladiny a poté závěrečné úpravy a stáčení piva do přepravních obalů [17].

### **3.2.1 VÝROBA MLADINY**

Mladina se připravuje ve varně ze sladu, vody a chmele nebo jiných chmelových výrobků. Cílem výroby mladiny je převést do roztoku extraktivní látky ze sladu a chmele. Příprava mladiny se skládá z několika technologických kroků, a to šrotování sladu, vystírání, rmutování, scezování sladiny, chmelovaru a čištění a zchlazování mladiny [18].

#### **3.2.1.1 Šrotování sladu**

Šrotování je mechanický proces, při kterém dochází k rozemletí sladových zrn a zpřístupnění endospermu pro fyzikálně-chemické a enzymové reakce probíhající ve varně při výrobě mladiny. Cílem šrotování je dokonalé vymletí endospermu sladových zrn, čímž se zpřístupní extraktivní látky sladu, které přecházejí do mladiny. Šrotování probíhá ve válcových šrotovnicích, které se otáčejí stejnou nebo různou rychlostí vůči sobě. Je důležité, aby při šrotování nedošlo k porušení obalových vrstev (pluch), protože tyto vrstvy jsou tvořeny nezkvasitelnými polysacharidy (celulosa a hemicelulosa). Dále obsahují třísloviny, hořké sloučeniny a barviva, které by mohly mít nepříznivý vliv na chuť piva. Aby nedošlo k porušení těchto obalových vrstev, tak se před samotným šrotováním sladová zrna navlhčí vlažnou vodou nebo párou, tím dojde ke zvlhčení vnějších obalových vrstev zrna a zvýšení jejich pružnosti a nedojde k jejich poškození během mletí [17, 18, 25]. Kvalita mletí je velmi důležitá, protože ovlivňuje následující procesy výroby mladiny a má tedy vliv i na výslednou kvalitu hotového piva [42].

### 3.2.1.2 Vystírání

Při vystírání se ve vystírací kádi smíchá sladový šrot s vlažnou varní vodou (hlavní nálev). Během vystírání dochází ke změkčení sladových zrn a do roztoku přechází část látek obsažených ve sladu, které jsou rozpustné ve vodě. Aby došlo k převedení maximálního množství extraktivních látek ze sladu je důležitý následující proces, a to rmutování, kdy působením sladových enzymů dochází ke štěpení nerozpustných vysokomolekulárních látek na látky rozpustné ve vodě. Dále dochází k bobtnání škrobových zrn a k jejich degradaci vlivem proteolytických enzymů [18, 43].

Vystírání může být buď studené nebo teplé a záleží na kvalitě zpracovávaného sladu, postupu rmutování, zařízení varní soupravy a na požadavcích kvality mladiny. Při studené vystírce se používá voda o teplotě pod 20 °C, zatímco při teplé vystírce je teplota použité vody 35 až 38 °C. Studené vystírání se používá pro špatně rozluštěné slady, zatímco u dobře rozluštěných sladů se používá teplá vystírka. Pro přelustěné slady se využívá horké vystírání s vodou o teplotě 50 až 62 °C. Po vystírání následuje přidavek druhého podílu vody o teplotě cca 80 °C a tím se provede zapárka [18, 43].

### 3.2.1.3 Rmutování

Rmutování je proces, při kterém sladové enzymy ( $\alpha$ - a  $\beta$ - amylázy) rozkládají škrob obsažený ve sladu na jednoduché zkvasitelné cukry, dochází k tzv. zcukření škrobu [18, 44]. Cílem rmutování je rozštěpit a převést optimální podíl extraktu ze sladu do roztoku [18]. Během rmutování dochází nejenom k přeměně škrobu na fermentované cukry, ale dochází i k hydrolýze bílkovin na volné aminokyseliny a k degradaci buněčné stěny ječného zrna. Rmutování je pravděpodobně klíčovým krokem při výrobě piva, protože určuje složení mladiny, čímž podstatně ovlivňuje následné kvašení kvasinkami a konečnou kvalitu výsledného piva [44].

Rmutování probíhá ve rmutovací kádi, kde je sladový šrot smíchaný s teplou vodou. Tato směs se nazývá rmut a udržuje se při specifických teplotách a pH, aby byla zajištěna správná enzymatická přeměna škrobu a bílkovin. Počáteční teplota rmutování je 45 °C, při které se aktivují proteázy a degradují proteiny na krátké peptidy a aminokyseliny, které budou tvořit hlavní zdroj dusíku pro kvasinky během fermentace. Rmut se pak zahřeje na 62–64 °C a při této teplotě dojde ke ztekucení škrobu, čímž se škrob stane přístupným pro amylázy.  $\beta$ -amylázy při této teplotě štěpí amylozu a amylopektin na maltózu. Následně se rmut zahřeje na 72 °C, tím dojde k působení  $\alpha$ -amyláz, které štěpí amylozu na oligosacharidy, dále pak až

na maltózu a glukózu. Nakonec se teplota rmutu zvýší na 78 °C, čímž se zastaví téměř veškerá enzymatická aktivita a dojde k zastavení procesu rmutování [39, 43].

#### **3.2.1.4 Scezování sladiny**

Separace sladiny je v podstatě proces filtrace [45]. Cílem scezování je oddělit zbytky sladového šrotu (mláto) od roztoku (sladina), do kterého byly v procesu rmutování převedeny všechny cenné pivovarské látky [17, 42]. Mláto představuje pevný podíl, který obsahuje slupky, semena a nerozpustný materiál. Sladina je sladký čirý zlatavý roztok, který obsahuje extrahované látky ze sladu, a to nejen cukerné látky, ale i bílkoviny, některé vitaminy, přírodní antioxidanty a barevné látky [18, 42].

Scezování se provádí ve dvou krocích buď ve scezovací kádi nebo se používá sladinový filtr. Nejdříve se oddělí tzv. předek, což je roztok extraktu sladu. Poté následuje vyslazování, při kterém dochází k promývání mláta horkou vodou (75–78 °C), čímž se získá zředěná sladina (výstřelek). Promývání mláta se provádí 2–3krát. Následně se společně smíchá předek s výstřelkem v mladinové pánvi a takto získaná sladina se dále využívá v dalších technologických procesech. Oddělené mláto se používá jako krmivo [17, 18].

#### **3.2.1.5 Chmelovar**

V procesu chmelovaru se sladina získaná scezováním vaří společně s chmelem. Chmelovar probíhá v nádobě nazývané mladinová pánev, vyrobené z nerezové oceli. Cílem chmelovaru je převedení hořkých látek chmele do mladiny, které dodávají pivu charakteristickou hořkou a chmelovou chuť. Během vaření dochází ke sterilizaci sladiny a zastavení veškerých enzymatických reakcí. Získaný produkt se nazývá mladina, která se po ochlazení dále fermentuje [18, 46].

Během varu probíhá izomerace  $\alpha$ -hořkých kyselin za vzniku izo- $\alpha$ -hořkých kyselin, které způsobují hořkost piva. Dále zde probíhá Maillardova reakce, při které se tvoří barevné a aromatické látky, které během vaření přecházejí z chmele do mladiny. Při chmelovaru dochází k odpaření přebytečné vody, čímž se dosáhne požadovaného extraktu mladiny neboli stupňovitosti piva, která je charakteristická pro daný typ vyráběného piva. Během vaření se z mladiny odpaří i těkavé látky, které jsou v mladině nežádoucí. Jedná se např. o chmelové silice, karbonylové sloučeniny a dimethylsulfid. Díky varu se vysrážejí bílkoviny, které se odstraní v dalším technologickém postupu a následně skončí ve chmelovém mlátě. Pokud by zde nedošlo k dostatečnému vysrážení bílkovin, mohlo by to mít za následek to, že by ke

srážení došlo až při samotném kvašení piva, což by negativně ovlivňovalo stabilitu piva a způsobovalo nežádoucí bílkovinnou hořkost [18, 25, 46].

Chmelení se provádí v několika dávkách, nejčastěji ve dvou nebo ve třech dávkách. Pokud se chmel přidává kvůli aromatu, je nutné ho přidávat až na konci chmelovaru, protože by většina aromatických látek varem vytěkala. Proto se většinou první dávka chmele přidává pro hořčení na začátku chmelovaru, druhá dávka se aplikuje přibližně v polovině chmelovaru a poslední dávka až ke konci chmelovaru [17, 46].

### **3.2.1.6 Čištění a zchlazování mladiny**

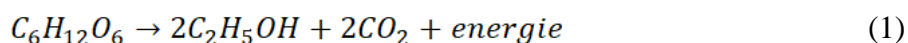
Po ukončení chmelovaru se vařená mladina přenesse do vířivé kádě, kde se musí od mladiny oddělit chmelové mláto (nerozpustné složky chmele) a kaly, vzniklé při srážení bílkovin během procesu vaření. Pokud se používá hlávkový chmel, tak se zbytky hlávek oddělují pomocí cízů. Oddělené chmelové mláto se likviduje jako odpad [18, 46, 47].

Rozlišujeme hrubé (horké kaly) a jemné kaly (chladové kaly). Hrubé kaly se vylučují při vyšších teplotách, proto horké kaly a obsahují převážně složitější bílkoviny, které se nerozložily během rmutování a varem při chmelovaru došlo k jejich teplotní denuraci. Kromě bílkovin obsahují také polyfenoly a hořké látky. Tyto kaly musí být z mladiny dokonale odstraněny, protože způsobují problémy během kvašení a také zhoršují pěnivost a chuť. Jemné kaly jsou naopak tvořeny menšími a jednoduššími bílkoviny, které se srážejí až při nižších teplotách (pod 80 °C) a dále obsahují cukry a polyfenoly. Větší část těchto kalů se odstraní společně s hrubými kaly, ale protože se z mladiny obtížně odstraňují, určité množství zůstane ve vířivé kádi a po zakvašení jsou poté vyneseny do kvasné deky, která se poté sbírá. Tyto kaly by mohly způsobit bílkovinnou hořkost [17, 46].

Nakonec se mladina musí před zakvašením ochladit na zákvasnou teplotu, přičemž teplota ochlazení závisí na druhu vyráběného piva. Po provzdušnění kyslíkem nezbytným pro činnost kvasinek se převede do fermentoru, kde se k mladině přidají kvasinky [47].

### 3.2.2 KVAŠENÍ MLADINY

Kvašení neboli fermentace je proces, při kterém kvasinky přeměňují zkvasitelné cukry obsažené v mladině na ethanol a oxid uhličitý (rovnice 1). Během fermentace vznikají i další sekundární metabolity, které společně s ethanolem určují chuť a vůni hotového produktu [17, 18, 39]. Pro výrobu Českého piva je typická technologie spodního kvašení. Klasické kvašení mladiny je rozděleno na hlavní kvašení a dokvašování [17].



#### 3.2.2.1 Hlavní kvašení

Cílem hlavního kvašení je neúplné zkvašení cukernatých látek extraktu mladiny na ethanol, oxid uhličitý a další fermentační produkty, které přispívají k výsledné kvalitě piva. Dalším cílem je pomnožení kvasničného zákvasu, který se poté znovu využívá při dalším kvašení [18, 48]. Kvašení probíhá za anaerobních podmínek, tedy bez přístupu kyslíku. Konečným produktem hlavního kvašení je mladé pivo [18].

Během kvašení vznikají i sensoricky aktivní vedlejší produkty, které se podílejí na výsledné chuti a aromatu finálního produktu. Patří sem např.: [17, 18, 25]

- Vyšší alkoholy (n-propanol, iso-butanol, isoamylalkohol) – představují největší podíl sloučenin přispívajících k celkovému charakteru piva
- Estery (ethylacetát, amylacetát, methylacetát) – v pivu představují žádoucí aromatické sloučeniny, které dodávají pivu vůni
- Aldehydy, z nichž nejdůležitější je acetaldehyd – tvoří se na začátku fermentace a později je odbouráván
- Vicinální diketony (diacetyl a 2,3-pentadion) – jsou vedlejší nežádoucí aromatické sloučeniny, které způsobují v pivu nežádoucí máselnou chuť
- Glycerol – vzniká jako vedlejší produkt během glykolýzy, jeho koncentrace závisí na množství fermentovaných cukrů
- Sírné sloučeniny (sirovodík, dimethylsulfid, thioly) – způsobují v pivu nežádoucí a nepříjemné chutě a aromata

Tradiční způsob hlavního kvašení probíhá v otevřených kádích umístěných ve spilkách. Spilkou nazýváme část pivovaru (většinou se jedná o sklepní prostory), která musí být dobře větratelná (aby se zde nehromadil vznikající CO<sub>2</sub>) a dobře chlazená (5–10 °C) [17].

V průběhu hlavního kvašení probíhá několik fází. Nejprve probíhá zaprašování a odrážení, kdy se na hladině zakvašené mladiny tvoří bílá pěna, která postupně houstne až pokryje celou mladinu. Při další fázi kvašení dochází na povrchu mladiny k tvorbě nízkých bílých kroužků. Jedná se o fázi nejintenzivnějšího kvašení, při kterém dochází k maximálnímu vývinu CO<sub>2</sub>. Tento vznikající CO<sub>2</sub> vyplavuje na povrch pěny nečistoty a kroužky pěny se postupně zbarvují hnědě právě díky jemným kalům, které jsou vynášeny z kvasícího média. Poslední fází hlavního kvašení je propadání deky a sedimentace kvasinek. Kvasinky sedimentují na dno kvasné kádě a na povrchu prokvašené mladiny zůstává pouze vrstva tmavé pěny, která obsahuje vyloučené kaly, které obarvují pěnu. Tato pěna se musí co nejrychleji odstranit, protože by mohla negativně ovlivnit výslednou hořkost piva. Po ukončení této fáze končí hlavní kvašení [18].

Hlavní kvašení trvá 6–10 dní v závislosti na druhu vyráběného piva. Po stažení tmavé vrstvy pěny z hladiny se mladé pivo přečerpává do ležáckých tanků (dozrácích nádrží), kde se skladuje při nízkých teplotách (-1 °C až 5 °C) několik dní nebo týdnů. Kvasinky usazené na dně kvasné kádě se sbírají, propírají studenou vodou a nasazují se znovu na zakvašení mladiny (mohou být použity 3–4krát) [17, 39].

### **3.2.2.2 Dokvašování a zrání**

Při dokvašování a zrání (ležení) mladého piva dochází k pomalému zkvašování zbývajících zkvasitelných cukrů při nízkých teplotách, k vyčeření piva a k nasycení piva vznikajícím CO<sub>2</sub> pod tlakem. Dotváří se zde celková chuť piva [18].

Tradiční dokvašování a zrání probíhá v ležáckých sklepech v uzavřených tancích po dobu 1-10 týdnů v závislosti na typu piva a koncentraci mladiny při teplotě -2 až 3 °C. U speciálních piv se doba zvyšuje až na několik měsíců [17].

### **3.2.2.3 Moderní technologie kvašení**

V současnosti se zejména ve velkých pivovarech využívá moderní technologie, kdy se hlavní kvašení i dokvašování provádí v cylindrokónických tancích (CKT). CKT jsou velké uzavřené válcové nádoby s kónickým dnem, vyrobené z nerezové oceli, které jsou vybaveny chladícím zařízením. Kvašení v tancích probíhá buď jednofázově nebo dvoufázově. Jednofázové

kvašení spočívá v tom, že jak hlavní kvašení, tak dokvašování probíhá v jednom tanku. Při dvoufázovém kvašení probíhá hlavní kvašení v jednom tanku a po skončení se mladé pivo přečerpá do dokvašovacího CKT, nebo se využívají ležácké tanky z klasické technologie. Výhodou této technologie je jednoduchá obsluha a automatizace celého procesu kvašení, včetně sanitačního procesu. CKT mohou být umístěny venku nebo uvnitř pivovaru [17, 18].

### **3.2.3 ZÁVĚREČNÉ ÚPRAVY**

Pivo se po dokvašení a zrání považuje z organoleptických vlastností za hotové. Pro uspokojení spotřebitele na vzhled a trvanlivost se provádějí závěrečné úpravy piva [17].

#### **3.2.3.1 Filtrace**

Cílem filtrace je z hotového piva odstranit nežádoucí látky (bílkoviny, kondenzované polyfenoly, chmelové pryskyřice atd.), které v pivu způsobují zákal. Dále se odstraňují zbytky neusazených kvasinek a jiných mikroorganismů. Filtrací se získá čiré pivo se zvýšenou biologickou a chemicko-fyzikální stabilitou [17, 18, 25].

#### **3.2.3.2 Stabilizace**

Stabilizace piva se provádí z důvodu prodloužení trvanlivosti a zajištění koloidní stability piva [17, 18]. Aby se zabránilo vzniku koloidních zákalů, musí se z piva odstranit prekurzory, které zákal způsobují. Odstranění těchto prekurzorů se dá zajistit různými stabilizačními prostředky, které se do piva přidávají. Jedná se např. o proteolytické enzymy, které štěpí vysokomolekulární látky, taniny, které reagují s nukleofilními skupinami bílkovin (SH-, NH<sub>2</sub>-) za tvorby tanin-proteinového komplexu, antioxidační prostředky, které mají za úkol zmírňovat vliv kyslíku obsaženého v pivu či adsorbenty dusíkatých a polyfenolových látek, které jsou dnes nejvíce používány. Pro adsorpci bílkovin se nejvíce využívají křemičité gely, které se dodávají buď ve formě suchých gelů (tzv. xerogely), anebo v hydratované formě (tzv. hydrogely). Jako adsorbent polyfenolů se využívá polyvinylpyrrolidon a další látky založené na tomto materiálu. Stabilizátory se do piva přidávají nejčastěji před koncem dokvašování, aby se případně vyloučené látky odstranily při filtraci [49].



### **3.2.3.3 Pasterace**

Pasterace je tepelné ošetření piva sloužící k prodloužení trvanlivosti a zajištění mikrobiologické stability piva. Provedení pasterace záleží na tom, do jakého obalu se plní. Pivo, které se plní do lahví nebo plechovek, se pasteruje přímo v obalu po naplnění. Pokud se pivo plní do tanků nebo sudů, tak k pasteraci dochází ještě před naplněním [18].

Pasterace se provádí v tunelových nebo průtokových pastérech. Tunelový pastér představuje tunel, ve kterém prochází balené pivo po pohybujiícím se pásu, a obaly se stříkají teplou vodou o rostoucí teplotě, tak aby se pivo zahřálo na pasterační teplotu (61–62 °C). Doba výdrže pasterační teploty je asi 20 minut. Poté jsou obaly ochlazeny studenou vodou a vysušeny. Při průtokové pasteraci se jedná o krátkodobé zahřátí malého množství piva na vyšší teplotu (68–70 °C) po dobu několika sekund (30 až 40 sekund) a poté se pivo ochladí. Provádí se to v průtokovém pastéru, což je deskový výměník tepla, kdy se pivo zahřívá a následně ochlazuje v trubkách [18, 25].

### **3.2.3.4 Stáčení**

Konečnou fází výroby piva je jeho stáčení do přepravních obalů. Stáčení se provádí ve stáčírkách, které jsou součástí pivovaru. Pivo se může stáčet do sudů, lahví (plastových nebo skleněných) a plechovek. Plnění se musí provádět za přetlaku, aby se zamezilo nadměrnému pění piva. Před samotným plněním dochází ještě k dezinfekci obalů, aby se zabránilo případné nežádoucí kontaminaci [18].

## 4 ANALÝZA PIVA

Pivo je komplexní nápoj obsahující více než 3 000 různých chemických sloučenin. Obsahuje především sacharidy, proteiny, ionty, různé mikroorganismy, organické kyseliny, polyfenolické látky, hořké látky a mnoho dalších významných látek [50]. Většina těchto látek obsažených v pivu pochází buď z výchozích surovin, tedy ze sladu, chmele a vody, nebo vznikají jako vedlejší produkty metabolismu kvasinek během kvašení [51]. Pivo se během skladování stává ještě složitější matricí, protože časem může podléhat různým chemickým změnám, které negativně ovlivňují výslednou chuť, vůni, vzhled a celkovou kvalitu. Udržet tedy celkovou kvalitu piva po celou dobu jeho životnosti je velmi náročný úkol [50].

Pro stanovení látek obsažených v pivu se často využívá plynová a kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektroskopie, spektrofotometrie či další analytické techniky [50].

### 4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v dnešní době velmi často využívána pro analýzu biologicky aktivních látek v různých matricích [52]. Jedná se o separační techniku, kdy se vzorek separuje mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá je stacionární. Nejčastěji se využívá HPLC v systémech s obrácenými fázemi, kde jako mobilní fáze se používá vodný roztok organického rozpouštědla (např. metanol nebo acetonitril) a stacionární fáze je zpravidla chemicky modifikovaný silikagel nepolární uhlovodíkovou skupinou (alkyl nebo aryl). Nejčastěji se využívá chemicky modifikovaný oktadecylsilikagel (C18) [53].

Použití HPLC má několik výhod. Je téměř univerzální, protože se dá použít ke stanovení většiny látek. Poskytuje poměrně přesné výsledky ( $\pm 0,5\%$ ). Je součástí téměř všech laboratoří [52].

## 4.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je metoda založená na měření absorpce elektromagnetického záření v ultrafialové (200–380 nm) a viditelné (380–780 nm) oblasti. Slouží ke stanovení koncentrace analyzované látky obsažené ve vzorku na základě měření jeho absorpce při dané vlnové délce [54]. Vztah mezi absorbancí a koncentrací vyjadřuje Lambert-Beerův zákon (rovnice 2), který říká, že absorbance závisí na molárním absorpčním koeficientu sledované látky při dané vlnové délce ( $\epsilon$ ), na tloušťce vrstvy, kterou paprsek prochází (délka květy,  $l$ ) a na koncentraci sledované látky v roztoku ( $c$ ) [54].

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

## 4.3 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou důležité sloučeniny, které jsou zdraví prospěšné, protože chrání buňky před oxidačním stresem, který vzniká nadprodukcí reaktivních forem kyslíku nebo dusíku. Právě antioxidanty neutralizují škodlivé volné radikály a chrání tělo před oxidačním poškozením. Látky s antioxidačními účinky, které jsou obsaženy v pivu pocházejí především ze sladu a chmele [55, 56] a řadíme mezi ně především fenolické sloučeniny, melanoidiny, oxid siřičitý, vitaminy (B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, vitamin C) a selen. Obsah těchto látek v pivu závisí na genetických a zemědělských faktorech ovlivňující suroviny, ze kterých se pivo vyrábí a také technologickým postupem použitým při vaření piva. Největší antioxidační účinky mají fenolické sloučeniny pocházející z rostlinných zdrojů (ječmen a chmel), dále jsou významné vitaminy a melanoidiny, které vznikají Maillardovou reakcí během procesu hvozdní, rmutování a vaření mladiny [57].

### 4.3.1 Antioxidační kapacita

Antioxidační kapacita piva závisí především na obsahu antioxidantů obsažených ve sladu a chmelu a také na technologických postupech použitých při výrobě piva. Obsah antioxidantů ovlivňuje především vaření mladiny, sladování, teplota a pH při rmutování. V neposlední řadě jsou antioxidanty ovlivněny odrudou použitého ječmene a chmele a dále kvasinkami použitými při kvašení mladiny. Tmavá piva mají zpravidla vyšší antioxidační kapacitu než světlá piva z důvodu použití speciálních sladů (karamelové slady), které antioxidační kapacitu zvyšují [55].

Ke stanovení antioxidační kapacity v pivu se využívají různé chemické a fyzikální metody [58]. Chemické metody jsou založeny na použití činidel, které poskytují s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání antioxidanty obsažené ve vzorku [58, 59]. Měří se tedy intenzita úbytku zbarvení, která se nejčastěji měří spektrofotometricky. Fyzikální metody jsou založeny na sledování změn fyzikálních vlastností, které reakci provázejí [59].

#### **4.3.1.1 Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH**

Ke stanovení antioxidační aktivity piv se využívá mnoho spektrofotometrických metod, mezi které se řadí i velmi jednoduchá DPPH metoda. Tato metoda využívá reakce antioxidantů se stabilním radikálem 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem (DPPH) [60, 61, 63], který je jedním z mála stabilních dusíkatých organických radikálů. Díky přítomnosti dusíku v molekule je jeho methanolický roztok fialově zbarvený, a právě přítomností antioxidantů obsažených ve vzorku piva dochází k jeho postupnému odbarvování. Intenzita úbytku zbarvení měřená při 515 nm je poté přímo úměrná koncentraci antioxidantů obsažených v pivu a pomocí kalibrační křivky je zpravidla přepočítána na antioxidační aktivitu odpovídající ekvivalentnímu množství standardu Troloxu [62]. Tato metoda byla např. využita při stanovení antioxidační kapacity u světlých a tmavých piv, přičemž tmavá piva vykazovala vyšší antioxidační kapacitu než piva světlá [13]. Vyšší antioxidační kapacita u tmavých piv je pravděpodobně způsobena použitím tmavých, karamelových, popřípadě barevných sladů, ze kterých vznikají při Maillardově reakci látky zvyšující antioxidační kapacitu [55]. Z tohoto poznatku se dá tedy usoudit, že tmavá piva jsou pro celkové zdraví člověka lepší, protože obsahují větší množství antioxidantů než piva světlá [13].

#### **4.3.1.2 Stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS**

Tato metoda je založena na odbarvení modrozeleného roztoku radikál kationtu ABTS (kyselina (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátová) vlivem přídavku antioxidantu. ABTS radikál kation vzniká oxidací ABTS pomocí  $K_2S_2O_8$ ,  $H_2O_2$  v přítomnosti peroxidasy,  $MnO_2$  či AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) [58, 63]. Antioxidanty působí jako redukční činidlo a redukují vzniklý  $ABTS^{*+}$ , čímž dochází k jeho postupnému odbarvování až se vrátí zpět do své stabilní bezbarvé formy ABTS [62]. Úbytek zbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 600–750 nm [58].

### 4.3.1.3 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je metoda založená na schopnosti antioxidantů redukovat bezbarvé železité komplexy, např. s TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) na barevné železnaté komplexy. Nevýhoda této metody spočívá v tom, že reakce musí probíhat při nízké hodnotě pH (3,6) [58, 60, 62, 63].

## 4.4 POLYFENOLICKÉ LÁTKY

Polyfenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin, které se do piva dostávají ze sladu a chmele. Přibližně 70 až 80 % polyfenolických látek pochází ze sladu a 20 až 30 % z chmele [56]. Jejich obsah závisí na druhu piva a množství sladu a chmele použitého při výrobě. Kromě toho během procesu vaření piva a fermentace procházejí některé látky chemickými změnami, jako je dekarboxylace a izomerizace [64]. Polyfenolické látky ovlivňují sensorické vlastnosti piva jako je chuť, plnost a svíravost. Dále se podílí na koloidní stabilitě piva a jejich reakcí se zákalotvornými bílkovinami vznikají polyfenolbílkovinné komplexy, které způsobují zákal piva [65]. Jsou významnými přírodními antioxidanty, a proto hrají důležitou roli při snižování množství volných radikálů přítomných v lidském těle. Potravinou bohaté na polyfenolické látky mohou snížit možnost vzniku mnoha civilizačních chorob, jako je arterioskleróza, rakovina a neurodegenerativní onemocnění [56].

Mezi nejvýznamnější polyfenolické látky obsažené v pivu, které jsou zodpovědné za chuť piva a jeho fyzikální stabilitu patří prenylflavonoidy, flavanony, flavanoly a fenolové kyseliny [66]. Dále jsou v pivu obsaženy flavonoidy, stilbeny, kumariny, lignany, třísloviny, chalkony, anthokyanidy a isoflavonoidy [55]. Kondenzované struktury flavonolů a flavononů se podílí na vzniku koloidních zákalů v pivu a mají vliv na zkrácení trvanlivost piva [66]. Prenylflavonoidy patří do třídy flavonoidů, z nichž nejvýznamnější jsou fytoestrogeny, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin a xanthohumol. U xanthohumolu byly prokázány sedativní, protizánětlivé a antimikrobiální vlastnosti [67].

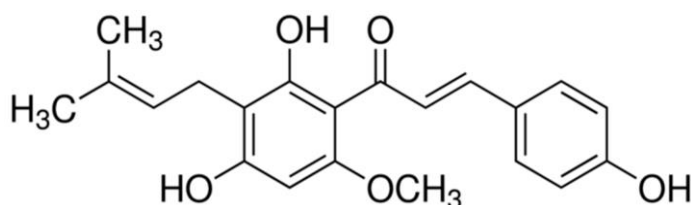
#### 4.4.1 Stanovení polyfenolických látek kapalinovou chromatografií

HPLC je díky své citlivosti a selektivitě nejpoužívanější separační technikou, která umožňuje stanovit jednotlivé zastoupení polyfenolických látek přítomných v pivu [68]. Při stanovení se nejčastěji využívá HPLC s obrácenými fázemi [65, 68, 69] ve spojení se spektrofotometrickým [70] a elektrochemickým detektorem [71-73] či hmotnostním spektrometrem (MS) [74, 75].

Před samotným chromatografickým stanovením je většinou nutná extrakce pro izolaci a zakoncentrování sledovaných látek. Zpravidla se pro tento účel využívá extrakce na pevné fázi [65, 76, 77].

##### 4.4.1.1 Stanovení xanthohumolu

Xanthohumol (XN) (obrázek 6) je hlavní prenylovaný flavonoid vyskytující se v lupulinových žlázách chmelových šištic s významnými antioxidačními a protizánětlivými vlastnostmi [78, 79]. Pivo je tedy jedním ze zdrojů XN a dalších příbuzných prenylflavonoidů, avšak vyskytuje se zde spíše ve formě svého izomeru, isoxanthohumolu (IXN) [78], který vzniká z XN při vaření mladiny. Proto mají komerční piva nižší obsah XN a vysoký obsah IXN [80].



Obrázek 6: Struktura xanthohumolu [79]

Nejpoužívanější analytickou metodou pro stanovení XN v pivu je pomocí HPLC v systémech s obrácenými fázemi, zpravidla s využitím oktadecylsilikagelové stacionární fáze a vodného roztoku methanolu jako mobilní fáze [82]. Pro separaci XN se využívá gradientová eluce a mobilní fáze bývá okyselená kyselinou mravenčí nebo octovou [82]. Detekce se provádí buď spektrofotometricky [81, 82] nebo pomocí hmotnostního spektrofotometru [74, 79, 83]. Další metoda, která se využívá ke stanovení XN je vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie s následnou spektrofotometrickou detekcí [84]. Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií je však daleko citlivější a selektivnější metoda, a proto se pro kvantitativní analýzu fenolických látek obsažených v pivu používá nejvíce [82].

Protože pivo je složitá matrice a obsahuje řadu různých látek, tak se před samotnou chromatografickou analýzou XN provádí izolace nějakou extrakční technikou, zpravidla extrakce kapalina-kapalina [84] nebo extrakce na pevné fázi [76, 77, 81]. Bohužel jsou tyto metody časově náročné nebo drahé, a proto byla testována extrakce s využitím teploty zákalu micelárních roztoků (CPE) [82]. Výhoda tohoto typu extrakce je vysoká účinnost, jednoduché zařízení pro provedení a použití netoxického rozpouštědla. Další výhodou spočívá v tom, že nedochází ke ztrátám analytů, protože zde nedochází k odpařování rozpouštědla [82]. Činidlem pro CPE extrakce může být např. neiontová povrchově aktivní látka (Triton X-114) [82]. Po samotné izolaci XN metodou CPE následuje separace pomocí HPLC s ultrafialovou detekcí [82].

#### 4.4.2 Stanovení polyfenolů spektrofotometricky

Spektrofotometricky se stanovuje celkové zastoupení všech polyfenolických látek přítomných ve vzorku. Všechny spektrofotometrické metody jsou založené na reakci fenolických sloučenin s kolorimetrickým činidlem a následně změření absorpce vzniklého barevného produktu ve viditelné oblasti spektra. Metoda se používá především díky jednoduchosti a vysoké citlivosti [68].

- **Folin–Ciocalteu metoda:**

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolických látek ve vzorku se nejčastěji využívá metoda s Folin-Ciocalteovým činidlem (FC). Metoda je založená na redukci FC činidla složeného ze směsi fosfomolybdenanu a fosfowolframu přítomnými polyfenolickými látkami za vzniku modrého komplexu. K reakci dochází v alkalickém prostředí, většinou v prostředí  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  [68]. Nárůst absorbance měřený při vlnových délkách 725–760 nm odpovídá celkovému obsahu fenolických látek ve vzorku, které se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyseliny gallové v mg/l piva [85]. Nevýhodou této metody je reakce činidla i s jinými redukčními látkami [86] obsaženými v pivu (aldehydy, ketony, aminy, aminokyseliny, nukleotidy, bílkoviny, sacharidy, thioly a vitaminy) [68].

- **Bishopova metoda:**

Jedná se o další spektrofotometrickou metodu používanou pro stanovení celkového množství polyfenolických látek [87], která byla přijata Evropskou úmluvou o pivovarech (EBC) jako oficiální metoda [68]. Metoda je založená na chelatační reakci mezi polyfenoly a železitými ionty v alkalickém prostředí. Vzorek se smíchá s karboxymethylcelulózou (CMC)

a ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) a intenzita zbarvení vzniklého červeného komplexu se měří spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. CMC se do roztoku přidává pro zlepšení průhlednosti a EDTA se používá jako antiseptikum [55, 68, 88].

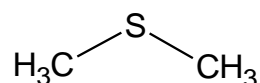
Bishopova metoda je pro stanovení celkového obsahu fenolických látek selektivnější než FC metoda, protože nedochází k tak silnému ovlivnění jinými redukčními látkami obsaženými ve vzorku [68].

## 4.5 TĚKAVÉ LÁTKY

Těkavé látky v pivu vznikají jako vedlejší produkty při fermentaci a utvářejí aromatický profil piva [89]. Jejich obsah v pivu závisí na metabolismu kvasinek a typu použitého sladu a chmele [56]. Mezi těkavé látky obsažené v pivu patří estery, karbonylové sloučeniny, alkoholy, mastné kyseliny, organické kyseliny, těkavé fenoly, furanové sloučeniny nebo terpenoidy. Tyto látky hrají hlavní roli při vytváření výsledné chuti a vůně piva [56]. Některé z nich jsou ovšem v pivu nežádoucí, protože jejich přítomnost způsobuje nepříjemnou pachut' a aroma. Mezi nežádoucí těkavé látky patří diacetyl, dimethylsulfid a sirovodík. Nežádoucí je i vyšší koncentrace oxidu siřičitého nebo esterů [89]. Diacetyl vzniká jako produkt metabolismu kvasinek během fermentace a v pivu způsobuje nežádoucí máselnou chuť [89].

### 4.5.1 Dimethylsulfid

Dimethylsulfid (DMS) (obrázek 7) je nejsledovanější těkavou sirnou sloučeninou pocházející převážně ze sladiny a chmele [90, 91]. DMS je těkavá sirná sloučenina a díky jeho těkavosti se část DMS ztrácí během procesu rmutování a při vaření mladiny. Prahová hodnota DMS v pivu se pohybuje okolo 30–50 µg/l. Ve středních koncentracích (50–100 µg/l) je považován za základní aromatickou složku ležáckých piv. Ve vyšších koncentracích (více než 100 µg/l) je v pivu nežádoucí, protože způsobuje nepříjemnou zeleninovou nebo kapustovou chuť a vůni po vaření zelenině [91, 92]. Jeho obsah závisí na sladu a použité výrobní technologii [90].



Obrázek 7: Vzorec dimethylsulfidu



DMS v pivu vzniká dvěma způsoby. Buď vzniká tepelnou degradací S-methylmethioninu během procesu sušení sladu, nebo během vaření mladiny. Dalším způsobem jeho vzniku je redukci dimethylsulfoxidu kvasinkami během procesu kvašení [91].

#### **4.5.2 Stanovení dimethylsulfidu plynovou chromatografií**

Stanovení DMS v pivu je velmi obtížné právě kvůli jeho nízké koncentraci [92]. Nejjednodušší analytickou metodou pro stanovení DMS je pomocí headspace-plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HS-GC-MS) [90, 92].

- Princip stanovení:

DMS se před vlastní analýzou musí nejdříve extrahovat z matrice (z piva). Nejsnadnějším způsobem izolace těkavých látek je pomocí dynamické head-space techniky (HS), při které se analyt izoluje šetrnou extrakcí plynem. Po izolaci stanovované látky následuje separace sirných těkavých látek, která se provádí pomocí plynové chromatografie ve spojení se selektivními detektory pro látky obsahující ve své molekule atom síry. Nejčastěji se využívá plamenově fotometrický detektor či pulzní plamenově fotometrický detektor, dále lze využít sirný chemiluminiscenční detektor nebo atomový emisní detektor. K separaci těkavých sirných látek pomocí plynové chromatografie se používají kolony s polární stacionární fází na bázi polyethylenglykolu [90]. Jako nosný plyn se většinou používá helium [92].

## ZÁVĚR

Pivo je celosvětově oblíbený nápoj vyrobený ze sladu, chmele a vody a je zkvašený pomocí kulturních pivovarských kvasinek. Samotná výroba piva začíná výrobou sladu ve sladovnách. Poté následuje výroba mladiny zahrnující několik operací (šrotování sladu, vystírání, rmutování scezování sladiny, chmelovar, čištění a zchlazování mladiny). Po zchlazení mladiny následuje proces kvašení, při kterém dochází k přeměně zkvasitelných cukrů obsažených v mladině na ethanol a oxid uhličitý. Poslední úpravou finálního produktu jsou závěrečné úpravy, při kterých se pivo filtruje, stabilizuje, pasteruje a stáčí do přepravních obalů.

Výroba piva je značně složitý proces kdy v jednotlivých fázích výroby může dojít k celé řadě chyb, které poté ovlivňují kvalitu výsledného produktu. Kvalita piva je tedy ovlivněna nejen výchozími surovinami, ale i technologickým postupem. Během samotné výroby se musí dodržovat veškeré hygienické návyky, aby se zabránilo případné nežádoucí kontaminaci piva různými mikroorganismy, které by způsobilo jeho kažení a znehodnocení. Kontrolovat se musí nejen výsledný produkt, ale i veškeré suroviny ze kterých se pivo vyrábí.

Pivo je komplexní nápoj obsahující širokou škálu chemických sloučenin. Většina z těchto látek pochází z výchozích surovin nebo vznikají až během výroby. V pivu mohou být obsaženy i látky, které jsou v pivu nežádoucí, jedná se např. o různé sírné sloučeniny (sirovodík, dimethylsulfid) a diacetyl. Tyto sloučeniny vznikají jako vedlejší produkty při kvašení a v pivu způsobují nežádoucí vůně a chutě. Diacetyl ve vyšších koncentracích způsobuje máslovou chuť a dimethylsulfid vůni po vařené zelenině. Mezi látky, které jsou v pivu žádoucí a mají na jeho kvalitu pozitivní vliv patří např. polyfenolické látky, hořké chmelové látky, minerální látky, vitaminy, bílkoviny a sacharidy.

Při hodnocení kvality piva se využívá několik analytických metod. Nejvíce však separační techniky v plynné či kapalně fázi. Pro hodnocení antioxidačních vlastností a celkového obsahu fenolických látek lze s úspěchem využít různé spektrofotometrické metody.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. MEZEROVÁ, M., (2017). *Pivo*. Vyd. 1, Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú. ISBN 978-80-87719-56-5.
2. Chráněné zeměpisné označení České pivo. *Beerresearch: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.* [online]. [cit. 18.03.2022]. Dostupné z: <https://beerresearch.cz/chranene-zemepisne-oznaceni-chzo-ceske-pivo/>
3. České pivo. *eAmbrosia: registr zeměpisných označení EU* [online]. [cit. 24.04.2022]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/geographical-indications-register/eambrosia-public-api/api/v1/attachments/64815>
4. Typy piv: jaký je mezi nimi rozdíl a kde si na nich pochutnat? *Magazín patriot* [online]. [cit. 20.03.2022]. Dostupné z: <https://www.patriotmagazin.cz/typy-piv-jaky-je-mezi-nimi-rozdil-a-kde-si-na-nich-pochutnat>
5. Průvodce pivem pro začátečníky. *Plzeňský Prazdroj* [online]. [cit. 20.03.2022]. Dostupné z: <https://www.prazdroj.cz/1590-pr-vodce-pivem-pro-za-te-n-ky>
6. ČESKO. Zákon č. 248/2018 Sb. ze zde 24. října 2018, Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2018, částka 125. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248>
7. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., (2009). *Chemie potravin 2*. Vyd. 3, Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-16-9.
8. Nutriční vlastnosti piva. *Homebrewing* [online]. [cit. 20.03.2022]. Dostupné z: [http://www.homebreving.cz/index.php?route=product/category&path=97\\_102](http://www.homebreving.cz/index.php?route=product/category&path=97_102)
9. BAMFORTH, C.W., (2000). Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. *The Chemical Educator*. 5, 102–112. <https://doi.org/10.1007/s00897000378a>
10. MONTANARI, L., MAYER, H., MARCONI, O., FANTOZZI, P., (2009) Minerals in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press. 359–365. ISBN 978-0-12-373891-2
11. SOHRABVANDI, S., MORTAZAVIAN, A.M., REZAEI, K., (2012). Health-related aspects of beer: A review. *International Journal of Food Properties*. 15(2), 350–373. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.487627>

12. FERREIRA, I.M.P.L.V.O., (2009). Beer Carbohydrates. *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press. 291–298. ISBN 978-0-12-373891-2
13. HABSCHIED, K., LONČARIĆ, A., MASTANJEVIĆ, K., (2020). Screening of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers. *Foods*. 9(2), 238. <https://doi.org/10.3390/foods9020238>
14. DRESEL, M., VOGT, CH., DUNKEL, A., HOFMANN, T., (2016). The Bitter Chemodiversity of Hops (*Humulus lupulus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(41), 7789–7799. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03933>
15. OLŠOVSKÁ, J., ŠTĚRBA, K., ČEJKA, P., (2013) Comparison of Carbon Dioxide Determination Measured by Different Methods. *Kvasný Průmysl*. 59(3), 63–68. DOI: 10.18832/kp2013007
16. GORDON, R., POWER, A., CHAPMAN, J., CHANDRA, S., COZZOLINO, D., (2018). A Review on the Source of Lipids and Their Interactions during Beer Fermentation that Affect Beer Quality. *Fermentation*. 4(4), 89. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040089>
17. KADLEC, P., MELZUCH K., VOLDŘICH, M., (2009). *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: Technologie potravin*. Ostrava: KEY Publishing. ISBN 978-80-7418-051-4.
18. BASAŘOVÁ, G., (2010). *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-734-7.
19. LEWIS, M., (2015). Beer and Brewing. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0205051814091919.a01.pub3>
20. CHLÁDEK, L., (2007). *Pivovarnictví*. Praha: Grada, Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.
21. Druhy sladů. *Sladovny Soufllet ČR* [online]. [cit.18.06.2022]. Dostupné z: <https://www.slad.cz/slady.php>
22. BASAŘOVÁ, G., (2015). *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team. ISBN 978-80-87109-47-2.

23. CHMELAR, J., Slad – Základ každého piva. *Alkohol drink* [online]. [cit. 20.03.2022]. Dostupné z: <https://alkoholdrink.cz/alkohol-drink-slad-zaklad-kazdeho-piva/>
24. BOGDAN, P., KORDIALIK-BOGACKA, E., (2017). Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology*. 65, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.001>
25. EBLINGER, H.M., NARZIß, L., (2009). Beer. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Ed.). [https://doi.org/10.1002/14356007.a03\\_421.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a03_421.pub2)
26. DE KEUKELEIRE, D., (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*. 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
27. *Chmel a chmelové výrobky* [online]. [cit. 29.03.2022]. Dostupné z: <http://uprt.vscht.cz/ucebnice/mb/MB43-v2.HTM>
28. GRAEBNER, H. Chmel otáčivý – *Humulus lupulus*. *Příroda. cz* [online]. [cit.28.03.2022]. Dostupné z: <https://www.priroda.cz/clanky.php?detail=2641>
29. DUŠEK, M., OLŠOVSKÁ, J., KROFTA, K., JURKOVÁ, M., MIKYŠKA, A., (2014). Qualitative Determination of  $\beta$ -Acids and Their Transformation Products in Beer and Hop Using HR/AM-LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(31), 7690–7697. <https://doi.org/10.1021/jf501852r>
30. KROFTA, K., MIKYŠKA, A., JURKOVÁ, M., MRAVCOVÁ, L., VONDRÁČKOVÁ, P., (2017). Determination of Bitter Compounds in Hops – Effect of Crop Year and Hops Age. *Kvasný Průmysl*. 63(5), 241–247. <https://doi.org/10.18832/kp201725>
31. HOFTA, P., DOSTÁLEK, P., BASAŘOVÁ, G., (2004). Xanthohumol – Chmelová pryskyřice nebo polyfenol? *Chemické listy*. 98(9), 825–830.
32. BIENDL, M., (2009). Hops and Health. *Technical Quarterly*. 46, 1–7. DOI:10.1094/TQ-46-2-0416-01
33. GIRISA, S., SAIKIA, Q., BORDOLOI, D., BANIK, K., MONISHA, J., DAIMARY, U.D, VERMA, E., AHN, K.S., KUNNUMAKKARA, A.B., (2021). Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment. *IUBMB Life*. 73(8) 1016–1044. <https://doi.org/10.1002/iub.2522>

34. ALMAGUER, C., SCHÖNBERGER, C., GASTL, M., ARENDT, E.K., BECKER, T., (2014). *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. *Journal of The Institute of Brewing*. 120(4), 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
35. KUŽELY, PELETY, OLEJE, EXTRAKTY: Kužely, pelety, oleje... jaká lepší volba pro mé pivo? *Hopstore* [online]. [cit. 30.03.2022]. Dostupné z: <https://www.hopstore.fr/cs/formes-de-houblons/>
36. ATHNASIOS, A.K., QUANTZ, M., (2012). Yeasts. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Ed.). [https://doi.org/10.1002/14356007.a28\\_461.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a28_461.pub2)
37. LEWIS, M.J., YOUNG, T.W., (2012). *Brewing*. Ed. 2nd. Springer Science & Business Media. ISBN 978-0-306-47274-9
38. Výroba piva. *Pivotečka* [online]. [cit. 24.06.2022]. Dostupné z: <https://www.pivotecka.cz/vyroba-piva/>
39. THESELING, F.A, BIRCHAM, P.W, MERTENS, S., VOORDECKERS, K., VERSTREPEN, K.J., (2019). A Hands-On Guide to Brewing and Analyzing Beer in the Laboratory. *Current Protocols in Microbiology*. 54(1). <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>
40. MULDER, C.J., (2005). Malts and Malting. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (Ed.). <https://doi.org/10.1002/0471238961.1301122004151403.a01.pub2>
41. HORNSEY, I.S., (2013). *Brewing*. Ed. 2nd. Royal Society of Chemistry. ISBN 978-1-84973-602-2
42. WUNDERLICH, S., BACK, W., (2009). Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press. 3–16. ISBN 978-0-12-373891-2.
43. NOVOTNÝ, P., Proces 1. díl: Rmutování. *Diversity Beer* [online]. [cit. 10.04.2022]. Dostupné z: <http://www.diversity.beer/2015/12/proces-1-dil-rmutovani.html>
44. HU, S., DONG, J., FAN, W., YU, J., YIN, H., HUANG, S., LIU, J., HUANG, S., ZHANG, X., (2014). The influence of proteolytic and cytolytic enzymes on starch degradation during mashing. *Journal of The Institute of Brewing*. 120(4), 379–384. <https://doi.org/10.1002/jib.172>

45. WILLAERT, R., (2007). The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer. *Handbook of Food Products Manufacturing*. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-11354-7
46. NOVOTNÝ, P., Proces 2. díl: Chmelovar. *Diversity Beer*. [online]. [cit. 10.04.2022]. Dostupné z: <http://www.diversity.beer/2016/01/proces-2-dil-chmelovar.html>
47. NARZISS, L., BACK, W., (2016). Brauwissenschaft und Brauereitechnologie. *Chemie Ingenieur Technik*. 88(12), 1869–1879. <https://doi.org/10.1002/cite.201600038>
48. STEWART, G.G., (2016). *Saccharomyces species* in the Production of Beer. *Beverages*. 2(4), 34. <https://doi.org/10.3390/beverages2040034>
49. DOSTÁLEK, P., KOTLÍKOVÁ, B., FIALA, J., JELÍNEK, L., ČERNÝ, Z., ČÁSENSKÝ, B., MIKULKA, J., (2011). Stabilizers for Increased Colloidal Stability of Beer. *Kvasný Průmysl*. 57(7–8), 290–295. DOI: 10.18832/kp2011034
50. ANDERSON, H.E., SANTOS I.C., HILDENBRAND, Z.L., SCHUG, K.A., (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*. 1085, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>
51. BUIATTI, S., (2009). Beer Composition: An Overview. *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press. 213–225. ISBN 978-0-12-373891-2
52. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., DOLAN, J.W., (2011). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Ed. 3rd, John Wiley & Sons. ISBN 978-1-118-21039-0
53. DONG, M.W., (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-471-97310-2
54. MARCZENKO, Z., BALCERZAK, M., (2000). *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Ed. 1st, Elsevier. ISBN 978-0-080-54108-2
55. MARTINEZ-GOMEZ, A., CABALLERO, I., BLANCO, C.A., (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*. 10(3), 400. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>

56. GASIŃSKI, A., KAWA-RYGIELSKA, J., SZUMNY, A., GAŚIOR, J., GŁOWACKI, A., (2020). Assessment of Volatiles and Polyphenol Content, Physicochemical Parameters and Antioxidant Activity in Beers with Dotted Hawthorn (*Crataegus punctata*). *Foods*. 9(6), 775. <https://doi.org/10.3390/foods9060775>
57. YANG, D., GAO, X., (2021). Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications. *Trends in Food Science & Technology*. 110, 754–764. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.048>
58. FIDLER, M., KOLÁŘOVÁ, L., (2009). Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 103(3), 232–235.
59. KARABÍN, M., DOSTÁLEK, P., HOFTA, P., (2006). Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy*. 100(3), 184–189.
60. HARNAFI, H., AMRANI, S., (2008). Spectrophotometric Methods for Determination of Plant Polyphenols Content and their Antioxidant Activity Assessment: an Overview. *Pharmacognosy Reviews*. 2(3), 20.
61. MAREČEK, V., MIKYŠKA, A., HAMPEL, D., ČEJKA, P., NEUWIRTHOVÁ, J., MALACHOVÁ, A., CERKAL, R., (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 73, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
62. TAFULO, P.A.R., QUEIRÓS, R.B., DELERUE-MATOS, C.M., SALES, M.G.F., (2010). Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*. 43(6), 1702–1709. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.014>
63. ŠULC, M., LACHMAN, J., HAMOUZ, K., ORSÁK, M., DVOŘÁK, P., HORÁČKOVÁ, V., (2007). Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*. 101, 584–591.
64. QUIFER-RADA, P., VALLVERDÚ-QUERALT, A., MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M., CHIVA-BLANCH, G., JÁUREGUI, O., ESTRUCH, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R., (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*. 169, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>



65. NAKAMURA, T., COICHEV, N., MOYA, H.D., (2012). Modified CUPRAC spectrophotometric quantification of total polyphenol content in beer samples using Cu (II)/neocuproine complexes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 28(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.07.012>
66. JURIC, A., CORIC, N., ODAK, A., HERCEG, Z., TISMA, M. (2015). Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions. *Journal of The Institute of Brewing*. 121(4), 541–547. <https://doi.org/10.1002/jib.254>
67. HABSCHIED, K., KOŠIR, I.J., KRSTANOVIĆ, V., KUMRIĆ, G., MASTANJEVIĆ, K., (2021). Beer Polyphenols – Bitterness, Astringency, and Off-Flavors. *Beverages*. 7(2), 38. <https://doi.org/10.3390/beverages7020038>
68. FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M.L., MEDINA, A.R., (2014). Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Beer. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Academic Press. 289–299 ISBN 978-0-12-404738-9
69. MOLNÁR-PERL, I., FÜZFAL, ZS., (2005). Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1073(1–2), 201–227. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.068>
70. SZWAJGIER, D., (2009). Content of Individual Phenolic Acids in Worts and Beers and their Possible Contribution to the Antiradical Activity of Beer. *Journal of The Institute of Brewing*. 115(3), 243–252. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00376.x>
71. PIAZZON, A., FORTE, M., NARDINI, M., (2010). Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(19), 10677–10683. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>
72. VANBENEDEN, N., DELVAUX, F., DELVAUX, F.R., (2006). Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 1136(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.001>
73. NARDINI, M., GHISELLI A., (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*. 84(1), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00257-7)

74. ČESLOVÁ, L., HOLČAPEK, M., FIDLER, M., DRŠTIČKOVÁ, J., LÍSA, M., (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216(43), 7249–7257. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.022>
75. WHITTLE, N., ELDRIDGE, H., BARTLEY, J. ORGAN, G., (1999). Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection. *Journal of the Institute of Brewing*. 105(2), 89–99. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00011.x>
76. DVOŘÁKOVÁ, M., HULÍN, P., KARABÍN, M., DOSTÁLEK. P., (2007). Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech Journal of Food Sciences*. 25(4), 182–188.
77. GARCÍA, A.A., CRANDE, B.C., GÁNDARA, J.S., (2004). Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*. 1054(1–2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.092>
78. STEVENS, J.F., PAGE, J.E., (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*. 65(10) 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
79. VÁZQUEZ LOUREIRO, P., HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, I., SENDÓN, R., RODRIGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS, A., BARBOSA-PEREIRA, L., (2019). Determination of Xanthohumol in Hops, Food Supplements and Beers by HPLC. *Foods*. 8(10), 435. <https://doi.org/10.3390/foods8100435>
80. MAGALHÃES, P.J., CARVALHO, D.O., CRUZ, J.M., GUIDO, L.F., BARROS, A.A., (2009). Fundamentals and Health Benefits of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hops and Beer. *Natural Product Communications*. 4(5), 591–610. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400501>

81. WANG, N., LI, Y., ZHENG, F., LIU, C., LI, Q., GU, G., (2009). Determination of xanthohumol in beer by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*. 27(3), 372–375.
82. CHEN, L., ZHAO, Q., JIN, H., ZHANG, X., XU, Y., YU, A., ZHANG, H., DING, L., (2010). Determination of xanthohumol in beer based on cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*. 81(1–2) 692–697. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.004>
83. STEVENS, J.F., TAYLOR, A.W., DEINZER, M.L., (1999). Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 832(1–2), 97–107. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01001-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01001-2)
84. KAC, J., MLINARIČ, A., UMEK, A., (2006). HPTLC Determination of Xanthohumol in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Hop Products. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 19(107), 58–61. <https://doi.org/10.1556/JPC.19.2006.1.10>
85. ZHAO, H., CHEN, W., LU, J., ZHAO, M., (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*. 119(3), 1150–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>
86. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-REVENTÓS, R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
87. BISHOP, L.R., (1972). Analysis committee of the european brewery convention the measurement of total polyphenols in worts and beers. *Journal of The Institute of Brewing*. 78(1), 37–38. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb03426.x>
88. CALLEMIEN, D., COLLIN, S., (2009). Structure, Organoleptic Properties, Quantification Methods, and Stability of Phenolic Compounds in Beer – A Review. *Food Reviews International*. 26(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/87559120903157954>

89. MANSOURI, F.E., FARISSI, H.E., CACCIOLA, F., BOUHCAIN, B., ESTEVES da SILVA, J.C.G., LOVILLO, M.P., BRIGUI, J., (2022). Optimal Design Approach Applied to Headspace GC for the Monitoring of Diacetyl Concentration, Spectrophotometric Assessment of Phenolic Compounds and Antioxidant Potential in Different Fermentation Processes of Barley. *Applied Sciences*. 12(1), 37. <https://doi.org/10.3390/app12010037>
90. SVOBODA, Z., MIKULÍKOVÁ, R., BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., (2017). Optimization of Determination of Dimethyl Sulfide in Wort and Beer. *Kvasný Průmysl*. 63(3), 121–125. <https://doi.org/10.18832/kp201714>
91. FERREIRA, I.M., GUIDO, L.F., (2018). Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. *Fermentation*. 4(2), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>
92. STAFISSO, A., MARCONI, O., PERRETTI, G., FANTOZZI, P., (2011). Determination of dimethyl sulphide in brewery samples by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC/MS). *Italian Journal of Food Science*. 23(1), 19–27. ISSN 1120-1770