

VYUŽITÍ GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE PRO STANOVENÍ ORGANICKÝCH POLUTANTŮ VE SLADOVNICKÉM JEČMENI

APPLICATION OF GEL-PERMEATION CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF ORGANIC POLLUTANTS IN BREWING BARLEY

TOMÁŠ HORÁK, MARIE JURKOVÁ, JIŘÍ ČULÍK, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER, Pivovarský ústav Praha, VÚPS a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2

Klíčová slova: PAH, PCB, sladovnický ječmen, pivo, gelová permeační chromatografie
Key words: PAH, PCB, malting barley, beer, gel permeation chromatography

1 ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenylly (PCB) tvoří významnou skupinu kontaminantů životního prostředí, která může ohrožovat i zdravotní nezávadnost potravin. Jak vyplývá z výsledků nejnovějších studií uskutečněných v ČR, je nutné těmto polutantům vzhledem k jejich nezanedbatelnému výskytu věnovat stálou pozornost [1, 2]. Maximální povolený obsah těchto látek v různých potravinách včetně piva je podle jejich charakteru určen vyhláškou MZd ČR č. 298/1997 Sb. v aktuálním znění k zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích.

Většina kontaminujících látek v pivu pochází ze surovin, a protože základní surovinou pro výrobu piva je sladovnický ječmen, mohou případně kontaminující látky z ječmene přejít až do piva. Z tohoto důvodu se naše pracoviště také podílelo na řešení úkolu VOS MZe ČR „Zdravotní nezávadnost sladovnického ječmene“, v rámci kterého byla vypracována tato metoda.

Analytické postupy stanovení PAH a PCB zahrnují tyto tři hlavní kroky: izolaci, přečištění extraktů, popř. zakoncentrování analytů a jejich identifikaci a kvantifikaci.

K extrakci z pevných matic se často používá extrakce podle Soxhleta nebo sonifikace s vhodným rozpouštědlem [3, 4], např. acetonitrilem. Lawrence využíval extrakci směsí hydroxid draselný – aceton – ethanol – voda s následnou reextrakcí isooktanem [5]. Jako extrakční rozpouštědlo byl s výhodou použit i chloroform [6, 7].

Nutnost odstranění koextrahovaných látek, zejména lipidů a pigmentů, vyplývá z možného přímého rušení chromatografické separace, a tudíž znemožnění identifikace a kvantifikace PAH a PCB, ale také z případného snížení účinnosti HPLC nebo GC kolon vlivem opakované analýzy nedostatečně přečištěných vzorků [8].

Při čištění extraktů se nejvíce používají metody adsorpční a gelové chromatografie. Přečištění adsorpční chromatografií se většinou provádí na sorbentech jako je Florisil (křemičitan hořečnatý), silikagel, oxid hlinitý nebo oxid hořečnatý. Problémy při použití těchto sorbentů

spočívají ve změně aktivity náplně kolony nebo v ireverzibilní adsorpci [9].

Jinou možností přečištění extraktů je gelová permeační chromatografie – dále GPC [10, 11, 12, 13]. GPC je separační technika založená na principu rozdělávání sloučenin podle molekulové hmotnosti a struktury. Látky s vyšší molekulovou hmotností (jejich efektivní objem přesahuje rozměry pórů zvoleného gelu) procházejí kolonou bez zadržení. Menší molekuly naopak vstupují do vnitřní struktury gelu a k jejich eluci dochází později. Velikost pórů a s ní související bobtnavost gelu je dána použitou mobilní fází a stupněm zesíťování gelu. Na kolonách GPC lze dosáhnout oddělení lipidů a extrahovatelných pigmentů, které lze považovat za potenciálně interferující při instrumentální koncovce. K výhodě GPC patří dlouhá životnost náplně kolony bez vlivu na změnu eluční křivky analytů nebo čistící kapacitu [14].

K přečištění frakcí PAH a PCB na kolonách GPC se používají gely jako XAD-2 [11, 13], Bio Beads SX-3 [15, 7] a SX-12 [15] a velmi často Sephadex LH-20 [5, 10, 12, 15].

Jako instrumentální koncovka se pro stanovení PAH nejčastěji používá metoda HPLC s fluorescenční detekcí a pro PCB plynová chromatografie s detektorem elektronového zachytu [16].

Cílem této práce bylo vypracovat podle požadavků legislativních předpisů metodu stanovení PAH a PCB v rostlinných maticích, zejména v ječmeni a sladu, která by umožňovala společné zakoncentrování všech sledovaných analytů v jednom extrakčním kroku a zároveň pomocí gelové permeační chromatografie získání dostatečně čistého extraktu. Konečné stanovení PAH bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, stanovení PCB plynovou chromatografií s využitím detektoru elektronového zachytu.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie, standardy

Chloroform, n-hexan SupraSolv, acetonitril pro gradientovou analýzu – vše Merck, SRN

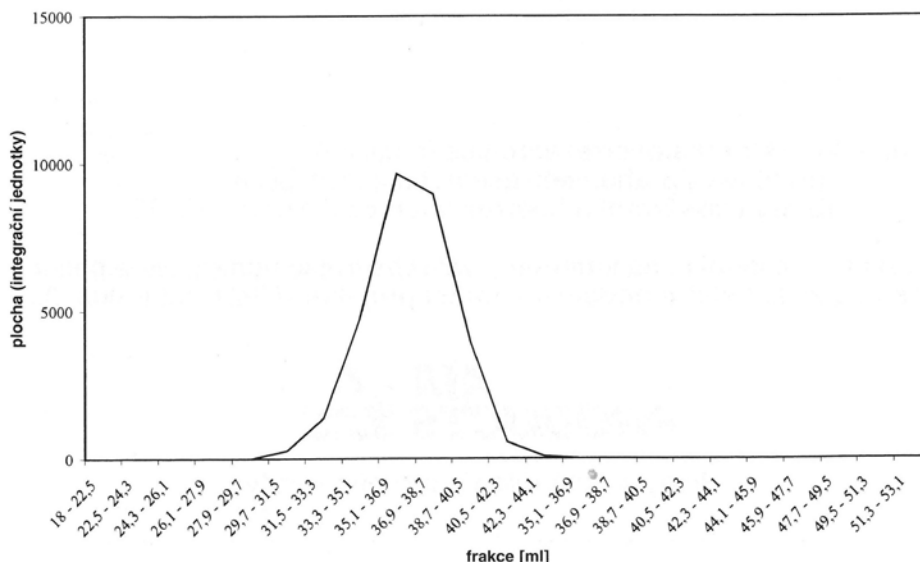
Bio-Beads S-X3 200-400 mesh – Bio-Rad Laboratories, USA

Ultračistá voda – Milli-RO 5plus, Millipore, USA

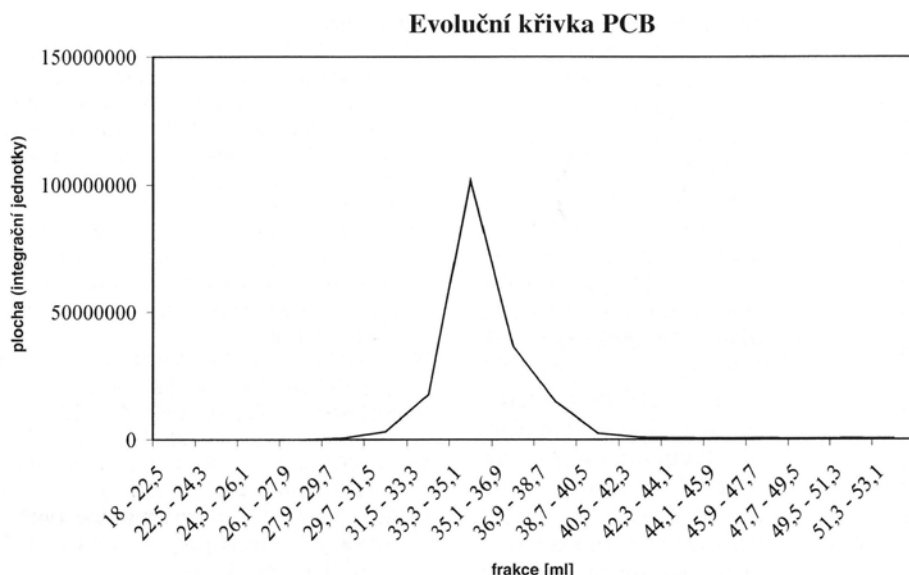
Dusík v tlakové lahvi v kvalitě 4,6 a v kvalitě ECD, helium v tlakové lahvi v kvalitě 5,0 – MGO, ČR

PCB – Mix 3 obsahující kongenery PCB č. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180. Směs byla jak v isooktanovém, tak v acetonitrilovém roztoku; každý kongener o koncentraci 10 ng/μl – Dr. Ehrenstorfer, SRN

Evoluční křivka PAH



Obr. 1 Eluční křivka PAH na koloně 10 x 500 mm naplněné sorbentem Bio-Beads SX-3 při průtoku chloroformu 0,9 ml/min



Obr. 2 Eluční křivka kongenerů PCB na koloně 10 x 500 mm naplněné sorbentem Bio-Beads SX-3 při průtoku chloroformu 0,9 ml/min

PAH: benzo(a)anthracen, chrysen, benzo(b)fluoranthén, benzo(k)fluoranthén, benzo(a)pyren, dibenzo(a,h)anthracen, indeno(1,2,3-cd)pyren, dibenzo(a,i)pyren, dibenzo(a,h)pyren v acetonitrilovém roztoku o koncentraci 10 ng/μl každé látky – Dr. Ehrenstorfer, SRN

2.2 Pracovní postup

2.2.1 Extrakce

Navážka důkladně zhomogenizovaného vzorku 30 g se extrahuje 40 ml chloroformu po dobu 20 min v ultrazvukové lázni. Alikvotní podíl extraktu o objemu asi 30 ml se na rotační vakuové odparce odpaří do sucha a poté rozpustí v 4 ml chloroformu.

2.2.2 Přečištění extraktu na GPC

Zahuštěný chloroformový extrakt se dávákuje do GPC systému 2 ml smyčkou. Vzhledem k tomu, že většinou extrakty obsahují nerozpustné částice, je nutné před aplikací na GPC kolonu provést filtraci extraktu přes teflonový mikrofiltr 0,2 μm (Alltech, USA). K přečištění extraktů a sledování eluce stanovovaných kontaminantů byl použit gel na bázi polymeru styrendivynylbenzenu Bio-Beads SX-3.

Čištění probíhalo za těchto podmínek: Pístová HPLC pumpa: HPP 4001 (Laboratorní přístroje Praha) Šesticestný preparativní dávkovací ventil se smyčkou 2 ml (ECOM, ČR) Nerezová kolona 10 x 500 mm naplněná sorbentem Bio-Beads S-X3 Mobilní fáze: chloroform Průtok: 0,9 ml/min

Jak vyplývá ze zjištěných elučních křivek pro PAH (obr. 1) a PCB (obr. 2), byla sbírána frakce 27 – 45 ml.

2.2.3 Stanovení PCB

Získaný eluát se na rotační vakuové odparce odpaří do sucha (teplota vodní

lázně max. 40 °C). Dále se odparek rozpustí v 1 ml hexanu. Pro analýzu na plynovém chromatografu se použijí 2 μl takto přečištěného extraktu. Vlastní stanovení PCB probíhalo za následujících podmínek:

Plynový chromatograf: Chrompack CP 9001

Kolona: DB-5, délka 30 m, průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 μm (J&W Scientific)

Průtok nosného plynu (helium): 1,8 ml/min

Teplota detektoru ECD: 310 °C

Teplota injektoru: 260 °C

Nástřík: splitless po dobu 36 s, pak dělicí poměr 1:20

Teplotní program: 70 °C (prodleva 2 min)

25 °C/min do 200 °C (prodleva 0 min)

2 °C/min do 250 °C (prodleva 0 min)

50 °C/min do 290 °C (prodleva 10 min)

Nástřík: 2 μl.

2.2.4 Stanovení PAH

Po stanovení PCB se hexanový extrakt odpaří pod velmi jemným proudem dusíku do sucha, rozpustí se v 1 ml acetonitrilu a nástříkne na kolonu kapalinového chromatografu. Chromatografická separace probíhala za těchto podmínek: Kapalinový chromatograf: TSP Spectra-SYSTEM P 4000 s programovatelným fluorescenčním detektorem JASCO FP-1520

Kolona: LiChrospher PAH 250x4 mm (Merck)

Mobilní fáze, gradient: acetonitril-voda;

0 – 20 min (80 – 100 % acetonitrilu)
20 – 44 min (100 % acetonitril)
40 – 45 min (100 – 80 % acetonitrilu)
Průtok: 1 ml/min

Detekce: fluorescenční s následujícím programem excitačních (ex.) a emisních (em.) vlnových délek:

0 – 10,5 min ex. 264 nm, em. 384 nm, 10,5 – 17,9 min ex. 280 nm, em. 430 nm, 17,9 – 44 min ex. 290 nm, em. 484 nm

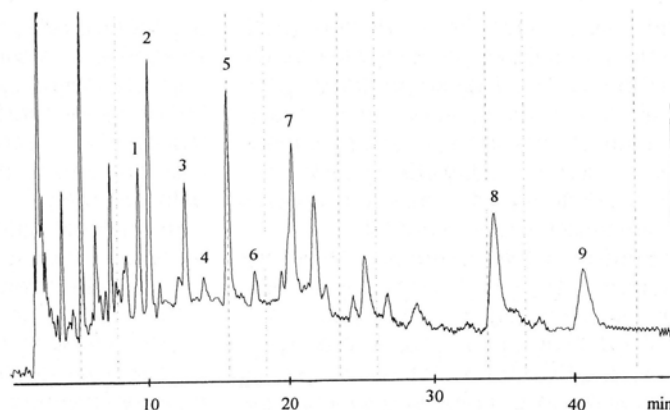
Nástřík: 20 μl

Vyhodnocení chromatogramů jak pro PCB, tak pro PAH bylo provedeno metodou externího standardu.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Použití gelové permeační chromatografie umožňuje účinné oddělení všech sledovaných analytů od dalších koextrahovaných látek, jak je patrné z typických chromatogramů uměle kontaminovaného sladovnického ječmene, které jsou uvedeny na obr. 3 a 4.

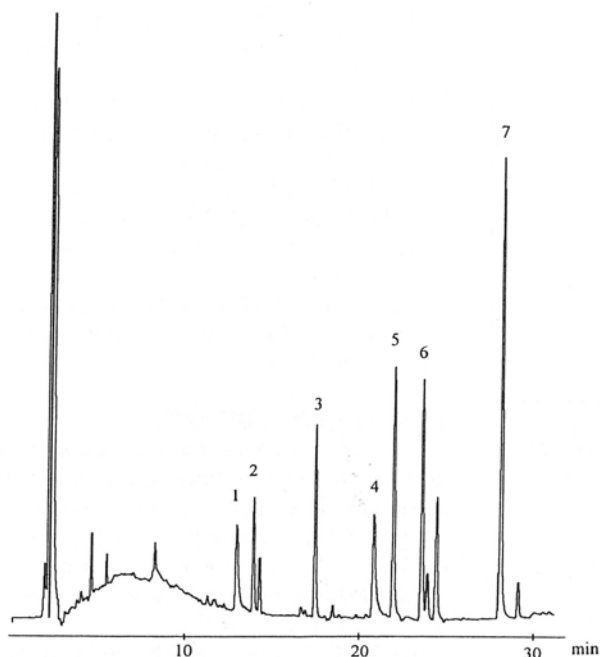
Charakteristika metody je shrnuta v tab. 1. Výťažnost a relativní směrodatná odchylka byla stanovena ze sedmi přídavek acetonitrilového roztoku stan-



Obr. 3 Chromatogram reálného vzorku sladovnického ječmene obohaceného směsí PAH v množství 2 μg/kg: 1 – benzo(a)anthracen, 2 – chrysen, 3 – benzo(b)fluoranthén, 4 – benzo(k)fluoranthén, 5 – benzo(a)pyren, 6 – dibenzo(a,h)anthracen, 7 – indeno(1,2,3-cd)pyren, 8 – dibenzo(a,i)pyren, 9 – dibenzo(a,h)pyren

Tab. 1 Charakteristika multireziduální metody pro stanovení PAH a PCB v rostlinných matricích. RSD – relativní směrodatná odchylka, MD – mez detekce, MS – mez stanovení

Analyt	Výtěžnost [%]	RSD [%]	MD [μg/kg]	MS [μg/kg]
Benzo(a)anthracen	94	9	0,05	0,2
Benzo(b)fluoranthén	93	8	0,15	0,5
Benzo(k)fluoranthén	98	7	0,30	0,9
Chrysen	94	9	0,04	0,1
Dibenzo(a,h)anthracen	90	9	0,20	0,7
Benzo(a)pyren	90	9	0,08	0,3
Indeno(1,2,3-cd)pyren	83	9	0,13	0,4
Dibenzo(a,i)pyren	93	13	0,10	0,3
Dibenzo(a,h)pyren	29	23	0,20	0,7
PCB 28	83	24	0,03	0,1
52	80	23	0,03	0,1
101	80	16	0,03	0,1
118	111	12	0,02	0,07
138	105	15	0,02	0,07
153	101	25	0,02	0,07
180	108	22	0,01	0,03



Obr. 4 Chromatogram reálného vzorku sladovnického ječmene obohaceného směsí PCB v množství 5 µg/kg: 1 – PCB 25, 2 – PCB 52, 3 – PCB 101, 4 – PCB 118, 5 – PCB 153, 6 – PCB 138, 7 – PCB 180

dardů ke sladovnickému ječmeni (PCB na hladině 5 µg/kg pro každý kongener, PAH na hladině 2 µg/kg pro každý polycyklický uhlovodík). Mez detekce byla odhadnuta jako koncentrace, při které je poměr signálu odpovídající této koncentraci k šumu 3:1, mez stanovení jako desetinásobek tohoto poměru.

Správnost byla ověřena pomocí výťažnosti, která se u všech látek s výjimkou dibenzo(a,h)pyrenu nachází v rozsahu od 80 do 111 %, průměr pro PAH je 92 %, pro PCB 95 %. Poměrně nízká výťažnost dibenzo(a,h)pyrenu svědčí o vysoké sorpci této sloučeniny v životním prostředí. Tato skutečnost je v souladu

se značně vysokou retencí tohoto uhlovodíku na chromatografické koloně za podmínek eluce velmi silným organickým rozpouštědlem, jímž je acetonitril (viz kap. 2.2.4).

Přesnost metody byla určena jako relativní směrodatná odchylka a vykazuje hodnoty < 25 %, průměrná hodnota pro PAH činí 10,6 % a pro PCB 19,5 %. Vzhledem k tomu, že jde o stopovou analýzu v mikrogramových množstvích, tedy o řád níže než při běžných analýzách v pivovarství, získané hodnoty relativní směrodatné odchylky jsou akceptovatelné.

Meze stanovení se pohybují pod 1 µg/kg a jsou pro požadavky legislativy zcela dostatečné.

4 ZÁVĚR

Popsaná multireziduální metoda řeší problém čištění extraktu získaného z rostlinných matric. Umožňuje stanovení vybraných PAH a indikačních kongenerů PCB požadovaných legislativními předpisy ČR v mikrogramových množstvích a při relativní směrodatné odchylce < 25 %. Jde o velmi efektivní metodu, neboť v rámci jednoho extrakčního kroku je možné stanovení všech výše uvedených kontaminantů, a tak dochází ke značné úspoře času a extrakčního rozpouštědla ve srovnání se samostatnou extrakcí pro každý typ analýzy. Navíc celý postup lze s vhodnou instrumentací snadno automatizovat, a tak ještě více zefektivnit.

Literatura

- [1] HAJŠLOVÁ, J. et al.: Výsledky nejvýznamnějších pilotních studií realizovaných v Projektu MŽP „Hodnocení stavu životního prostředí ČR“, Sborník ze semináře Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech, Praha, v tisku
- [2] CUHRA, P. et al.: Trendy v kontaminaci potravin na českém trhu, Sborník ze semináře Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech, Praha, v tisku
- [3] COATES, J., ELZEMAN, A. W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69**, 1986, s. 110
- [4] KICINSKI, H. G., ADAMEK, S., KETTRUP, A.: Chromatographia **28**, 1989, s. 203
- [5] LAWRENCE, J. F.: Intern. J. Environ. Anal. Chem. **24**, 1986, s. 113
- [6] MERHAUT, J.: Diplomová práce: PAH ve vybraných biologických materiálech, VŠCHT Praha, 1993
- [7] HAJŠLOVÁ, J. et al.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **197**, 1993, s. 562
- [8] FREHSE, H.: Trends in Pesticide Residue Methodology, from Pest. Sci. And Biotechn., Blackwell Scientific Publications, 1987
- [9] LAWRENCE, J. F., WEBER, D. F.: J. Agric. Food Chem. **32**, 1984, s. 789
- [10] CREASER, C., PURCHASE, R.: Food Contaminants Sources and Surveillance, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991
- [11] VAESSEN, H. A. G., WAGSTAFFE, P. J., LINDSEY, A. S.: Fresenius J. Anal. Chem. **336**, 1990, s. 503
- [12] GRIMMER, G., BÖHNKE, H.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **58**, 1975, s. 725
- [13] CLAESSENS, H. A. et al.: Chromatographia **10**, 1991, s. 569
- [14] TUINSTRAL, L. G. M. T. et al.: Int. J. Environ. Anal. Chem. **14**, 1988, s. 147
- [15] FERNANDEZ, P. et al.: J. Chromatog. **456**, 1988, s. 155
- [16] LENÍČEK, J., et al.: Chem. Listy **87**, 1993, s. 852

Zpracováno na základě posteru
uvedeného na 19. PSD v Brně
Do redakce došlo 15. 1. 2002

Horák, T. – Jurková, M. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Využití gelové permeační chromatografie pro stanovení organických polutantů ve sladovnickém ječmeni. Kvasny Prum. **48**, 2002, č. 3, s. 58–61.

Byla vyvinuta metoda, která v rámci jednoho extrakčního kroku umožňuje stanovení devíti polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) – benzo(a)anthracenu, chrysenu, benzo(b)fluoranthenu, benzo(k)fluoranthenu, benzo(a)pyrenu, dibenzo(a,h)anthracenu, indeno(1,2,3-cd)pyrenu, dibenzo(a,i)pyrenu, dibenzo(a,h)pyrenu – a sedmi indikačních kongenerů polychlorovaných bifenyli (PCB) – kongenerů číslo 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180 – v rostlinných matricích, zejména v ječmeni a sladu. Postup stanovení zahrnuje popis extrakce a přečištění získaného extraktu pomocí metody gelové permeační chromatografie s využitím gelu na bázi polymeru styrendivinylbenzenu (Bio-Beads SX-3). Takto se získá extrakt o dostatečné čistotě pro stanovení jak PAH, tak PCB. Konečné stanovení PAH bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, stanovení PCB plynovou chromatografií s využitím detektoru

elektronového zachytu. Všechny analyty je možné stanovit v mikrogramových množstvích s relativní směrodatnou odchylkou < 25 %.

Práce obsahuje charakteristiky metody pro všechny stanovené látky a ukázkové chromatogramy.

Horák, T. – Jurková, M. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Application of Gel-Permeation Chromatography for Determination of Organic Pollutants in Brewing Barley. Kvasny Prum. **48**, 2002, No. 3, p. 58–61.

A method was developed that enables, within one extraction step, to determine nine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, dibenzo(a,i)pyrene, dibenzo(a,h)pyrene – and seven indicating congeners of polychlorinated biphenyls (PCB) – congeners of No. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180 – in vegetable matrices, mainly in barley and malt. The assay process includes the description of extraction and purification of

the acquired extract by means of the gel-permeation chromatography method with the use of gel on the basis of polymer of styrenedivinylbenzene (Bio-Beads SX-3). In this way an extract is obtained of sufficient purity for the determination of both PAH and PCB. The final assay of PAH was carried out by the method of high-efficient liquid chromatography and the assay of PCB by gas chromatography using the electron capture detector. All analytes can be set in microgram amounts with a relative authoritative deviation < 25 %.

The study contains characteristics of the method for all determined compounds and specimen chromatograms.

Horák, P. – Jurková, M. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Applikation der Gel-Permeationschromatographie zur Bestimmung der organischen Polutanten in der Braugerste. Kvasny Prum. **48**, 2002, Nr. 3, S. 58–61.

Es wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, in pflanzlichen Matrices, vor allem in Gerste und Malz, im Rahmen eines

Extraktionsschritt neun polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH): Benzo(a)anthracen, Chrysen, Benzo(b)fluoranthren, Benzo(k)fluoranthren, Benzo(a)pyren, Dibenzo(a,h)anthracen, Indeno(1,2,3-cd)pyren, Dibenzo(a,i)pyren, Dibenzo(a,h)pyren und sieben Indikationskongenere polychlorierter Biphenyle (PCB) – der Kongenere Nummer 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, zu bestimmen. Das Bestimmungsverfahren umfasst die Beschreibung der Extraktion und die Nachreinigung des gewonnenen Extraktes mittels der Methode der Gel-Permeationschromatographie mit Ausnützung des Gels auf der Basis des Polymers von Styrendivinylbenzen (Bio-Beads SX-3). So wird ein Extrakt von genügender Reinheit für die Bestimmung von PAH und auch PCB gewonnen. Die Endbestimmung von PAH wurde mittels der Methode der Hochwirkungs-Flüssigkeitschromatographie durchgeführt, die PCB-

Bestimmung durch Gaschromatographie bei Applikation der Detektors des Elektroneneinfangs. Alle Analyte können in Mikrogrammen mit einer relativen mittleren Abweichung < 25 % bestimmt werden.

Die Arbeit enthält Charakteristiken der Methoden für alle zu bestimmenden Substanzen und auch Beispiele von Chromatogrammen.

Горак, Т. – Юркова, М. – Чулик, Й. – Чейка, П. – Келлнер, В.: Использование пермеативной гелевой хроматографии для определения органических полутантов в солодорастильном ячмене. Kvasny Prum. 48, 2002, No. 3, стр. 58–61.

Byl разработан метод, позволяющий в рамках одного шага экстрагирования определить девять полициклических ароматических углеводородов (ПАУ): бензо(а)антрацен, хризен, бензо(б)флуорантен, бензо(к)флуорантен, бензо(а)пирен, дибензо(а,х)антрацен, индено(1,2,3-сд)пирен, дибензо(а,и)пирен, дибензо(а,х)пирен и семь индикаторных

конгенеров полихлорированных дифенилов (PCB): конгенеры номеров 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180 – в растительных матрицах, именно в ячмене и в солоде. Последовательность определения включает описание процесса экстрагирования и повторной очистки полученного экстракта при помощи метода гелевой пермеативной хроматографии с использованием геля на базе полимера стиренди-винилбензола (Bio-Beads SX-3).

Этим образом получается экстракт достаточной чистоты для определения как ПАУ, так и PCB. Окончательное определение ПАУ было проведено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, определение PCB методом газовой хроматографии с использованием детектора электронного захвата. Все аналиты можно определить в количествах микрограммов с относительным стандартным отклонением 25 %.

В работе приводятся характеристики метода для всех определяемых веществ и показательные хроматограммы.

VÝVOJ TEORIE A PRAXE KVAŠENÍ A DOKVAŠOVÁNÍ PIVA

DEVELOPMENT OF THEORY AND PRACTICE IN FERMENTATION AND SECONDARY FERMENTATION OF BEER

GABRIELA BASAŘOVÁ, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemickotechnologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Klíčová slova: pivo, kvasinky, kvašení, dokvašování

Key words: beer, yeasts, fermentation, secondary fermentation

OBDOBÍ OD DÁVNOSTI AŽ PO 19. STOLETÍ

Ve starých dobách neznali naši předkové existenci mikroorganismů, a tudíž i kvasinek, a jejich účast v alkoholovém kvašení. Kvašení piva se provádělo spontánně a sbírala se po prokvašení na hladinu vyplavená i u dna sedimentovaná „hmota“, u které zjistili, že je potřebná pro přeměnu mladiny na pivo. „Hmotu“ vyplavenou k hladině používali po proprání pro další várky svrchně kvašeného piva, které i na území dnešního našeho státu převládalo do 19. století. Se sedimentovaným podílem vyráběli méně rozšířený druh piva, podle současné terminologie označovaný jako spodně kvašené.

V 16. století v roce 1585 vyšla v latině kniha pojednávající o technologii sladu a piva. Byla to zřejmě první odborná kniha tohoto druhu na světě. Napsal ji profesor pražské univerzity, významný přírodovědec, astronom, geodet a osobní lékař císaře Rudolfa II. Tadeáš Hájek z Hájku (1525–1600) [1, 2]. Pro proces kvašení odvodil jakousi mechanickou teorii. Svrchní kvasnice popsal jako vzdušnou hmotu vynášenou k hladině, tu část kvasnic, která sedimentovala, jako hmotu zemitou a hrubou. Mladinu označil vlastnostmi těžká a vodnatá. Přeměnu mladiny na pivo vysvětlil pohybem těchto hmot, které na sebe narážely, vznikalo teplo a jeho vlivem se tvořila pěna. Vzdušná hmotu prudkým zmitáním třísila vodnatou hmotu čili mladinu na nejmenší částice, a ta tím získala vlastnosti piva.

V roce 1590 byl v Nizozemsku sestrojen mikroskop, který zdokonalil v roce 1650 A. Leeuwenhoek (1632–1723) a v roce 1680 poprvé ohlásil v pivu nálež kulovitých živých částic. Jednalo se zřejmě o kvasinky, ale jeho zjištění nebylo bráno v úvahu.

Historicky významné bylo oznámení A. L. Lavoisiera z roku 1785, že kvašení je rozklad cukru na ethanol a oxid uhličitý, a následně J. L. Gay-Lussacem (1778–1850) v roce 1810 formulovaná rovnice ethanolového kvašení, platná dodnes.

POZNÁNÍ BIOLOGICKÉ PODSTATY KVAŠENÍ A PŘECHOD NA VÝROBU SPODNĚ KVAŠENÝCH PIV V 19. STOLETÍ

V druhé polovině 19. století začala v tradičních pivovarských zemích v Evropě převládat výroba spodně kvašených ležáků, zvláště po úspěšném nástupu piva z Čech z Měšťanského pivovaru, založeného v Plzni v roce 1842.

Poznatky o významu mikroorganismů v alkoholovém kvašení se začaly v 19. století rychle rozvíjet [3, 4]. Prvním vědcem, který v roce 1837 vyslovil předpoklad o možné účasti živých mikroorganismů – kvasinek – v alkoholovém kvašení, byl Cagniard de La-
tour.

V roce 1839 T. Schwann (1810–1882) vyvinul hypotézu o závislosti růstu kvasnic na přítomnosti cukrů, které jsou pro ně živinou, a popřel při výrobě vína a hnilobných procesech potřebu kyslíku. Náзор o účasti mikroorganismů při kvašení zmiňovali významní chemici, např. J. Liebig či F. Wöhler v Německu nebo J. Berzelius ve Švédsku, kteří prohlašovali, že alkohol se tvoří z cukrů čistě chemickou cestou, v níž mají pouze mrtvé rozkládající se kvasinky určitou účast.

Spory vyřešil v roce 1857 francouzský vědec L. Pasteur (1822–1895). Prokázal, že kvašení je výsledkem biologického procesu metabolismu kvasinek [5]. V roce 1875 potvrdil schopnost kvasinek žít za nepřístupu vzduchu, čili anaerobní proces kvašení.

Základní význam měl experimentální důkaz bezbuněčného kvašení, který provedl v roce 1897 E. Buchner, a zahájil tím éru výzkumu významu enzymových reakcí při kvašení [10].

Následovala perioda objevů enzymatických reakcí až po glykolytickou cestu Emden-Meyerhof-Parnase a následně cykly. I počátky vědomostí o enzymech jsou spjaty s poznatkami o lihovém kvašení. Vůbec první enzym získal A. Payen a J. Persoz v roce 1833 z naklíčeného ječmene a dal mu název diastasa (tj. amylasa).

Dokonalé vědecké zhodnocení kvasných procesů a jejich praktický význam ve výrobě piva, vína, kvasného ethanolu, pekařského droždí a octa provedl profesor pražské techniky C. J. N. Balling (1805–1868) [6].

ZAVEDENÍ ČISTÝCH KULTUR KVASINEK PŘI VÝROBĚ PIVA V 19. STOLETÍ

Metodu izolace čistých kultur vypracoval nejdříve pro bakterie, následně pro kvasinky, v Dánsku v Carlsbergských laboratořích v roce 1881 E. Ch. Hansen (1842–1909). Čisté kultury zkoušel poprvé v pivovaru Carlsberg v roce 1883 [7]. Pivovary na území dnešní České republiky v té době již přešly na výrobu pouze spodně kvašených piv a velmi rychle zavedly propagaci a používání čistých kultur v praxi [8].

Do doby zavedení čistých kultur označil v roce 1837 berlínský botanik J. F. Meyen kvasinky názvem *Saccharomyces* (podle řečtiny: sacharos – cukr, mykes – houba), později *Saccharomyces cerevisiae* (cerevisiae – latinský název piva). Spodní kvasinky, které zavedl v roce 1845 v pivovaru Carlsberg Hansen, byly později na jeho počest nazvány *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen.