

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Vliv technologických parametrů výroby na kvalitu ciderů

Diplomová práce

Bc. Ondřej Špika

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Karel Štěrba, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv technologických parametrů výroby na kvalitu ciderů" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2023

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu Ing. Karlu Štěřbovi, Ph.D. za jeho vedení práce, odborné rady a věnovaný čas. Děkuji také panu Ing. Janu Táborskému, Ph.D. za jeho pomoc při analýze GC. Veliké díky patří panu Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D., bez jehož ochoty a věnovaného času by neproběhlo měření a vyhodnocení HPLC/MS. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu při studiu.

Vliv technologických parametrů výroby na kvalitu ciderů

Souhrn

Cidery patří mezi relativně nízkoalkoholické nápoje s dlouholetou tradicí, kterým se dostává stále se zvyšující popularity. Důvodem je levná a snadno dostupná vstupní surovina, kterou jsou jablka, případně hrušky. Dalším faktorem je relativně nenáročná výroba i v domácích podmínkách. V této diplomové práci jsou popsány jednotlivé kroky výroby včetně sklizně vstupní suroviny a metody jejího zpracování. Dále jsou popsány způsoby zacházení a ošetření moštu před fermentací a cideru po fermentaci. Nejsou opomenuty ani finální kroky vedoucí k tvorbě výsledného produktu.

Z analýz provedených v rámci této práce byly zjištěny určité rozdíly mezi cidery na základě vstupní suroviny a stylu fermentace. Měřeno bylo 8 vzorků ve 2 sadách s odstupem 7 měsíců. Hruškové cidery se oproti jablečným značně lišily svým zvýšeným obsahem ethylacetátu, propan-1-olu a butan-2-olu. Hruškové cidery měly též nižší celkový obsah fenolických sloučenin zapříčiněný významně nižším obsahem flavonoidů. Spontánně fermentované cidery pomocí divokých kvasinek byly intenzivněji zabarvené, měly mírně nižší pH a nižší obsah isobutanolu v porovnání s cidery fermentovanými kulturními (vinnými) kvasinkami. Rozdíl v obsahu celkových fenolických kyselin, jenž byl téměř dvojnásobný, se též podílel významnou měrou na odlišení výrobků. Vliv doby skladování se z důvodu designu experimentu prokázat nepodařilo.

Klíčová slova: kvašení, zrání, plynová chromatografie, řemeslná výroba, polyfenoly

Influence of technological parameters of production on the quality of ciders

Summary

Ciders belong to a group of relatively low-alcohol drinks with a long tradition, which are gaining ever-increasing popularity. The reason for that is the cheap and easily available raw material, which is apples or pears. Another factor is the relative ease of production, even under domestic conditions. This thesis describes the individual steps of production, including the harvesting of the raw material and methods of its processing. Methods of handling and treatment of the must before fermentation and the cider after fermentation are also described. The final steps leading to the creation of the finished product are not omitted.

From the analyses carried out as a part of this work, certain differences were found between ciders based on the input raw material and fermentation style. 8 samples were measured in 2 sets with an interval of 7 months. Compared to apple ciders, pear ciders differed significantly in their increased content of ethyl acetate, propan-1-ol and butan-2-ol. Pear ciders also had a lower total phenolic compounds content due to a significantly lower content of flavonoids. Spontaneously fermented ciders using wild yeast were more intensely coloured, had a slightly lower pH and a lower isobutanol content compared to ciders fermented with cultured (wine) yeast. The difference in the total content of phenolic acids, which was almost double, also played a significant role in differentiating the products. The effect of storage time could not be demonstrated due to the design of the experiment.

Keywords: fermentation, maturing, gas chromatography, craft production, polyphenols

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Legislativní definice cideru a perry v ČR	11
3.2	Historie cideru	11
3.3	Jablečný mošt a jeho výroba	12
3.3.1	Jablka jako základní surovina	13
3.3.2	Sklizeň a skladování jablek	14
3.3.3	Omytí a drcení jablek	15
3.3.4	Macerace drti	16
3.3.5	Lisování jablečné drti	16
3.3.6	Jablečný koncentrát	17
3.3.7	Složení moštu	18
3.4	Úpravy moštu před fermentací	19
3.4.1	Odkalení a číření	20
3.4.2	Míchání moštu	20
3.4.3	Přídavek živin	20
3.4.4	Měření a úprava cukernatosti	21
3.4.5	Úprava kyselin a síření moštu	21
3.5	Fermentace	22
3.5.1	Mikroorganismy uplatňující se při fermentaci	23
3.5.2	Změny obsahových látek vlivem fermentace	25
3.6	Zrání	27
3.7	Finální úpravy a lahvování	28
4	Materiál a metody	30
4.1	Popis vzorků	30

4.2	Senzorické hodnocení vzorků	31
4.3	Spektrofotometrická analýza s použitím činidla Folin–Ciocalteu	32
4.4	Měření titrační kyselosti a pH	33
4.5	Měření absorbance ve viditelném spektru.....	34
4.6	Plynová chromatografie	34
4.7	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	37
5	Výsledky.....	39
5.1	Senzorické hodnocení vzorků	39
5.2	Celkový fenolický obsah.....	43
5.3	Titrační kyselost a pH	44
5.4	Zabarvení vzorků	46
5.5	Plynová chromatografie	46
5.6	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	49
5.6.1	Analýza chromatogramů	49
5.6.2	Iontový profil vzorků.....	51
5.7	Vliv vstupní suroviny na měřené parametry	52
5.8	Vliv použitých kvasinek na měřené parametry	53
5.9	Vliv skladování na měřené parametry.....	54
6	Diskuze	55
6.1	Vliv použité vstupní suroviny.	55
6.2	Vliv použitého druhu kvasinek.	57
6.3	Vliv doby skladování.	59
6.4	Senzorická analýza a odchýlené hodnoty měření	60
7	Závěr.....	65
8	Seznam literatury	66
9	Seznam použitých zkratk	73
10	Seznam grafů	74

11	Seznam tabulek.....	75
12	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Výroba ciderů zkvašením jablečného moštu má napříč Evropským kontinentem několikatisíciletou tradici. Je to dáno především rozšířením jabloně domácí (*Malus domestica*), jejíž plody se staly levnou a dostupnou surovinou na výrobu alkoholických i nealkoholických nápojů. Výjimkou není ani Česká republika, kde má pěstování a šlechtění jabloní dlouholetou tradici. Ačkoliv je výroba ciderů relativně mladým odvětvím, co se České republiky týče, její obliba se neustále zvyšuje.

Dle statistik je tuzemský trh se cidery jedním z nejrychleji se zvětšujících v rámci Evropy. Perlivý cider je často příhodnou alternativou piva pro osvěžení během letních měsíců, zatímco tiché cidery si najdou své místo při kulinařských příležitostech, obdobně jako víno.

V České republice působí jak řada velkoproducentů zahraničních značek, tak i značné množství menších lokálních řemeslných výrobců. Zatímco velkovýroba si žádá uniformní výrobky a často pouze osvědčené variace, malovýrobci se díky svým výrobním podmínkám mohou snáze ponořit do experimentování a výroby netradičních, často velice zajímavých produktů. Komunikace a sdílení poznatků v rámci komunit řemeslných výrobců je jedním z hnacích motorů rozvoje tohoto odvětví. Informace často snadno dostupné na internetu poskytují podporu pro experimentujícího laika či začínajícího malovýrobce. Jedním z cílů této práce bylo v rámci spolupráce s řemeslným malovýrobce získání dosud neznámých informací o vlastnostech a změnách jeho produktů, které by mohly být přínosnými pro jeho budoucí výrobu.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem této práce je sepsání literární rešerše zabývající se problematikou výroby cideru a jeho kvalitativních parametrů a vypracování praktické části.

Literární rešerše obsahuje stručný popis historie, základního dělení a všech důležitých kroků při výrobě cideru.

Praktická část této práce se zabývá měřením rozdílů mezi jednotlivými druhy získaných vzorků ciderů na základě jejich odlišných parametrů výroby. Zjišťovány jsou též změny vybraných látek vlivem více jak půlročního skladování.

Byly stanoveny následující hypotézy:

- 1) Vzorky se budou statisticky významně lišit na základě použité vstupní suroviny.
- 2) Vzorky se budou statisticky významně lišit na základě použitého druhu kvasinek.
- 3) Vzorky se budou statisticky významně lišit na základě doby skladování.
- 4) Vliv skladování bude větší u vzorků nižšího celkového stáří.

3 Literární rešerše

3.1 Legislativní definice cideru a perry v ČR

V Českém zákoně je cider definován vyhláškou č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí, část třetí: ovocná vína, ostatní vína, cidr, perry a medovina. Cidrem nebo též ciderem je nápoj vyrobený úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvé nebo koncentrované jablečné šťávy nebo sušené jablečné šťávy, ke které byla přidána voda, nebo jejich směsi; přídavek vody, cukru a nejvýše 25 % objemových jiné šťávy, a to před i po kvašení. V případě perry nebo též hruškového cideru se jedná o nápoj vyrobený alkoholovým kvašením čerstvé nebo koncentrované hruškové šťávy nebo sušené hruškové šťávy, ke které byla přidána voda, nebo jejich směsi; přídavek vody, cukru a nejvýše 25 % objemových jiné šťávy. Aromatizace přírodními aromatickými látkami z ovoce je možná; přípustné je též přidání čerstvé nebo koncentrované jablečné šťávy po kvašení a upravení obsahu oxidu uhličitého jeho přidáním nebo částečným či úplným odstraněním; přípustné je rovněž použití sušených nebo koncentrovaných potravin přidávaných v průběhu výroby pro jejich barvicí účinek (Ministerstvo zemědělství 2018).

Příloha č. 5 k vyhlášce č. 248/2018 Sb. dále ustanovuje obsah etanolu v cideru a perry v rozsahu 1,2 až 8,5 % objemových a obsah těkavých kyselin nejvýše 1,4 g/l (Ministerstvo zemědělství 2018).

3.2 Historie cideru

Vzhledem k rozšířenosti jabloní napříč téměř celou Evropu a části Blízkého východu už v počátcích holocénu není možné přesně určit, kdo, kdy a kde začal jako první fermentovat jablečnou šťávu za účelem výroby alkoholického nápoje (Spengler 2019). Jedny z prvních zmínek o cideru, jenž se nám dochovaly, jsou z doby Julia Césara. Během Césarova válečného tažení proti Británii se jeho vojáci setkali s kelty, kteří fermentovali šťávu z původně se zde vyskytujících planých jabloní. Příchozí Římané s sebou naopak přinesli znalosti zahradnictví a sadařství včetně technik jako je řez a štěpování stromů (Watson 2013).

Po rozpadu Římské říše se během středověku tyto znalosti rozšířily po celé Evropě. Vzhledem k tomu, že většina jabloní v těch dobách pěstovaných byla ze semenáčů, kvalita jablek jimi plozených se značně lišila. Při objevení kultivaru s vhodnými vlastnostmi jablek pro přímou konzumaci či kulinářské vlastnosti byla snaha o jeho zachování pomocí vegetativního

množení. Jablka „2. kategorie“ ze semenáčů pak byla často používána právě pro výrobu cideru (Watson 2013).

Oblibě se cider těšil především v severozápadních oblastech Evropy, kdy v 14. století v Normandii se dostal na úroveň dostupnosti a popularity srovnatelné s pivem a vínem. V Anglii byl cider už v 12. století oblíben do té míry, že ho někteří využívali i jako platidlo za nájem či desátky. Během následujících století došlo k vývinu nových technologií a postupů pro drcení a lisování jablek, k zakládání řady sadů, čímž se postupně zvyšoval celkový objem roční produkce (Watson 2013).

Do Ameriky se jabloně dostaly spolu s prvními Evropskými kolonisty na počátku 17. století. Cider byl nejběžnějším nápojem usedlíků, jeho výroba byla téměř všudypřítomná a opět byl užíván i jako nástroj směny a platby. Vyrůstající popularitě byla první ranou průmyslová revoluce, kdy mnoho obyvatel opouštělo venkov za prací ve větších městech. Zde se navíc těšilo větší popularitě pivo přinesené imigranty z Irska a Německa. Pomyslným hřebíčkem do rakve pak byla prohibice v roce 1919 v USA, která drasticky poznamenala výrobu nejen cideru, ale i ostatních alkoholických nápojů. V posledních desetiletích se však výroba a konzumace cideru těší obnovené přízni a to nejen v USA, ale i v dalších částech světa, kde rok od roku roste jeho produkce (WSU Cider).

3.3 Jablečný mošt a jeho výroba

Jablečný mošt je základní složkou pro výrobu cideru, dle české legislativy musí tvořit minimálně 75 % objemu výsledného produktu (Ministerstvo zemědělství 2018). Je možné použít čerstvě lisovaný mošt, pasterovaný mošt či jablečné koncentráty, které jsou běžně využívány při průmyslové velkovýrobě. Vlastnosti moštu jsou závislé na odrůdě jablek, ze kterých je vyroben, přičemž jsou důležité podmínky pěstování – stejná odrůda za odlišných podmínek vydá různě kvalitní mošt (Mignard et al. 2022). Nejčastěji se volí kombinace různých odrůd pro dosažení požadovaných senzorických vlastností výsledného produktu, existují však i odrůdy vhodné pro výrobu jednodrůdového cideru. Odrůdy jablek jsou často děleny dle chuti, tradiční kategorie existují především ve Francii, Španělsku a Anglii, kde existuje historie pěstování původních odrůd na výrobu cideru (viz tabulka 1, tabulka 2, tabulka 3) (Jolicoeur 2013).

3.3.1 Jablka jako základní surovina

Pro výrobu cideru nejsou stolní odrůdy tradičními výrobci většinou doporučovány. Při jejich šlechtění je kladen důraz na velikost jablka a jeho vzhled, který motivuje zákazníka ke koupi v obchodě. Soomro et al. (2022) ale ukázali, že běžně dostupné stolní odrůdy jablek mohou být dostatečně dobrou alternativou pro výrobu cideru. Ciderové odrůdy jablek však oproti stolním odrůdám mohou mít až pětinasobný obsah taninů, což je žádoucím parametrem vzhledem k jejich funkci při utváření těla cideru, dávajíc nápoji svíravou až hořkou chuť (Kahle et al. 2005). Vysoký obsah cukrů je potřebný pro tvorbu dostatečného množství alkoholu. Kyseliny snižují pH cideru a chrání ho proti vzniku bakteriálních vad, avšak ve větším množství mohou pro řadu konzumentů představovat nepříjemný chuťový zážitek. V čerstvém moštu je kyselost maskována přítomností cukrů, po zkvašení ale může nastat u suchých ciderů příliš silná dominance kyselé chuti (Savant & McDaniel 2004).

Při výrobě jednodruhového cideru je potřeba zvolit takovou odrůdu, které má výše zmíněné tři parametry v potřebném poměru. Ze světových odrůd jsou takto používány například Dabinett, Major, Kingston Black či Yarlington Mill (Jolicoeur 2013).

Tabulka 1: Klasifikace jablek dle chuti v Anglii (Jolicoeur 2013, upraveno)

Třída	Kyselost (g/l kys. jablečné)	Taniny (g/l kys. tříslové)
Sharp (kyselá)	> 4,5	< 2
Bittersharp (hořkokyselá)	> 4,5	< 2
Bittersweet (hořkosladká)	< 4,5	> 2
Sweet (sladká)	< 4,5	> 2

Tabulka 2: Klasifikace jablek dle chuti ve Francii (Jolicoeur 2013, upraveno)

Třída	Kyselost (g/l kys. jablečná)	Taniny (g/l kys. tříslová)
Douce (sladká)	< 4	< 2
Douce amère (hořkosladká)	< 4	2–3
Amère (hořká)	< 4	> 3
Acidulée (lehce kyselá)	4–6	< 2
Aigre (kyselá)	> 6	< 2
Aigre amère (hořkokyselá)	> 6	> 3

Tabulka 3: Klasifikace jablek dle chuti ve Španělsku (Jolicoeur 2013, upraveno)

Třída	Kyselost (g/l kys. jablečná)	Taniny (g/l kys. tříslová)
Acida (kyselá)	> 6,6	< 1,45
Semiacida (lehce kyselá)	4,9–6,6	< 1,45
Dulce (sladká)	< 4,9	< 1,45
Dulce amarga (hořkosladká)	< 4,9	1,45–2
Amarga (hořká)	< 4,9	> 2

3.3.2 Sklizeň a skladování jablek

Sklizeň jablek probíhá v době dle požadavků pěstitele, zdali miní jablka co nejdříve zpracovat, nebo má v úmyslu dlouhodobější skladování. Stupeň zralosti jablek je zjišťován jodovou zkouškou na přítomnost škrobu (Tong 2018). Sklizeň samotná nejčastěji probíhá třesením celých stromů a zachytávání padajících plodů do plachet či na pásy. Tento způsob je často mechanizován a využíván ve velkosadech (Zhang et al. 2016). Pro menší pěstitele je těž možno uplatnit sklizeň třesením s opadáním jablek na zem a jejich následné sesbírání, ale v tomto případě je nutné rychlé zpracování poškozených plodů. Při česání s cílem dlouhodobého uskladnění je dbáno na co nejmenší poškození plodů, které je pak následovně možné skladovat do doby jejich optimální technologické zralosti. Před skladováním je nutné vyřadit poškozené a nahnilé plody, které by kontaminovaly větší objemy jablek a způsobily nechtěné ztráty. Případně je též možné použít fungicidní prostředky pro ochranu během skladování či řízenou atmosféru pro prodloužení skladovatelnosti (Grantina-Ievina 2015; Radenkova & Juhneva-Radenkova 2018). Tyto skladovací podmínky jsou však ekonomicky náročné a pro výrobu cideru se většinou nevyužívají, jelikož je ovoce často zpracováno v několikátýdenním časovém horizontu.

Během skladování jablek dochází k řadě procesů, které mění vlastnosti plodu jak na senzorické, tak technologické bázi (Madalina et al. 2016). Hlavní změnou je degradace zbytkového škrobu na jednodušší cukry, kdy obsah škrobu během skladování klesá průměrně o 2,4 mg za den (vztaženo na gram sušiny) (Doerflinger 2015). Tento biochemický jev je zásadní pro technologické zpracování jablek při výrobě alkoholu, jelikož dovoluje ze suroviny vytěžit maximum fermentovatelných cukrů. Je však nutné dát pozor na příliš dlouhé skladování, kdy vlivem přirozené respirace dochází k prodýchání cukerných zásob a k snížení celkového obsahu cukrů (Jolicoeur 2013). Carrín (2004) uvádí časový horizont 3 týdnů pro kompletní degradaci škrobu při pokojové teplotě.

Dalším z parametrů, jenž se mění během skladování a dozrávání jablek je jejich textura a s ní spojený obsah pektinu. Největší vliv na jeho obsah a změny během skladování má doba sklizně, po 6měsíčním skladování může jeho obsah klesnout až o 60 % (Radenkovs & Juhnevica-Radenkova 2017). Menší obsah pektinových látek usnadňuje lisovací proces a vzniklá šťáva má i po zfermentování větší čírost. Pokud mošt obsahuje velké množství pektinu, jehož přítomnost znamená větší riziko vzniku zákalu, je vhodný přídavek enzymu pektinázy, který pektin depolymerizuje na kyselinu galakturonovou (Sakai et al. 1993).

3.3.3 Omytí a drcení jablek

Před samotným drcením a lisováním jablečné drti je třeba jablka zkontrolovat, vytrídít nahnilé a značně poškozené plody. Kontrola a třídění se provádí spolu s mytím na poloautomatických linkách (Czech Brewery System s.r.o. 2019). U konzumních jablek typické vady typu strupovitosti nejsou na závadu, ba naopak někteří řemeslní výrobci cideru je mohou preferovat, jelikož vlivem strupovitosti dochází k snížení obsahu vody a zkoncentrování cukerných a kyselinových složek (Jolicoeur 2013).

Po vytrídění jablek následuje jejich mytí, kdy dochází k odstranění zbytků chemických postřiků, části nativní mikroflóry a pevných nečistot. Intenzita mytí, frekvence výměny vody a další parametry pak určují, jak efektivní bude odstranění divokých kvasinek a dalších mikroorganismů, které mohou spontánně fermentovat vylisovaný mošt (Abdelfattah et al. 2020). Jejich zachování však může být žádoucí, pokud je cílem mošt podrobit divoké fermentaci.

Vytríděná a očištěná jablka jsou následně drcena, kdy je cílem tvorba částic s rozměry pohybující se kolem 3 mm. Příliš velké částice neumožňují efektivní získání jablečné šťávy z jejich středu, a naopak příliš malé částice pak vytvářejí kašovitou směs, ze které se opět šťáva špatně získává a celkově tak klesá výtěžnost při lisování. Během drcení je žádoucí, aby semena zůstala neporušená, jelikož při jejich rozdrcení dochází k uvolňování nežádoucích látek, které způsobují nepříjemnou hořkou chuť (Jolicoeur 2013). Pro drcení ovoce se používá nejčastěji kladívkových, ozubených či jehlových mlýnků (Dobiáš 2004; Shanghai Beyond Machinery 2022). V moderních závodech zpracovávajících jablka jsou často instalovány linky kombinující třídění, mytí, drcení a lisování, přičemž celý proces probíhá kontinuálně.

3.3.4 Macerace drti

Nadrcené ovoce je možné ponechat uležet ve vlastní šťávě po krátkou dobu, kdy dochází k interakci řady látek s nativními jablečnými enzymy z poškozených buněk. Jejich vlivem je oxidována řada látek polyfenolické a lipidické povahy za produkce nových aromatických látek, dochází k enzymatickému hnědnutí a také k rozpadu pektinu vlivem jablečných pektináz. Ferreira Zielinski et al. (2014) ukázali, že působení enzymů zvyšuje množství fenolických sloučenin a celkovou antioxidační kapacitu vzniklého moštu.

Tento krok je však zpravidla vynecháván z důvodu časové náročnosti a nutnosti na další vybavení, jelikož jeho vliv není pro výrobce zásadní a ve výsledku je tedy neekonomický (Lea 2021). Při delší expozici se také zvyšuje riziko kontaminace hmyzem či větším množstvím prachových částic, jež mohou zanést do moštu nežádoucí bakterie a plísň.

3.3.5 Lisování jablečné drti

Základním principem lisování je aplikace tlaku přes porézní materiál, jenž umožní uvolnění a získání šťávy, zatímco pevný zbytek neprochází a je separován. Část ovocné šťávy již byla uvolněna během drcení, avšak většina zůstává stále uvnitř nepoškozených. Výťažnost lisování záleží na několika faktorech – na skladbě a struktuře suroviny, aplikovaném tlaku a poréznosti filtračního materiálu (Dobiáš 2004). Výťažnost lisování vztažená na hmotnost ovoce se pohybuje mezi 60 a 70 % (Wilczyński et al. 2019).

Košové lisy

Při výrobách o menších objemech se hojně využívají diskontinuální lisy košové, kde se ovocná drť vkládá do nerezového koše či koše z dřevěných latí stažených kovovými obručemi. Vnitřní objem koše může být vyložen plachetkou pro snížení množství drobných částic ve vylišované šťávě. Tlak je aplikován ve vertikálním směru pomocí lisovací hlavy pohybující se pomocí hydraulického pístu či šroubu se závitem. Tyto typy lisů jsou často nejlevnější alternativou. Další možností diskontinuálního lisování jsou pneumatické nebo hydraulické lisy využívající středového měchu, který je možno naplnit vzduchem případně vodou pod tlakem a aplikovat na ovocnou drť tlak ze středu ven proti poréznímu nerezovému koši. Aplikovaný tlak je větší než při použití manuálního lisování a poskytuje tak oproti šroubovému lisu větší výťažnost (Dobiáš 2004).

Balíčkové lisy

Nejrozšířenějším lisem ve středně velkých lisovnách jsou balíčkové lisy, u kterých se ovocná drť balí do plachetek a jednotlivé „balíčky“ jsou prokládány dřevěnými rošty. Tento typ lisování má tak oproti všem předchozím větší poměr plochy ku objemu, ze které může ovocná šťáva odtékat. Menší drenážní vzdálenost v kombinaci s použitím hydrauliky pro aplikaci tlaku znamená vyšší průměrné hodnoty výtěžnosti oproti ostatním typům lisů (Dobiáš 2004).

Sítopásové lisy

Hojně využívané v průmyslové velkovýrobě ale i v podnicích středních rozměrů jsou lisy sítopásového typu. Porézní pás nese vrstvu ovocné drtě, která je s postupně se zvyšujícím se tlakem stlačována soustavou válců. Výhodou je jednoduchost a kontinualita lisování, nevýhodou je menší výtěžnost a vysoká spotřeba vody potřebná pro soustavné čištění zanesených pásů (Dobiáš 2004).

Šnekové lisy

Výhodou tohoto lisu je jeho rychlost a plynulost a schopnost pojmout velké objemy naráz. Nevýhodou je menší výtěžnost, větší šance rozdrčení semínek plodů a celkově větší obsah drobných částic a kalů ve výsledném moštu, což znesnadňuje výrobu čirých šťáv (Dobiáš 2004).

3.3.6 Jablečný koncentrát

Alternativou pro malovýrobce a standardem pro velkovýrobce v nápojovém průmyslu je využití ovocných koncentrátů při výrobě. Jejich výhodou je nesporný ekonomický benefit transportu menšího množství materiálu a delší skladovatelnost koncentráту dle potřeby výroby. Nevýhodou je degradace senzoricky atraktivních či zdravotně prospěšných látek a pro konzumenta možná menší věrohodnost a autenticita než při použití neupravené vstupní suroviny. Použití koncentráту oproti čerstvému moštu může též znamenat odlišný průběh fermentace a tvorbu aromatických látek či nechtěných pachutí (Rosend et al. 2020).

Příprava jablečného koncentráту sleduje zpočátku obdobné kroky jako při standardní výrobě jablečného moštu. Po vylisování dochází k pasteraci a dearomatizaci v evaporační stanici při 95-105 °C. Dalšími kroky je depektinizace a ultrafiltrace, za nimiž následuje koncentrace. Před zchlazením a uskladněním je provedena standardizace, kdy výsledný obsah sušiny v koncentráту může dosahovat až 70 %. Finálním krokem je balení do spotřebitelských či přepravních obalů a distribuce (B&P Engineering 2023).

3.3.7 Složení moštu

Konkrétní složení a poměry jednotlivých obsahových látek je vždy závislé na použité odrůdě, ze které je mošt získáván. Průměrný obsah sušiny se pohybuje kolem 12 % hmotnosti, 11 % tvoří sacharidy. Mezi další významné složky patří kyseliny, dusíkaté látky, minerály a vitaminy, barviva, aromatické látky, třísloviny a vláknina (USDA 2019).

Sacharidy

Typicky jsou děleny na rozpustné cukry, nerozpustnou vlákninu a škrob. Podíl rozpustných cukrů v jablečné šťávě se v průměru pohybuje kolem 11 %. Z tohoto množství tvoří fruktóza 55-58 %, sacharóza 20-28 % a glukóza 16-23 % (Kearns et al. 2019). Obsah pektinu a škrobu v moštu je závislý na stupni zralosti, ve kterém bylo jablko vylisováno. Během skladování a dozrávání se zbývající škrob degraduje na fermentovatelné cukry (Doerflinger 2015). Příliš dlouhá doba skladování však vede k nechtěným ztrátám cukrů v důsledku aktivní respirace jablka (Turner 1949). Mezi množstvím sacharidů a kyselin v jablečném moštu existuje negativní korelace (Celik et al. 2018).

Kyseliny

Dominantní kyselinou v jablečném moštu je kyselina jablečná (2,7-8,5 g/l), následovaná kyselinou askorbovou (0,9 g/l) a jantarovou (0,6 g/l) (Eisele & Drake 2005; Ramos-Aguilar et al. 2017). Dle Jolicoeura (2013) je optimální množství kyselin v cidru evropského typu 4,5 – 6 g/l, čehož lze dosáhnout vhodnou kombinací sladkých, hořkých a kyselých odrůd.

Dusíkaté látky

Dle Alberti et al. (2011) je průměrný obsah dusíkatých látek v jablečném moštu přibližně 156 mg/l. Dusík je důležitý parametr ovlivňující kvalitu probíhající fermentace, umožňuje nárůst kvasinkové biomasy (Alberti et al. 2011). Nedostatek dusíku je jednou ze stresových podmínek pro kvasinky a má za následek zvýšenou produkci senzoricky neatraktivních látek, především sirovodíku. Kvasinkami využitelný dusík neboli asimilovatelný dusík, je především ve formě aminokyselin a amonných solí. Jolicoeur (2013) uvádí, že hodnoty v rozmezí 80–150 mg/l asimilovatelného dusíku jsou pro standardní průběh fermentace dostačující. Dusík spolu s fosforem je možné přidat před zahájením fermentace v podobě živných solí pro zajištění správného průběhu fermentace (Browin 2023).

Minerály a vitaminy

Jablečný mošt obsahuje řadu prospěšných minerálů a vitaminů, avšak spíše ve stopovém množství. Tyto látky jsou však důležité zejména pro metabolismus kvasinek, které zejména potřebují pro správné fungování jejich metabolismu vitaminy skupiny B (Hucker et al. 2016).

Barviva, aromatické látky a třísloviny

Tyto látky mají zásadní vliv na senzorické atributy jablečného moštu a výsledného cideru. Na aroma se podílí řada látek, z nichž část je přítomná již v surovém moštu a další část vzniká při fermentaci kvasinkami jako vedlejší produkty jejich metabolismu (Rosend et al. 2019). Největší vliv na obsah těkavých sloučenin má stav zralosti ovoce při jeho sběru, kdy zralé ovoce obsahuje až o 52% více aromatických látek než ovoce nezralé (Alberti et al. 2016). Mezi hlavní těkavé sloučeniny patří estery (78-92 %), alkoholy (6-16 %), aldehydy, ketony a ethery. Řada aromatických látek však vzniká až během zpracování a výroby cideru (Rita et al. 2011).

Třísloviny (taniny), které vyvolávají v ústech svíravou a hořkou chuť, poskytují výslednému cideru jeho tělo. Jejich obsah se v jablečném moštu pohybuje kolem hodnoty 0,26 g/l vyjádřené jako kyselina tříslová (Lea 2015). Taniny se řadí do polyfenolů, jenž se podílí na antioxidační aktivitě jablečného moštu a dávají mu též jeho zbarvení. Největší koncentrace polyfenolů se nachází ve slupce jablka, která tvoří kolem 7 % jeho hmotnosti. Řadí se mezi ně katechin, epikatechin, rutin a phloridzin (Łata et al. 2009).

Barva moštu a cideru je především dána přítomností fenolických sloučenin a stupněm jejich oxidace, kdy oxidované sloučeniny (především produkty oxidace epikatechinu, procyanidinu a phloridzinu) dávají moštu tmavě oranžové až hnědé zbarvení, redukované formy spíše do odstínů žluté (Lea 1992).

3.4 Úpravy moštu před fermentací

Vždy záleží na konkrétním výrobcí a jeho metodě, jaké postupy předfermentační úpravy moštu zvolí. Legislativa umožňuje přidavek vody či cukru, dále aromatizaci přírodními aromatickými látkami z ovoce. Toho se využívá pro nastavení požadované cukernatosti k dosažení finálního obsahu alkoholu, jenž však nesmí přesáhnout 8,5 % (Ministerstvo zemědělství 2018). Přídavek antioxidantů jako je oxid siřičitý je též standardem v ciderovém průmyslu převzatém z praktik ve vinařském průmyslu (Lea 2011). Dalšími častými praktikami je též odkalování moštu, úprava kyselosti, přidavek pektinázy či míchání jednodruhových moštů pro dosažení požadovaného poměru mezi kyselinami, cukry a taniny.

3.4.1 Odkalení a čiření

Ihned po vylisování obsahuje čerstvý mošt větší či menší množství nečistot a kalů v závislosti na použité technologii lisování a na síle, která byla během lisování aplikována. Pro odkalení moštu se nejčastěji využívá pasivní metody samovolného usazování částic – sedimentace. K usazování jemnějších kalů a kvasinek pak dochází přirozeně v posledních fázích fermentace, kdy je probublávání oxidem uhličitým již klidnější a též při zrání cideru v demižonech či tancích (Jolicoeur 2013). Další možností odstranění zákalu je využití čiřících přípravků, jakým je například bentonit – jílovitá hornina s dobrými sorpčními vlastnostmi (Saywell 1936). Proteiny a další nabitě částice se na ni dobře váží, dochází k jejich flokulaci a usazení na dně jako součást kalů (Eisenhour & Brown 2009).

3.4.2 Míchání moštu

V praxi jsou možné tři způsoby přístupu ke kombinování vlastností z jednotlivých odrůd jablek. První možností je zvolení poměru a množství jablek z jednotlivých odrůd před lisováním. Řada výrobců vlastníci sady tak již má zvolenou vhodnou kombinaci jabloní, které poskytují jablka ve vyváženém poměru (Lea 1995).

Míchání se též provádí po vylisování jednotlivých druhů jablek, kdy můžeme přesněji zvolit jednotlivé poměry pro dosažení požadovaných výsledných vlastností cideru. Nevýhodou míchání v této fázi je nemožnost odhadnutí změn některých látek, ke kterým může během fermentace moštu a jeho přeměny v cider dojít (Ye et al. 2014).

Poslední možností, jak dosáhnout požadovaných vlastností výsledného cideru, je míchání finálních ciderů z jednodrůdových moštů, čímž můžeme nejlépe dosáhnout cílené kvality. Zde se již nejlépe uplatňuje míchání na základě chuti, kdy se nepředpokládají výrazné změny v konečném chuťovém profilu cideru. Značnou nevýhodou může být nutnost separátní fermentace jednotlivých frakcí, a tudíž náročnost na vybavení a prostory (Lea 1995).

3.4.3 Přídavek živin

Kvasinky potřebují řadu důležitých živin a vitaminů pro namnožení své biomasy a pro správný průběh fermentace. Přirozenými zdroji těchto prvků jsou nativně se v moštu vyskytující bílkoviny a volné aminokyseliny uvolněné z destruovaných buněk jablka. Při nedostatku těchto živin, například po použití odkalovacích prostředků, je vhodné tyto nutrienty suplementovat. Pro dodání dusíku a fosforu je nejčastěji využíván hydrogenfosforečnan

diamonný, často označován zkratkou DAP (z anglického diammonium phosphate). Dostatek dusíku je předpokladem pro tvorbu vyváženého profilu aromatických látek, jeho přebytek však může vést ke zvýšené produkci (Vilanova et al. 2015). Současně s DAP jsou v některých komerčně prodávaných výživách pro kvasinky přítomny též vitamíny řady B, zejména pak vitamin B1 (thiamin) (Browin 2023). Ten je esenciální součástí řady enzymatických pochodů v rámci metabolismu kvasinek a jeho přidavek do moštu zvyšuje jejich životnost, jelikož kvasinky nejsou zatěžovány jeho syntézou a mohou ho volně přijímat z prostředí (Hucker et al. 2016; Labuschagne & Divol 2021).

3.4.4 Měření a úprava cukernatosti

Pro výpočet potenciálního finálního obsahu alkoholu v cideru je nutné před samotnou fermentací stanovit obsah cukru v moštu. Cukernatost je měřena za použití hustoměru či refraktometru. Hustoměry (ve vinařství cukroměry či moštoměry) udávají mírou ponoru v kapalině její hustotu (Jaywant et al. 2022). Na území České a Slovenské republiky se často používá československý normalizovaný moštoměr, který udává cukernatost ve stupních NM (°NM) (Ministerstvo zemědělství 2004). Pavloušek (2011) ve své knize uvádí, že 1 °NM představuje 1,053 kg sacharózy ve 100 l moštu.

Světově nejpoužívanějším instrumentem jsou refraktometry využívající Brixovu stupnici, kde 1 stupeň Brix (°Bx) odpovídá 1 gramu sacharózy rozpuštěné ve 100 g vody. Refraktometry měří cukernatost za využití lomu světla, kdy úhel lomu koreluje s obsahem rozpuštěných cukrů (Magwaza & Opara 2015). Přes vyšší pořizovací náklady oproti hustoměru je jeho značnou výhodou možnost stanovení z pouhé kapky roztoku, čehož je využíváno například k určení cukernatosti jablek přímo v sadech.

3.4.5 Úprava kyselin a šíření moštu

Organické kyseliny obsažené v jablečném moštu se významně podílejí nejen na výsledném senzoryckém dojmu, ale též hrají důležitou roli během fermentačních procesů. Jejich přítomnost ovlivňuje pH, které se u jablečného moštu pohybuje kolem hodnoty 3,6 (USDA). Nižší hodnoty působí negativně na kontaminující mikroflóru, brání jejímu rozvoji a chrání tak produkt před znehodnocením (Trioli 2010). Celkový obsah kyselin je možné rychle stanovit titrační metodou s použitím hydroxidu sodného, uvádí se pak v g/l jako kyselina jablečná (Jolicoeur 2013). Přírozenou metodou regulace kyselosti je vhodná kombinace jablečných odrůd. V nutných případech je možný přidavek zvolených kyselin (jablečné, citronové, vinné

a mléčné) v koncentrované formě pro snížení pH či neutralizace použitím uhličitanu vápenatého pro jeho zvýšení. Při řemeslné výrobě je někdy cider podroben malolaktické fermentaci, kdy bakterie odbourávají kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou a zjemňují tak celkovou vnímanou kyselost.

Přídavek oxidu siřičitého (SO_2 ; nejčastěji jako disiřičitan draselný v práškové formě) slouží k potlačení divokých kvasinek, bakterií octového a mléčného kvašení a jako antioxidační látka zlepšující stabilitu moštu (Tedesco et al. 2022). Kvasinky využívané ve vinařství jsou vůči SO_2 rezistentnější a používané dávky tolerují (Divol et al. 2012). Antimikrobiální efektivita SO_2 je závislá na hodnotě pH (nižší hodnoty znamenají vyšší efektivitu). Na kyselosti moštu tedy závisí optimální množství SO_2 pro dosažení žádoucího efektu (Lea 2011). Někteří řemeslní výrobci mohou zvolit kompletní vynechání přídavku oxidu siřičitého, v průmyslové výrobě se však jedná o standardní krok pro zajištění co největší stability a uniformity produktu.

3.5 Fermentace

Vylisovaný a upravený jablečný mošt se přepraví do připravených fermentačních nádob, ve kterých proběhne primární fermentace, případně pozdější zrání cideru. Používají se nádoby vyrobené ze skla (demižony), plastu či nerez. Dříve se hojně používaly dřevěné sudy, mají však větší riziko kontaminace cideru vzhledem k nízkému finálnímu obsahu alkoholu. Nerezové tanky jsou v dnešní době nejrozšířenějším typem ve velkých a středně velkých podnicích, menší výrobci využívají spíše demižonů a plastových fermentačních nádob především z důvodů jejich nižší pořizovací ceny a snazší manipulace (Jolicoeur 2013; Czech Brewery System s.r.o. 2023).

Fermentační nádoba musí být vybavena kvasnou zátkou umožňující únik vznikajícího oxidu uhličitého (CO_2), ale zároveň zabraňující vstupu kyslíku z vnějšího prostředí. Vhodné je též neplnit nádobu kompletně a ponechat vzduchovou kapsu nad tekutinou pro případ tvorby pěny během fermentace (Jolicoeur 2013).

Proces samotné biotransformace cukrů na alkohol je středobodem celé výroby cideru. Přirozeně se vyskytující kvasinky v původní mikroflóře ovoce či kvasinky z čistých kultur využívají zkvasitelné cukry přítomné v roztoku. Během fermentace jsou tvořeny ethanol, CO_2 spolu s řadou dalších více či méně žádaných vedlejších produktů. Stechiometrie chemické rovnice udává, že z 1 molu glukózy vzniknou 2 moly ethanolu a 2 moly CO_2 , ze 100 g glukózy tak můžeme získat 51,11 g ethanolu. Tyto hodnoty jsou však pouze teoretické, v reálné situaci je výtěžnost ethanolu 90-95 % v závislosti na využití pyruvátu pro buněčný růst (Munnecke

1981). Krom sacharidů jakožto zdroje uhlíku potřebují kvasinky také dusík a fosfor, jenž jsou esenciální pro růst a fungování jejich buněčného systému. Dalšími důležitými prvky jsou pak draslík a hořčík podporující tvorbu ethanolu (Dharmadhikari 2001; Ribeiro-Filho et al. 2022). Včasné rozmnožení a dominance kvasinek při fermentaci nepasterovaného a nesířeného moštu brání rozvoji bakteriální mikroflóry (především tvorbou anaerobního prostředí, ethanolu a kompeticí o nutrienty), která by během a po skončení fermentace mohla způsobit nežádoucí příchutě a pachy, pokud by bylo dovoleno její pomnožení (Bartowsky 2009).

Teplotní rozsah fermentace je poměrně variabilní, záleží na daném kmeni kvasinek a na požadavcích výrobce. Povětšinou se pohybuje v rozmezí 12-20 °C, existují však kmeny tolerující vyšší i nižší teploty (Magalhães et al. 2017; Dippel et al. 2022). Při vyšších teplotách probíhá fermentace rychleji a bouřlivěji. Dochází ke zvýšené produkci aromatických látek, které však nemusí být senzorycky atraktivní (především vyšší alkoholy) (Van Gheluwe et al. 1975; Fairbairn et al. 2014). Nižší teploty vedou k pomalejší a klidnější fermentaci, též je podporována produkce esterů a dalších senzorycky aktivních látek (Shi et al. 2022). Nižší teplota spolu s nižší intenzitou probublávání vznikajícím CO₂ snižuje ztráty aromatických látek během fermentace (Mouret et al. 2012).

3.5.1 Mikroorganismy uplatňující se při fermentaci

Nepasterovaný jablečný mošt obsahuje pestrrou mikroflóru tvořenou především kvasinkami a bakteriemi pocházejícími jak z původního ovoce, tak z výrobních povrchů, se kterými přijde ovoce a mošt při výrobě do kontaktu. Fermentaci za využití těchto mikroorganismů nazýváme spontánní fermentací a může započít již během několika hodin při teplotách nad 10 °C (Cousin et al. 2017). V případě využití vyšlechtěných kvasinek (často současně spojeno se šířením pro potlačení nativní mikroflóry) hovoříme o fermentaci čistými kulturami (Calugar et al. 2021).

Kvasinky

Až na výjimky tvoří kvasinky nedílnou součást výroby naprosté většiny alkoholických nápojů (Obire 2005). Oblastní různorodosti ve složení populací divokých kvasinek se podílí na vzniku unikátních senzoryckých profilů pro danou oblast, tzv. terroir. Morrissey et al. (2004) rozdělili tradiční výrobu Irského cideru do 3 fází na základě dominantních druhů kvasinek. Ovocné mikroflóre dominují kvasinky *Kloeckera/Hanseniaspora uvarum*, během fermentace *Saccharomyces cerevisiae* (pocházející z kontaktu s výrobním zařízením) a během zrání kvasinky rodů *Dekkera* a *Brettanomyces*. Valles et al. (2007) identifikovali v cideru

pocházejícím z oblasti Asturie (Španělsko) druhy *S. cerevisiae*, *S. bayanus* (při použití tradičního lisování), *Metschnikowia pulcherrima* a rod *Hanseniaspora* (při použití pneumatického lisování). Rod *S. bayanus* dominoval v počátku a během fermentačních procesů, *S. cerevisiae* se uplatňoval především ve finálních fázích. Coton et al. (2006) při analýze Francouzských ciderů identifikovali 15 druhů kvasinek (tabulka 4), mezi hlavní patřily *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *L. cidri* a *D. anomala*.

Tabulka 4: Identifikované druhy kvasinek během výroby cideru (Coton et al. 2006, upraveno)

Druhy kvasinek	% izolovaných	Druhy kvasinek	% izolovaných	Druhy kvasinek	% izolovaných
<i>Candida oleophila</i>	1,0	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	3,5	<i>Pichia delftensis</i>	3,5
<i>Candida sake</i>	0,5	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	6,5	<i>Pichia misumaiensis</i>	1,5
<i>Candida stellata</i>	1,5	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,0	<i>Pichia nakasei</i>	1,5
<i>Candida tropicalis</i>	1,0	<i>Lachancea cidri</i>	15,0	<i>Saccharomyces bayanus</i>	34,5
<i>Dekkera anomala</i>	10,5	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16,0

Při fermentaci čistými kulturami kvasinek jsou používány průmyslově produkováné specifické kultivary kvasinek, které jsou dostupné v široké škále pro konkrétní požadavky výrobce. Jejich použití především při průmyslové velkovýrobě zajišťuje kontrolovaný a téměř identický průběh fermentace. Jsou známy jejich biologické pochody, teplotní tolerance, odolnost proti alkoholu a SO₂ či úroveň produkce SO₂ jimi samotnými. Kvasinky jsou nejčastěji prodávány v sušeném (lyofilizovaném) stavu nebo jako tekuté kvasinky (roztok kvasinek v ochranné tekutině). Mezi světoznámé značky patří například Fermentis SafCider™ (Fermentis 2023) nebo Wyeast™ (Wyeast Laboratories Inc. 2023a). Jejich použití včetně ideálních podmínek fermentace záleží na doporučeních výrobce.

Bakterie

Bakterie mají pro cider pozitivní i negativní význam. Na jedné straně jsou to bakterie způsobující kažení cideru, především bakterie octového a mléčného kvašení. Na straně druhé pak bakterie jablečno-mléčného kvašení (také malolaktická fermentace, MLF), schopné přeměnit kyselinu jablečnou na jemnější kyselinu mléčnou.

Vzhledem k typicky nižšímu obsahu alkoholu v cideru oproti vínu v něm dokáže přežít větší množství bakterií, které se mohou podílet na kažení cideru především během jeho zrání a skladování. Splittstoesser (1982) uvádí bakterie mléčného kvašení jakožto hlavní původce kažení cideru, především pak *Lactobacillus plantarum*, *L. mali*, a *L. collinoides*. Carr, Whiting (1971) zmiňují v rámci octových bakterií *Acetobacter xylinum*, *Ab. mesodysans*, *Ab. rancens* a *Ab. aceti*. U ciderů a perry s nízkým obsahem kyselin a dostatečně vysokým obsahem cukrů může docházet k rozvoji bakterií rodu *Zymomonas* rozkládající glukózu a fruktózu Entner-Doudoroffovou drahou, produkující acetaldehyd, ethanol, CO₂ a způsobující mírný zákal (Millis 1956; Splittstoesser 1982).

Podrobení cideru malolaktické fermentaci může být pro některé výrobce žádoucím krokem při kterém dochází ke snížení kyselosti, zlepšení stability a chuti cideru. Bakterie pro zajištění MLF jsou často součástí původní jablečné mikroflóry, případně je možné zakoupit přípravky tyto bakterie obsahující (Wyeast Laboratories Inc. 2023b). MLF při vhodných podmínkách nastává ke konci alkoholové fermentace v závislosti na teplotě, pH, obsahu SO₂ a dostupnosti živin. Podílejí se na ní bakterie rodů *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, nej důležitější roli však hraje druh *Oenococcus oeni* (Zhang & Lovitt 2006). MLF bakterie však mohou produkovat také senzorycky nežádoucí látky, například při metabolizaci kyseliny citrónové dochází k produkci diacetylu, jenž má za následek aroma připomínající žluklé máslo (Calugar et al. 2021). Fakt, že MLF bakterie mohou vést i ke zhoršení kvality cideru, může mít za následek jejich občasné řazení k bakteriím způsobujícím kažení cideru.

3.5.2 Změny obsahových látek vlivem fermentace

Pro senzoryckou atraktivitu cideru je kromě produkce ethanolu důležitá tvorba a přeměna řady látek, které ovlivňují výslednou kvalitu produktu pozitivně i negativně. Na utváření finálního aromatického profilu se podílí kombinace látek pocházejících z původního jablečného moštu a z fermentujících mikroorganismů, jejich metabolitů a buněčného materiálu odumřelých buněk (Rita et al. 2011).

Nejdůležitějšími aromatickými látkami jsou estery, především pak ethyl-acetát (Xu et al. 2006). Estery mají na svědomí aroma různých druhů ovoce, ve zvýšeném množství však mohou způsobit nepříjemný zápach po ředidle (Cousin et al. 2017). Dle Rita et al. (2011) patří mezi nově vznikající aromatické látky butylester a hexylester kyseliny octové, ethylester kyseliny kaprinové, kyselina kaprinová a kyselina kaprylová. Kyselinu octovou, fenylethylalkohol a 3-methyl-1-butanol uvádí jako hlavní aromatické produkty metabolismu

kvasinek. Dochází také ke ztrátám látek původně přítomných v čerstvém jablečném moštu, například aldehydy hexanal a 2-hexenal nebo 2-hexen-1-ol. Příklady aromaticky významných látek a jejich příslušné aroma jsou uvedeny v tabulka 5.

Tabulka 5: Aromaticky aktivní těkavé látky v cideru (Rosend et al. 2019, upraveno)

Aroma	Sloučenina
Jablečné	1-propanol, ethylester kyseliny 2-methylbutanové, ethylester kyseliny dekanové
Ananasové	ethylestery kyselin propionové, butanové, 3-methylbutanové a hexanové
Banánové	3-methyl-1-butanol, butyl acetát, ethylestery kyselin hexanové a oktanové
Růžové	fenylacetaldehyd, fenylethyl acetát, fenylethanol
Citrusové	2-ethyl-1-hexanol, 1-oktanol, oktanal
Ovocné	ethyl acetát, methylester kyseliny 2-methylpropanové

Další významnou složkou jsou sírné sloučeniny, které kvasinky produkují často v souvislosti se stresovými podmínkami během fermentace. Tyto sloučeniny jsou senzoricky velmi aktivní, zapáchají po zkažené zelenině či zkažených vejcích. Patrignani et al. (2016) detekovali methanthiol, dimethylsulfid, dimethyldisulfid, dimethyltrisulfid, 3-methylthiopropanol, ethyl 3-methylpropanoát a 4-isopropylthiofenol jakožto produkty kvasinkového metabolismu. Sulfan (H_2S), který je častou nežádoucí složkou aroma cideru, je produkován kvasinkami především v důsledku nedostatku dusíku. Pozorován byl ale také vliv nízké hladiny vitaminů a iontů kovů, nevhodné teploty či přídavek SO_2 (Song et al. 2020). Důležitým parametrem je též použitý kmen kvasinek (Kumar et al. 2010). Výzkum mexických vědců v minulém roce objevil novou skutečnost, že kvasinkami produkováný H_2S slouží jako regulátor energetického metabolismu. Endogenně akumulovaný H_2S pak zvýšil produkci ethanolu a ATP během fáze exponenciálního růstu (Espinoza-Simón et al. 2022).

Ke změnám dochází také v rámci fenolických sloučenin, které hrají důležitou roli v senzorickém vjemu výsledného produktu. Větší molekuly (prokyanidiny) přispívají spíše ke svíravosti cideru, menší molekuly pak k hořkosti. Těkavé fenolické sloučeniny vznikající enzymatickou dekarboxylací pak přispívají k celkovému aroma cideru (Cousin et al. 2017).

Mezi vedlejší produkt fermentace patří také glycerol. Ten má nasládlou chuť, přispívá k plnosti cideru a ovlivňuje intenzitu jeho chuti. Je produkován kvasinkami pro vyrovnávání

osmotického tlaku za stresových podmínek a pro udržení cytosolického redoxního potenciálu (Zhao et al. 2015).

3.6 Zrání

Po dokončení primární fermentace, která může trvat od několika málo dnů až po několik týdnů, je mladý cider často stočen z kalů a umístěn do nové nádoby. V této fázi dochází ke zrání cideru, rozvoji chuti a aroma vlivem chemických a biochemických pochodů včetně případné malolaktické fermentace. Délka zrání se liší dle požadavků výrobce, většinou trvá několik měsíců. V této fázi již nedochází k aktivní produkci CO₂ (vyjma v důsledku MLF), který by chránil cider před oxidací. Absence probublávání též dává možnost usazení jemnějších kalů (Jolicoeur 2013).

Uskladnění cideru během zrání je možné v nádobách z několika různých materiálů, nejčastěji se využívají skleněné demižony, nerezové tanky či dřevěné sudy. Použití plastových tanků je možné, ale spíše nedoporučované, zejména z důvodu částečné permeability materiálu pro kyslík, který by časem difundoval z okolí do cideru a zvyšoval tak riziko znehodnocení. Důležitá je též minimalizace kontaktní plochy mezi tekutinou a vzduchem nad ní případným doplněním nádoby ze zásob cideru (Jolicoeur 2013). V případě použití skleněných nádob je důležité skladování v temných prostorách pro zamezení degradace látek vlivem světla (Grant-Preece et al. 2017). Teplota v průběhu zrání se u řemeslných ciderů vyráběných v Anglii pohybuje kolem 15 °C, ve Španělsku kolem 22 °C a ve Francii mezi 10-15 °C (Johansen 2010).

Pro zrání je možné využít dřevěných barelů, kdy látky obsažené v cideru mohou interagovat s dřevem za tvorby nových aromatických látek. Často též dochází k uvolňování aroma samotného dřeva, popřípadě aroma alkoholického nápoje, pro jehož zrání byl barel dříve použit. Alternativou ke zrání v sudech za účelem aromatizace je použití dřevěných vloček, které jsou vloženy přímo do tekutiny pro vylouhování žádaných látek. Rodríguez Madrera, Lobo, Alonso (2010) zjistili při zrání ve dřevěných barelech zvýšené množství esterů kyselin mléčné, octové a jantarové. Došlo také k navýšení obsahu butan-2-olu, 2-propen-1-olu, 4-ethylgajakolu a eugenolu vlivem bakteriální mikrobioty. Lachowicz et al. (2019) uvádí, že skladování při 4 °C po dobu 3 měsíců mělo vliv na hladiny fenolických kyselin a flavan-3-olů.

3.7 Finální úpravy a lahvování

Finální úpravy předcházející stočení cideru do lahví či sudů mohou zahrnovat některý anebo všechny z následujících kroků. Jejich použití a kombinace vždy záleží na výsledném druhu cideru, který se výrobce snaží vyrobit.

Síření

Za účelem zachování mikrobiální stability a pro předejití nechtěných změn během zrání a skladování cideru přidávají někteří výrobci SO₂. Přesné množství, které je nutné přidat, se odvíjí od obsahu látek schopných SO₂ navázat a snížit tak jeho aktivní volné množství. Lea (1995) pak doporučuje přidání 50 ppm SO₂ pro dosažení 30 ppm volného SO₂.

Čiření a filtrace

Dodatečné čiření za pomoci bentonitu či jiného prostředku je vhodné použít, pakliže nedošlo k dostatečnému usazení jemných kalů a cider je stále zakalený (Boulton et al. 1999; Eisenhour & Brown 2009). Pro odstranění koloidních částic je též možné využít filtrace. Typicky je filtrace použita v případě záměru odstranit z produktu zbytky kvasinek, jejichž přítomnost může být pro výrobce nežádoucí (Catania et al. 2011).

Míchání a dochucení

Ve fázi před stočením do lahví je častým krokem míchání ciderů z několika různých várek pro dosažení žádaných organoleptických vlastností. Je možné upravit hladinu alkoholu a kyselin, přidat cukry (zkvasitelné i nezکvasitelné) v surové podobě nebo jako součást ovocné složky (max 25% celkového objemu jde-li o jiné ovoce než původní surovina), či aromatizovat cider přírodními aromatickými látkami (Lea 1995; § 11 vyhlášky č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí - znění od 01.12.2018).

Stáčení a lahvování

Filtrovaný, ochucený či namíchaný cider je stočen do připravených vymytých lahví či sudů. Nejčastěji používané velikosti lahví jsou 0,25l, 0,33l, 0,5l či 0,75l opatřené korunkovou zátkou nebo 0,75l uzavřené korkem. Výběr vhodné lahve záleží především na její odolnosti vůči tlaku při použití pro sycený cider (Jolicoeur 2013).

Sycení CO₂

Sycené nápoje se těší značné oblibě, dodávají nápoji říz a pocit osvěžení. CO₂ je do cideru možné dostat 2 základními přístupy. Prvním je sycení v tanku či jiné tlakové nádobě za použití externího zdroje CO₂ (tlakové láhve) a následné isobarické plnění nasyceného nápoje

do lahví (Shanghai Beyond Machinery 2023). Tento přístup je využíván v moderních velkokapacitních produkčních linkách, které disponují potřebným vybavením. Druhou možností je přirozené sycení v uzavřené láhvi, kdy kvasinky (nově dodané či přetrvávající původní) fermentují nově přidané cukry a produkují CO₂, kterému však není dovoleno uniknout a dochází tak k rozpuštění plynu v kapalině a nárůstu tlaku (Štulíková et al. 2020). Je však nutné vypočítat množství vzniklého CO₂, a tedy i přidaného cukru, aby nedošlo k příliš vysokému nárůstu tlaku a případné explozi lahve. Při nadbytku cukrů může být cider po dosažení potřebné úrovně nasycení pasterován, čímž jsou fermentující kvasinky usmrceny a je tak zachován zbytkový cukr (Steinmeyer 2020).

Pasterace

Alternativou filtrace pro zbavení cideru živých kvasinek je pasterizace, která je však typicky prováděna až po stočení a lahvování. Pro pasteraci je možné využít vsádkových nebo tunelových pasterů (PRO Engineering/Manufacturing Inc. 2021). Pro spolehlivou inaktivaci kvasinek se při vsádkové metodě vodní lázeň postupně zahřívá do dosažení požadované teploty, která je následně udržována. Standardně se používá teplota 63 °C po dobu 30 min, což má za následek inaktivaci všech mikroorganismů (Garland & Donahue 1998). Pasterace zajišťuje větší stabilitu a prodlužuje dobu skladovatelnosti, má však negativní vliv na antioxidační aktivitu cideru, především na hladiny vitamínu C a celkového obsahu fenolických sloučenin (Techakanon & Sirimuangmoon 2020).

4 Materiál a metody

Praktická část práce se věnuje porovnání rozdílů mezi různými druhy ciderů dle jejich technologie výroby a vlivu více jak půlročního skladování na jejich kvalitu. U všech vzorků bylo provedeno senzorické hodnocení, spektrofotometrické měření celkového fenolického obsahu pomocí činidla Folin–Ciocalteu (FC), stanovení pH a titrační kyselosti, měření těkavých látek pomocí plynové chromatografie (GC) a stanovení fenolických profilů jednotlivých ciderů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (HPLC/MS).

4.1 Popis vzorků

6 z 8 vzorků bylo získáno od firmy Cidérka Lobeč s.r.o. vyrábějící od roku 2018 cider pod značkou „BACHA!“. Jejich výroba si zakládá na pomalé fermentaci a dlouhé době zrání jak ve zracích tancích, tak i po stočení v lahvích. Zaměřují se především na spontánně kvašené cidery, jejich jablka a hrušky z převážné části pocházejí ze starých zámeckých sadů postupně doplňovaných o nové stromy. Jablka jsou zpracovávána na repasované německé lince Hollman vyrobené v roce 1957 (elektrický drtič a balíčkový lis dohromady jako jeden stroj; viz příloha 4) ve výrobních prostorách bývalé pily a truhlárny původně patřící k zámku Lobeč (Cidérka Lobeč s.r.o.). Fermentace a zrání probíhá v nerezových a plastových tancích s plovoucím víkem (viz příloha 5), skladování hotových ciderů pak ve skladu, který je během letních měsíců klimatizován na průměrnou teplotu kolem 8 °C. První série vzorků byla od výrobce získána 26.3.2022 a druhá 16.1.2023. U všech vzorků se jednalo o 750ml lahve opatřené korunkovou zátkou s konkávním dnem pro vyšší odolnost vůči vnitřnímu tlaku. Vzorky byly do doby senzorické analýzy skladovány v chladničce.

2 z 8 vzorků jsou vlastní výroby v převážně domácím prostředí. Jablka použita na výrobu ciderů pocházejí ze šlechtitelské stanice ústavu experimentální botaniky AV ČR ve Strážovicích (IEB Apple Breeding 2020). Jedná se o směs konzumních jablek tradičně nevyužívaných pro výrobu cideru. Zpracování jablek proběhlo v říjnu 2021 v Moštárně Mokřý využívající elektrický drtič jablek a balíčkový lis. Fermentace a zrání proběhly ve skleněných demižonech různých objemů ve sklepě s průměrnou roční teplotou pohybující se mezi 10–15 °C. Lahvování proběhlo v dubnu a květnu, pro vznik přirozeného nasycení CO₂ bylo do cideru přidáno 8 g sacharózy na litr. Vzorky byly odebrány ze sklepů vždy s několikadenním předstihem a do doby senzorické analýzy skladovány v chladničce. V případě dubnového

cideru se jednalo o 750ml lahve (stejného typu jako uvedeno výše), v případě květnového o lahve o objemu 500 ml (pivního typu). Informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v tabulce níže (tabulka 6).

Jelikož se jedná o vzorky vyrobené malovýrobcem za běžného provozu bez vedení detailních záznamů, nejsou známy všechny podrobnosti jejich výroby.

Tabulka 6: Seznam vzorků a jejich popis

NÁZEV CIDERU	POUŽITÁ SUROVINA	KVASINKY	DATUM VÝROBY (LAHVOVÁNÍ)	SÍŘENÍ	PASTERIZACE
Giganti	směs jablek od silnice	Vinné (Oenoferm)	2018 (2019)	ano	ne
Virgin Biohazard	odrůda Panenské české, kvašený na slupkách	Divoké	2020 (2021)	ne	ne
LP 18	hrušky ze stromu u cesty	Vinné (Oenoferm)	2018 (2019)	ne	ne
Kožená Reneta	odrůda Kožená reneta	Divoké	2020 (2021)	ne	ne
Nonneta	odrůda Matčino	Vinné (Oenoferm)	2018 (2019)	ano	ne
Letní Biohazard	odrůda Průsvitné letní	Divoké	2020 (2021)	ne	ne
Vlastní cider (duben)	směs jablek ze stanice Střížovice	Vinné (BS1 – muškát)	2021 (začátek dubna 2022)	ne	ne
Vlastní cider (květen)	směs jablek ze stanice Střížovice	Vinné (BS2 – aromatické)	2021 (začátek května 2022)	ne	ne

4.2 Senzorické hodnocení vzorků

Senzorické hodnocení proběhlo celkem dvakrát na dvou sadách vzorků. První bylo uskutečněno 31. května 2022 a které se účastnilo 12 hodnotitelů, druhá 18. ledna 2023 s účastí 13 hodnotitelů. Hodnocení proběhlo v prostorách fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity za pomoci studentů a zaměstnanců fakulty.

Vzorky byly podávány vychlazené s teplotou pohybující se mezi 7-10 °C v plastových kelímcích o objemu 20 ml, k dispozici byla čistá voda. Hodnotitelé přiřazovali bodové ohodnocení ve škále 1-10 bodů ve příslušných kategoriích dle intenzity daného parametru, toto hodnocení zapisovali do poskytnuté tabulky (viz tabulka 7). Každý hodnotitel měl možnost uvést dodatečné poznatky, například typ zaznamenaného aroma či pachutě. Výsledky byly zpracovány v programech Microsoft Excel a PanelCheck (verze 1.4.2; Oliver Tomic, Henning Risvik).

Po ohodnocení v rámci první (květnové) série bylo zbývající množství vzorků zamraženo v 50ml lahvičkách a uschováno v mrazničce. Zbývající množství vzorků z druhé

(lednové) série bylo po senzorickém analyzování přelito do 250 ml lahví, zavíčkováno a uschováno v ledničce do doby analýzy laboratorními metodami, které proběhly současně pro obě série vzorků v průběhu února a března 2023.

Tabulka 7: Bodovací tabulka pro senzorické hodnocení

Senzorická analýza vzorků ciderů

Datum: _____ Jméno: _____

číslo vzorku	vůně / aroma			chuť				celkový dojem	Poznámky (např. zaznamenaná příchutě či aroma [citrusové, ananasové, banánové, etc.]):
	intenzita	intenzita sirného aroma	příjemnost	trpkost	kyselost	sladkost	alkohol		

4.3 Spektrofotometrická analýza s použitím činidla Folin–Ciocalteu

Za účelem porovnání celkového fenolického obsahu korespondující s antioxidační aktivitou byly vzorky podrobeny spektrofotometrické analýze za použití činidla Folin–Ciocalteu.

Použité přístroje

UV-VIS spektrofotometr Helios gama (Thermo Spectronic)

Příprava vzorků a kalibrační řady

Kalibrační řada byla připravena vytvořením zásobního roztoku kyseliny gallové (Fluka Analytical TraceCERT ®) o koncentraci 200 mg/l rozpuštěním 10 mg v 50 ml destilované vody. Následným ředěním se připravilo 5 kalibračních stupňů (100, 50, 25, 10 a 5 mg/l).

V 50ml odměrných baňkách bylo smícháno 2 ml každého vzorku a zásobních roztoků kalibračních stupňů s 2,5 ml FC činidla (PENTA) a 7,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného (Lach-Ner s.r.o. P.A.). Poté byly směsi doplněny destilovanou vodou do celkového objemu 50 ml. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem, avšak namísto 2 ml vzorku byla použita destilovaná voda. Takto připravené vzorky byly ponechány 2 hodiny při pokojové teplotě.

Měření a vyhodnocení vzorků

Vzorky byly proměřeny na spektrofotometru při 765 nm proti slepému vzorku. Před měřením byly vzorky ciderů ještě naředěny 1:2 (v/v) destilovanou vodou. Vyhodnocení proběhlo pomocí programu Microsoft Excel a STATISTICA (verze 12; StatSoft, Inc.). Z měření kalibračních stupňů byla sestavena kalibrační křivka (viz příloha 1).

Výpočet

Koncentrace kyseliny gallové v jednotlivých vzorcích byla vypočítána na základě rovnice kalibrační křivky a ředění během přípravy vzorku.

$$c = \left(\frac{A - 0,0039}{0,0015} \right) * k$$

c = koncentrace kyseliny gallové (mg/l)

A = naměřená absorbance vzorku

k = koeficient ředění

4.4 Měření titrační kyselosti a pH

Použité přístroje

Stolní pH metr (SCHOTT)

Příprava činidla

Pro stanovení titrační kyselosti byl použit 0,1M roztok hydroxidu sodného (NaOH). Ten byl připraven rozpuštěním 2 g NaOH (Lach-Ner s.r.o. P.A.) v 500 ml destilované vody.

Měření a vyhodnocení vzorků

Titrováno bylo vždy 10 ml vzorku za přidání 30 ml destilované vody a indikátoru fenolftaleinu do stabilního růžového zbarvení. Každý vzorek byl stanoven minimálně 3krát a výsledky byly zprůměrovány.

Hodnota pH byla změřena pomocí digitálního pH metru. Po ustálení byla číselná hodnota s přesností na 2 desetinná místa odečtena z displeje a zaznamenána.

Vyhodnocení proběhlo pomocí programu Microsoft Excel.

Výpočet

Množství kyseliny jablečné bylo vypočítáno na základě vztahu, kdy spotřeba 1 ml 0,1M NaOH odpovídá obsahu 0,0067 g kyseliny jablečné ve vzorku.

$$c = \frac{0,0067 * 1000}{V}$$

c = koncentrace kyseliny jablečné (g/l)

V = objem vzorku použitý při titrování

4.5 Měření absorbance ve viditelném spektru

Pro stanovení úrovně zabarvení jednotlivých druhů ciderů a pro porovnání změn mezi květnovou a lednovou sadou vzorků proběhlo proměření ve viditelném spektru světla.

Použité přístroje

UV-VIS spektrofotometr Helios gama (Thermo Spetronic)

Centrifuga Hettich EBA 20 (VERKON s.r.o.)

Příprava vzorků

Před samotným měřením byla provedena centrifugace všech vzorků po dobu 3 minut při 5000 RPM pro eliminaci případných kalových částic suspendovaných v kapalině.

Měření a vyhodnocení vzorků

Měření proběhlo na spektrofotometru v rozsahu 400-500 nm proti slepému vzorku, kterým byla destilovaná voda. Vyhodnocení proběhlo pomocí programu a|e-UV-Vis-IR Spectral Software (verze 2.2; Søren Preus) a Microsoft Excel.

4.6 Plynová chromatografie

Pro stanovení obsahu ethanolu, methanolu a isoamylalkoholu byla provedena cílená analýza pomocí

Použité přístroje

Plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem (SHIMADZU Nexis GC-2030)

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (VARIAN 450-GC; VARIAN 240-MS)

Centrifuga Hettich EBA 20 (VERKON s.r.o.)

Příprava vzorků

5 ml každého vzorku bylo v 15ml zkumavce smícháno s 2 ml hexanu (ACROS ORGANICS) a 0,1 ml vnitřního standartu, kterým byl 1% propan-2-ol (VWR BDH Chemicals)

v hexanu (v/v). Směs byla protřepána a pro usnadnění separace fází centrifugována po dobu 3 minut při 5000 RPM.

Následně byla z každé zkumavky odebrána horní hexanová vrstva do nových připravených zkumavek. Původní zkumavky obsahující směs vzorků s hexanem byly doplněny 2 ml čistého hexanu. Celý extrakční proces byl takto opakován celkem 2krát s výsledným objemem hexanové fáze pohybující se kolem 5 ml u každého vzorku v závislosti na úspěšnosti separace fází a odběru horní fáze ze zkumavky.

Do zkumavek s extrahovanými látkami v hexanu bylo přidáno malé množství bezvodého síranu draselného (Lach-Ner s.r.o. P.A). Zkumavky byly centrifugovány (3 min; 5000 RPM) a do připravených vial pro GC analýzu byl vždy odebrán 1 ml od každého vzorku.

Měření a vyhodnocení vzorků

Tabulka 8: Specifikace chromatografické separace na přístroji SHIMADZU Nexis GC-2030)

Autosampler:	SHIMADZU AOC-20i Plus
Kolona:	SUPELCOVAX 10 (30 m x 0,25 mm x 0,25µm)
Teplota nástřiku:	250 °C
Teplota detektoru:	280 °C
Teplotní program kolony:	60 °C (2 min) -> 8 °C/min -> 220 °C (8 min)
Nástřik:	0,5 µl; split 50:1
Nosný plyn:	N ₂ ; lineární rychlost 30 cm/min; vstupní tlak 92 kPa
Typ detektoru:	Plamenový ionizační
Nastavení detektoru:	Vzduch 200 ml/min; H ₂ 32 ml/min; make-up (N ₂) 24 ml/min
Čistoty použitých plynů:	N ₂ 4,8; H ₂ 6,0; vzduch stlačený

Identifikace byla provedena na základě porovnání retenčních časů analyzovaných složek s retenčními časy standardů. Kvantifikace proběhla metodou vnějšího standardu.

Pro identifikaci 2-fenylethylalkoholu bylo využito plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Tabulka 9: Specifikace chromatografické separace v kombinaci s hmotnostní spektrometrií na přístrojích VARIAN 450-GC a VARIAN 240-MS

Autosampler:	VARIAN CP 8400
Kolona:	SP-2560 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm)
Teplota nástřiku:	250 °C
Teplota detektoru:	200 °C (transfer line); 200 °C (iontová past); 230 °C (iontový zdroj)
Teplotní program kolony:	80 °C (5 min) -> 8 °C/min -> 240 °C (10 min)
Nástřik:	1 µl; split 5:1
Detekce:	Iontová past; po 9 minutách od začátku eluce
Hmotnostní rozsah detekce:	50-500 m/z
Mód měření:	Elektronová ionizace (25 uA)
Skenovací režim:	Čas skenu 1,34 s vychází ze 3 zprůměrovaných mikroskenů

Sběr dat byl uskutečněn pomocí programu LabSolutions (SHIMADZU) a VARIAN MS Workstation System Control (Agilent Technologies, verze 6.9.3). Vyhodnocení dat proběhlo v programech Microsoft Excel a STATISTICA (verze 12; StatSoft, Inc.)

Výpočet

Koncentrace analytů byla vypočítána pomocí metody vnitřního standardu použitím následujícího vzorce:

$$c = \frac{A_{vz} * c_{std} * A_{is_std}}{A_{std} * A_{is_vz}}$$

c = koncentrace analytu ve vzorku

A_{vz} = plocha píku analytu ve vzorku

A_{std} = plocha píku analytu v kalibračním standardu

A_{is_std} = plocha píku vnitřního standardu v kalibračním standardu

A_{is_vz} = plocha píku vnitřního standardu ve vzorku

C_{std} = koncentrace analytu v kalibračním standardu

4.7 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Účelem necílené analýzy pomocí této metody bylo porovnání profilů jednotlivých vzorků a sledování případných změn v určitých oblastech odpovídajících některým sloučeninám, jejichž identifikace však nebude stoprocentní.

Použité přístroje

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)

Kvadrupólový Time of Flight hmotnostní spektrometr impact II (Bruker Corporation)

Centrifuga Rotanta 460R (Hettich)

Příprava vzorků

Od každého vzorku bylo odebráno 5 ml a smícháno s 5 ml acetonitrilu. Tato směs byla zamražena do doby analýzy. Před analýzou bylo po rozmražení odebráno 1,5 ml každého vzorku a přeneseno do zkumavek typu Eppendorf o objemu 2 ml. V těchto zkumavkách byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 15000 RPM.

Po centrifugaci bylo odpipetováno po 1 ml každého vzorku do 2ml vialek určených pro HPLC měření. Jako blank byl připraven 1 ml směsi acetonitril a destilovaná voda v objemovém poměru 1:1. Pro stanovení průměrných hodnot byly též vytvořeny 3 následující směsi: směs květnových vzorků (100 μ l od každého květnového vzorku), lednových vzorků (100 μ l od každého lednového vzorku) a všech vzorků (70 μ l od každého vzorku). Takto připravené vzorky byly poté analyzovány pomocí HPLC/MS.

Měření a vyhodnocení vzorků

Tabulka 10: Specifikace chromatografické separace HPLC

Kolona:	Acclaim C18 RSLC 2,2 μ m; 2,1x100 mm						
Mobilní fáze:	A: 0,2% kyselina mravenčí (ACROS ORGANICS) v destilované vodě B: 100% methanol (ACROS ORGANICS)						
Eluce:	Gradientová						
	Čas [min]	0	2	18	23	24	29
	Poměr fáze B [%]	2	2	100	100	2	2
Průtok:	0,25 μ l/min						
Teplota kolony:	35 °C						
Nástrik:	5 μ l						
Doba analýzy:	37 min						
Detekce:	Q-TOF MS; po 1,5 min od začátku eluce						

Tabulka 11: Specifikace hmotnostní spektrometrie

Ionizační technika:	Elektrosprejová ionizace
Typ detektoru:	Kvadrupól Time-of-Flight (Q-TOF)
Polarita měřených iontů:	Pozitivní
Hmotnostní rozsah detekce:	60–1500 m/z
Frekvence detekce:	1 Hz

Každý vzorek byl analyzován 1x s výjimkou 3 vzorků, které byly změřeny v triplikátech pro zjištění robustnosti metody.

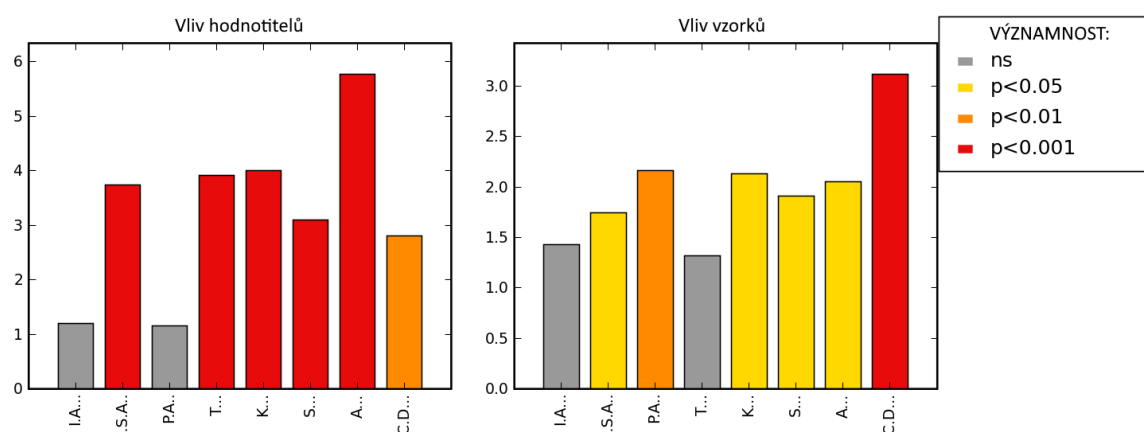
Sběr dat proběhl pomocí programu otofControl (verze 5.2.; Bruker Corporation), ovládání a integrace HPLC pomocí programu Compass HyStarr (verze 5.1.; Bruker Corporation).

Vyhodnocení dat proběhlo pomocí programů Compass DataAnalysis (verze 5.2.; Bruker Corporation), XCMS Online (verze 03.03; Siuzdak Lab), MetaboAnalyst (verze 5.0; Xia Research Group), Microsoft Excel s podporou maker – FBL, Isotop Filter, MultiF (Petr Maršík) a STATISTICA (verze 12; StatSoft, Inc.).

5 Výsledky

5.1 Senzorické hodnocení vzorků

Dvourozměrná analýza rozptylu (ANOVA) provedená pomocí programu PanelCheck (Graf 1) ukázala, že všechny měřené parametry s výjimkou intenzity aroma a příjemnosti aroma, byly statisticky významně závislé na typu hodnotitele, méně pak na typu daného vzorku. Vzorky měly na měřené parametry statisticky významný vliv opět vyjma dvou parametrů – intenzity aroma a trpkosti. Největší shodu ze všech parametrů pak hodnotitelé projeví v hodnocení celkového dojmu, kde byl vliv vzorků vyhodnocen jako největší. Celkové výsledky sensorického hodnocení, které jsou uvedeny v tabulce níže (tabulka 12), jsou proto zatíženy značnou statistickou chybou a není vhodné je brát jako definitivní ukazatel srovnání kvality jednotlivých vzorků, pouze jako doplňující informace.



Graf 1: Porovnání vlivu hodnotitelů a vzorků na jednotlivé parametry. Zkratky: I.A. – intenzita aroma; I.S.A. – intenzita sirného aroma; P.A. – příjemnost aroma; T. – trpkost; K. – kyselost; S. – sladkost; A. – alkohol; C.D. – celkový dojem.

Giganti

Během lednového ohodnocení došlo ke zvýšení jak intenzity aroma, tak i jeho příjemnosti. Sladkost, kyselost, trpkost a vnímaná intenzita alkoholu se po dobu skladování snížily, zatímco intenzita sirného aroma se značně zvýšila, což koresponduje s poklesem celkového dojmu (viz graf 2, tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Hodnotitelé zmínili při popisování chuti a aroma medové a čokoládové tóny, ovocné až ananasové aroma.

Lednové slovní hodnocení: Některými hodnotiteli byla opět vnímána chuť slabě po medu, avšak již převažovala chuť po kvasnicích či specifické stájové aroma.

Virgin Biohazard

U tohoto vzorku došlo ke snížení téměř všech sledovaných parametrů vyjma kyselosti, jejíž vnímaná intenzita zůstala prakticky beze změny. Značný pokles byl u vnímané intenzity alkoholu a u intenzity sirného aroma, která byla během květnového hodnocení nejvyšší ze všech vzorků (viz tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Vzorek byl slovně popsán jako chuťově spíše mdlý, s jablečnými tóny ale taktéž s nepříjemným pachem.

Lednové slovní hodnocení: Opět byla zaznamenáno zatuchlé aroma připomínající stáje, dále hořké až pivní tóny. Zmíněno však bylo též aroma připomínající broskev a ethyl-acetát.

LP 18

Jediný zástupce hruškového cideru neboli perry měl při prvním senzorkém hodnocení nejvyšší vnímanou sladkost. Stejně jako u většiny ostatních parametrů (vyjma intenzity sirného aroma) došlo u sladkosti k poklesu, která se však i přesto udržela výše než většina ostatních vzorků (viz tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Vzorek byl popsán jako příjemně vonící po ovoci, s citrusovým aroma.

Lednové slovní hodnocení: Ovocná a osvěžující chuť zde byla zmíněna opětovně, ale již spíše slabší intenzity. Objevily se však pachutě a aromata připomínající chemické či myšínové aroma.

Kožená Reneta

Tento vzorek dosáhl při květnovém hodnocení nejvyššího skóre celkového dojmu v rámci všech vzorků značky BACHA! Zároveň však také došlo k největšímu poklesu skóre celkového dojmu v rámci všech testovaných vzorků (viz graf 2). Kromě intenzity sirného aroma a vnímané trpkosti došlo k poklesu i u ostatních parametrů (viz tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Dle hodnotitelů byly aroma a chuť osvěžující, svými tóny připomínající citrusy, hrušky a banány.

Lednové slovní hodnocení: Aroma mělo stále ovocný nádech připomínající banány, přidalo se však aroma připomínající kvasnice s mírně sirným nádechem.

Nonneta

U vzorku Nonneta došlo k největšímu navýšení vnímané intenzity sirného aroma ze všech hodnocených vzorků. Přestože došlo k nárůstu celkové intenzity aroma, jeho příjemnost zaznamenala pokles (viz tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Vůně byla popsána jako alkoholická s medovým, švestkovým a malinovým aroma.

Lednové slovní hodnocení: Jablka, angrešt a oříšky byly zmíněny při popisu vůně tohoto vzorku.

Letní Biohazard

Lednové hodnocení ukázalo pokles u všech parametrů vyjma celkové intenzity aroma a intenzity sirného aroma, jejichž bodové hodnocení zaznamenalo nárůst, a trpkosti, která se během doby skladování prakticky nezměnila (viz tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Hodnotiteli byly na jedné straně zmíněny příjemné tóny jablečného aroma, na druhé straně převládaly atributy popisující aroma jako nepříjemné s prvky vyšších alkoholů, připomínajících až pivo. Chuť byla popsána jako dřevitá a trpká.

Lednové slovní hodnocení: Zmíněno bylo citrusové aroma, opět však převládaly spíše negativní prvky popisující aroma jako sirné a ethyl-acetátové, s chutí nevýraznou a mající koncovou pachut'.

Vlastní cider (duben)

Tento první vzorek mimo sadu značky BACHA! dosáhl během květnového hodnocení nejnižší vnímané intenzity sirného aroma. Ta se však během skladování zvýšila, stejně jako u většiny ostatních vzorků. V rámci hodnocení celkového dojmu dosáhl naopak nejvyššího skóre při květnové sensorické analýze, celkem o 0,47 bodu více než vzorek Kožená Reneta. Z ostatních parametrů poklesly sladkost, kyselost, příjemnost aroma a mírně vnímaná intenzita alkoholu. Celková intenzita aroma a trpkost pak naopak dosáhla při lednovém hodnocení vyššího skóre než při hodnocení květnovém (viz traf 2, tabulka 12).

Květnové slovní hodnocení: Uvedena byla příjemná chuť i aroma s tóny jablek, banánů a oříšků.

Lednové slovní hodnocení: Hodnotitelé uvedli příjemnou vůni po růžích a ovoci, přidala se však lehce sirná chuť s kvasnicovým aroma.

Vlastní cider (květen)

Druhý vzorek mimo sadu značky BACHA! měl prakticky totožné hodnocení celkového dojmu při obou sensorických analýzách (viz graf 2). Značný pokles však zaznamenala trpkost, spolu s níž se snížilo též hodnocení vnímané intenzity alkoholu, kyselosti a celkové intenzity aroma. K nárůstu došlo u intenzity sirného aroma, celkové příjemnosti aroma a jako u jediného vzorku k nárůstu vnímané sladkosti, ale pouze o 0,23 bodu (viz tabulka 12).

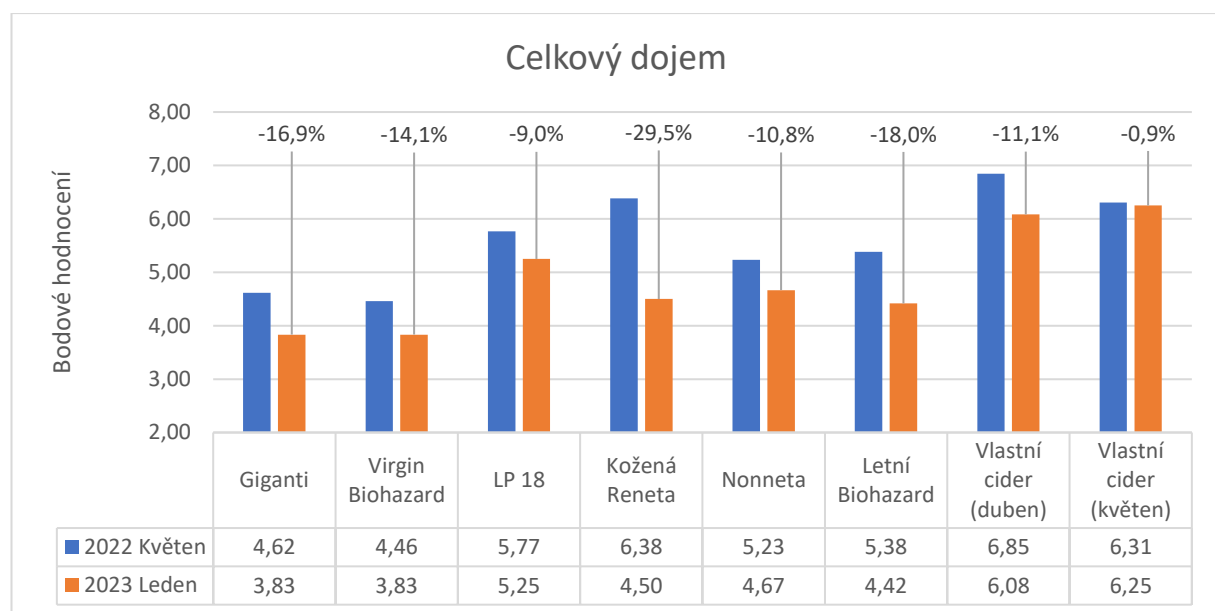
Květnové slovní hodnocení: Popis chuti zmínil náznaky hroznů a hrušek, aroma bylo popsáno jako banánové.

Lednové slovní hodnocení: Aroma bylo popsáno jako rybízové, zmíněn byl i zápach připomínající zkažené vejce.

Tabulka 12: Výsledné číselné hodnoty senzorické analýzy

	Giganti				Virgin Biohazard				LP 18				Kožená Reneta			
	2022 Květen		2023 Leden		2022 Květen		2023 Leden		2022 Květen		2023 Leden		2022 Květen		2023 Leden	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
intenzita vůně	5,85	2,38	6,50	1,31	6,23	1,74	5,83	2,04	5,92	1,61	5,67	2,02	5,23	2,09	5,17	1,75
intenzita sirného aroma	3,00	2,00	4,17	2,62	4,31	1,89	3,67	2,87	2,62	1,71	3,08	1,93	2,08	1,12	3,42	2,68
příjemnost vůně	5,38	2,36	5,58	2,27	4,31	1,70	4,17	1,70	6,23	2,09	6,00	1,35	6,38	1,39	5,25	2,45
trpkost	5,38	2,47	3,75	2,49	5,23	2,24	4,25	2,14	4,46	2,44	3,17	1,95	3,92	1,98	4,25	2,14
kyselost	5,85	1,77	5,08	2,35	5,46	1,76	5,42	2,50	5,69	1,55	4,17	1,90	6,77	2,17	4,83	2,17
sladkost	3,15	1,91	2,08	1,08	3,31	1,93	2,92	2,54	4,38	2,22	3,75	1,48	3,77	1,96	2,92	2,02
alkohol	4,00	1,83	3,17	1,80	5,00	2,00	3,50	1,57	5,00	1,68	4,08	1,88	4,31	1,89	3,83	1,11
celkový dojem	4,62	1,85	3,83	2,08	4,46	1,90	3,83	1,95	5,77	1,48	5,25	1,66	6,38	1,94	4,50	1,57

	Nonneta				Letní Biohazard				Vlastní cider (duben)				Vlastní cider (květen)			
	2022 Květen		2023 Leden		2022 Květen		2023 Leden		2022 Květen		2023 Leden		2022 Květen		2023 Leden	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
intenzita vůně	5,69	1,80	6,25	1,76	5,31	1,80	5,67	1,87	4,46	1,71	5,08	1,16	4,92	1,50	4,42	1,56
intenzita sirného aroma	2,54	1,61	3,58	2,57	3,69	1,75	4,25	2,93	1,77	1,09	2,67	2,39	2,62	1,45	2,92	2,15
příjemnost vůně	6,15	1,86	4,92	2,31	4,62	2,10	4,33	1,72	7,23	1,59	5,92	2,23	5,77	1,88	6,25	2,01
trpkost	5,31	2,32	5,00	2,83	5,23	2,24	5,25	2,90	3,62	2,33	4,17	2,92	4,85	1,82	3,25	2,01
kyselost	5,92	1,80	5,83	2,76	6,31	1,70	5,92	2,31	4,69	1,84	4,08	1,98	5,00	1,53	3,92	1,68
sladkost	3,46	1,94	2,58	2,31	2,62	1,33	2,42	1,44	3,92	1,19	3,58	1,83	3,85	1,68	4,08	1,93
alkohol	5,54	1,90	4,17	1,85	4,54	1,94	4,00	1,76	5,00	2,12	4,83	1,95	5,38	1,56	4,50	1,51
celkový dojem	5,23	1,88	4,67	2,19	5,38	2,33	4,42	2,02	6,85	1,63	6,08	2,35	6,31	1,44	6,25	1,76



Graf 2: Hodnocení celkového dojmu pomocí senzorické analýzy

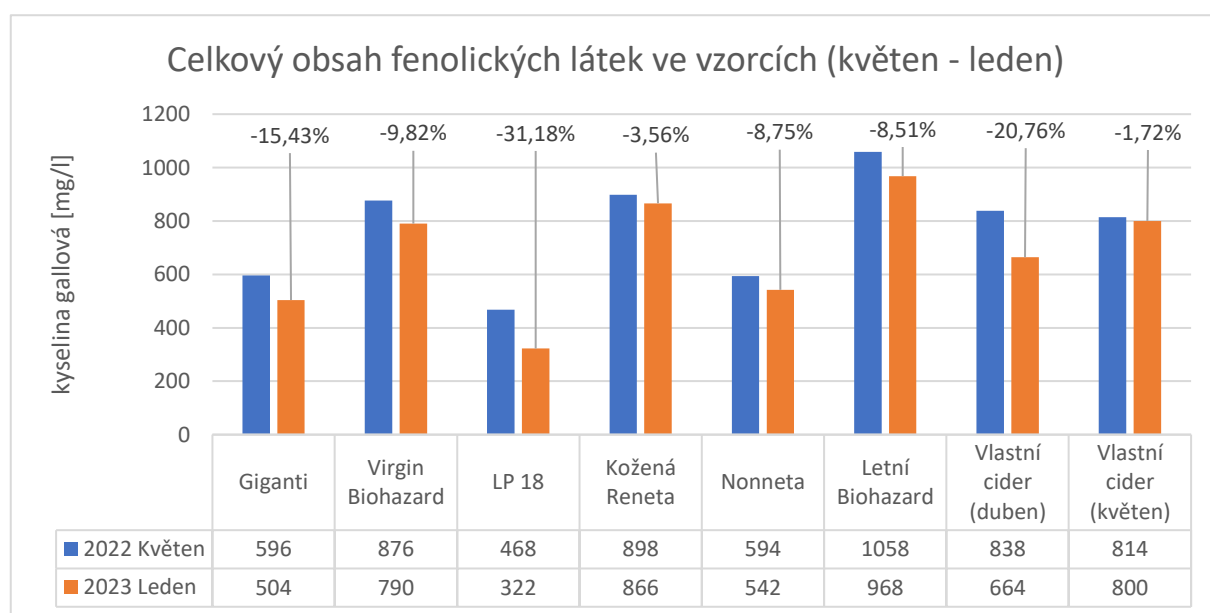
5.2 Celkový fenolický obsah

Folinovo fenolové činidlo se ve vinařství používá pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin vyjádřené jako ekvivalent kyseliny gallové (Lee et al. 2014). Vzhledem k jeho schopnosti interakce se širokou škálou redukujících sloučenin je výsledek přibližně odpovídající celkové antioxidační kapacitě daného vzorku (Everette et al. 2010).

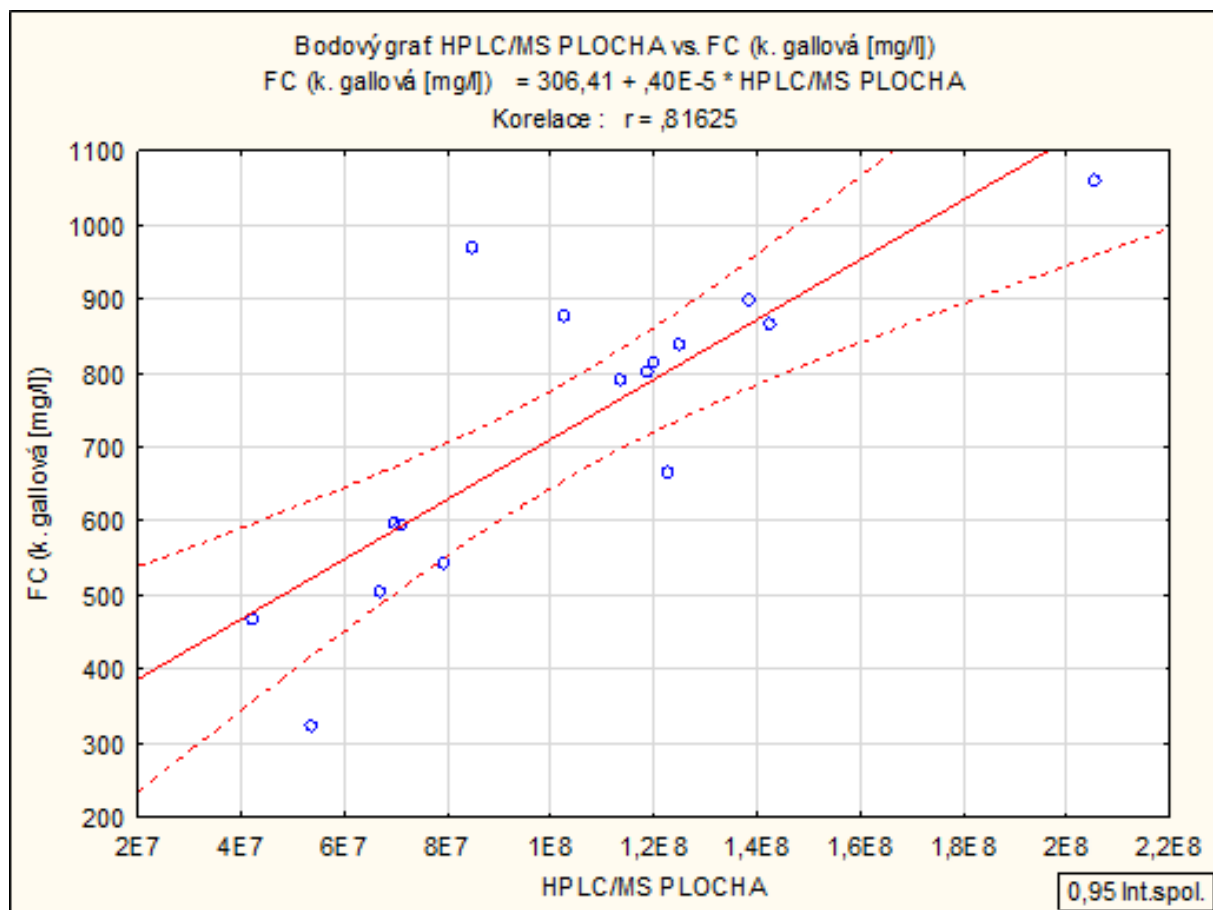
Souhrnné hodnoty naměřených dat jsou zobrazeny v grafu níže (graf 3). Nejmenší množství polyfenolů bylo naměřeno u hruškového cideru LP 18, o něco vyšších hodnot pak dosahovaly vzorky Giganti a Nonneta (0,6 g/l). Vzorky Virgin Biohazard, Kožená Reneta a Vlastní cider (duben) se všechny pohybovaly mezi kolem hodnotami 0,8-0,9 g/l. Nejvyšší hodnoty dosáhl Letní biohazard s obsahem mírně přesahujícím 1 g/l.

V rámci změn během skladování došlo prakticky u všech vzorků k poklesu. Největší rozdíl byl naměřen u vzorku LP 18, kde došlo ke snížení obsahu o 31 %. Vlastní cider (duben) dosáhl poklesu o necelých 21 %, Giganti o 15 % a Virgin Biohazard spolu s Nonnetou a Letním Biohazardem se pohybovaly mezi 8-10 %. Prakticky bez rozdílu byly hodnoty u Vlastního cideru (květen), kde došlo k poklesu pouze o necelé 2 %.

Pro zjištění korelace mezi těmito daty a celkovým množstvím detekovaných fenolických sloučenin pomocí metody HPLC/MS byla provedena korelační analýza v programu STATISTICA. Při porovnání těchto dat můžeme konstatovat silnou korelaci ($r=0,81625$), graficky znázorněnou v grafu níže (graf 4).



Graf 3: Celkový obsah fenolických látek vyjádřený jako ekvivalent kyseliny gallové

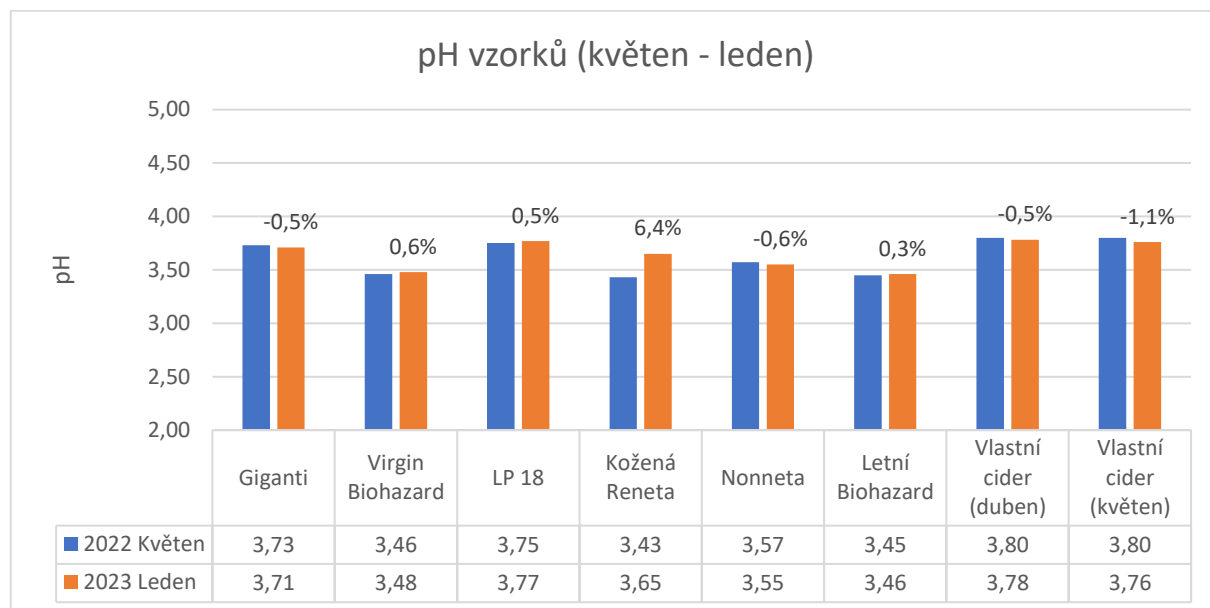


Graf 4: Graf zobrazující korelaci celkového množství fenolických látek měřené metodou Folin-Ciocalteu a detekovaného množství fenolických sloučenin v rámci metody HPLC/MS

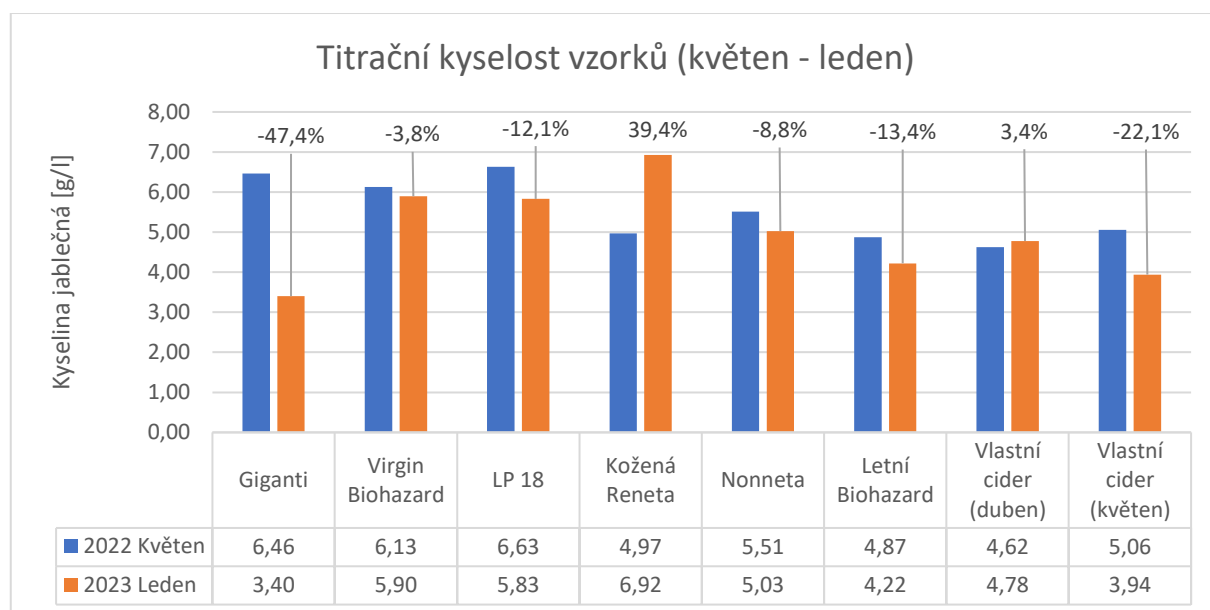
5.3 Titrační kyselost a pH

Měření pH ukázalo, že až na jedinou výjimku nedošlo u zkoumaných vzorků k výrazným změnám. Pokles či nárůst pH se pohyboval pouze v jednotkách setin, přičemž tyto drobné změny nepředstavují významné rozdíly. Vzorky Virgin Biohazard, Kožená Reneta, Nonneta a Letní Biohazard se svými hodnotami pohybovaly kolem pH 3,5. Vzorky Giganti, LP 18, Vlastní cider (duben) a Vlastní cider (květen) se naopak pohybovaly kolem hodnoty 3,75. pH jablečného moštu velice závisí na druhu použitých jablek a především na stavu zralosti při moštování, v průměru se pohybuje kolem hodnoty 3,6 (USDA). Pokud nedochází při výrobě cideru k nežádoucí tvorbě kyseliny octové, neměla by se tato hodnota nijak zásadně měnit. Hodnoty pH pohybující se v celkovém rozsahu 3,43-3,80 tedy odpovídají očekávaným hodnotám pro výrobky z jablečného moštu. U vzorku LP 18 vyrobeného z hruškového moštu bylo naměřeno průměrné pH 3,76, což odpovídá pH hruškového moštu, které se pohybuje kolem hodnoty 3,8 (USDA). U vzorku Kožená Reneta došlo jako u jediného k výraznějšímu nárůstu pH, celkem o 0,22. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny na grafu níže (graf 5).

Titrační kyselost byla vyjádřena jako ekvivalent obsahu kyseliny jablečné (g/l) při porovnávání jednotlivých vzorků a změn během skladování. Kromě vzorků Kožená Reneta a Vlastní cider (duben), kde došlo k nárůstu (u Kožené Renety se jednalo o téměř 40% nárůst korespondující se zvýšením obsahu kyseliny jablečné o téměř 2 g), byl u všech ostatních vzorků změřen pokles titrační kyselosti. Nejvýraznější pokles byl naměřen u cideru Giganti, u něhož došlo k poklesu o 47,4 % odpovídající snížení obsahu kyseliny jablečné o 3,46 g. Naměřené hodnoty jsou znázorněny na grafu níže (graf 6).



Graf 5: Naměřené hodnoty pH a jejich porovnání v rámci jednotlivých párů vzorků (květen-leden)



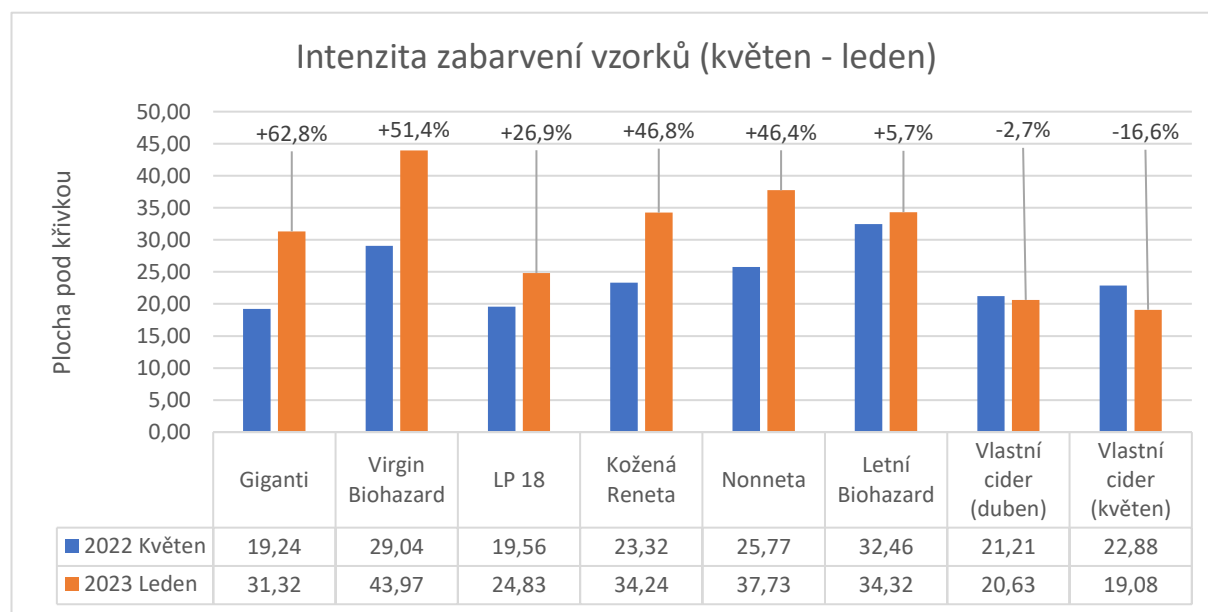
Graf 6: Naměřené hodnoty titrační kyselosti, vyjádřené jako ekvivalentní množství kyseliny jablečné, a její porovnání v rámci jednotlivých párů vzorků (květen-leden)

5.4 Zabarvení vzorků

Pro porovnání celkové absorpance v daném rozmezí vlnových délek byla spočítána plocha pod křivkami. Výsledky jsou znázorněny v grafu níže (graf 7).

U všech vzorků značky BACHA! došlo k nárůstům absorpance v měřené části spektra, tedy ke zvýšení oranžového zbarvení. Největšího procentuálního nárůstu dosáhl vzorek Giganti, kde došlo k nárůstu o necelých 63 %, nejméně se zvýšila absorpance u Letního Biohazardu. Největší absolutní hodnoty však dosáhl vzorek Virgin Biohazard, kdy lednové měření překonalo i hodnoty vzorku Letní Biohazard z května, který měl v této sadě vzorků nejtmavší zbarvení.

Naopak u obou ciderů vlastní výroby byl zjištěn pokles v zabarvení lednových vzorků oproti květnovým. U cideru Vlastní (duben) došlo k téměř zanedbatelnému poklesu o 2,7 %, u cideru Vlastní (květen) byl už pokles 16,6 %.



Graf 7: Naměřené hodnoty absorpance v rozmezí vlnových délek 400 - 500nm. Zobrazené hodnoty odpovídají plochám pod křivkami jednotlivých vzorků v rozmezí měřených vlnových délek

5.5 Plynová chromatografie

Ve vzorcích podrobených analýze byly na základě retenčních časů identifikovány a pomocí standardů kvantifikovány obsahy methanolu, ethanolu a isoamylalkoholu. Kompletní naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce níže (tabulka 13). Methanol nebyl detekován v žádném z měřených vzorků. Isoamylalkohol byl detekován v koncentracích pohybujících se u většiny vzorků v rozsahu 0,026-0,053 % objemových, výjimkou byl lednový vzorek

hruškového cideru LP 18, u kterého bylo naměřeno množství 0,005 %. Největší změnu v obsahu isoamylalkoholu tak zaznamenal vzorek LP 18, kde došlo k poklesu o 0,038 %. Výraznější změna oproti ostatním byla také zjištěna u ciderů Nonneta a Letní Biohazard, u kterých došlo shodně k nárůstu o 0,011 %.

Naměřené hodnoty ethanolu neodpovídaly očekávaným hodnotám. Při porovnání s daty o obsahu alkoholu uvedených výrobcem (která vycházejí z hodnot původní cukernatosti moštu) jsou některé hodnoty značně zvýšené, například v případě lednového hruškového cideru LP 18 byl naměřen obsah ethanolu o 5,8 % vyšší než obsah udávaný výrobcem. V celkovém průměru byly naměřené hodnoty vyšší o 3,5 % oproti očekávaným hodnotám. Při porovnání květnových a lednových sad vzorků došlo u většiny k navýšení naměřeného obsahu ethanolu. Největší nárůst byl u cideru Nonneta (změna o 2,0 %), největší pokles byl u vzorku Vlastní cider (duben), kde došlo ke změně o 0,3 %.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty obsahu methanolu, ethanolu a isoamylalkoholu ve vzorcích pomocí metody GC. Vysvětlení kódového označení: A – Giganti, B – Virgin Biohazard, C – LP 18, D – Kožená Reneta, E – Nonneta, F – Letní Biohazard, G – Vlastní cider (duben), H – Vlastní cider (květen); 5 – květen, 1 – leden; n.d. – nebyl detekován

VZOREK	A-5	A-1	B-5	B-1	C-5	C-1	D-5	D-1
Methanol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Isoamylalkohol	0,032%	0,035%	0,038%	0,034%	0,043%	0,005%	0,028%	0,026%
Ethanol	8,5%	9,2%	10,1%	10,0%	11,2%	12,4%	10,8%	10,8%
Ethanol (hodnoty od výrobce)	6,5%	6,5%	6,5%	6,5%	6,6%	6,6%	6,5%	6,5%
Rozdíl	2,0%	2,7%	3,6%	3,5%	4,6%	5,8%	4,3%	4,3%

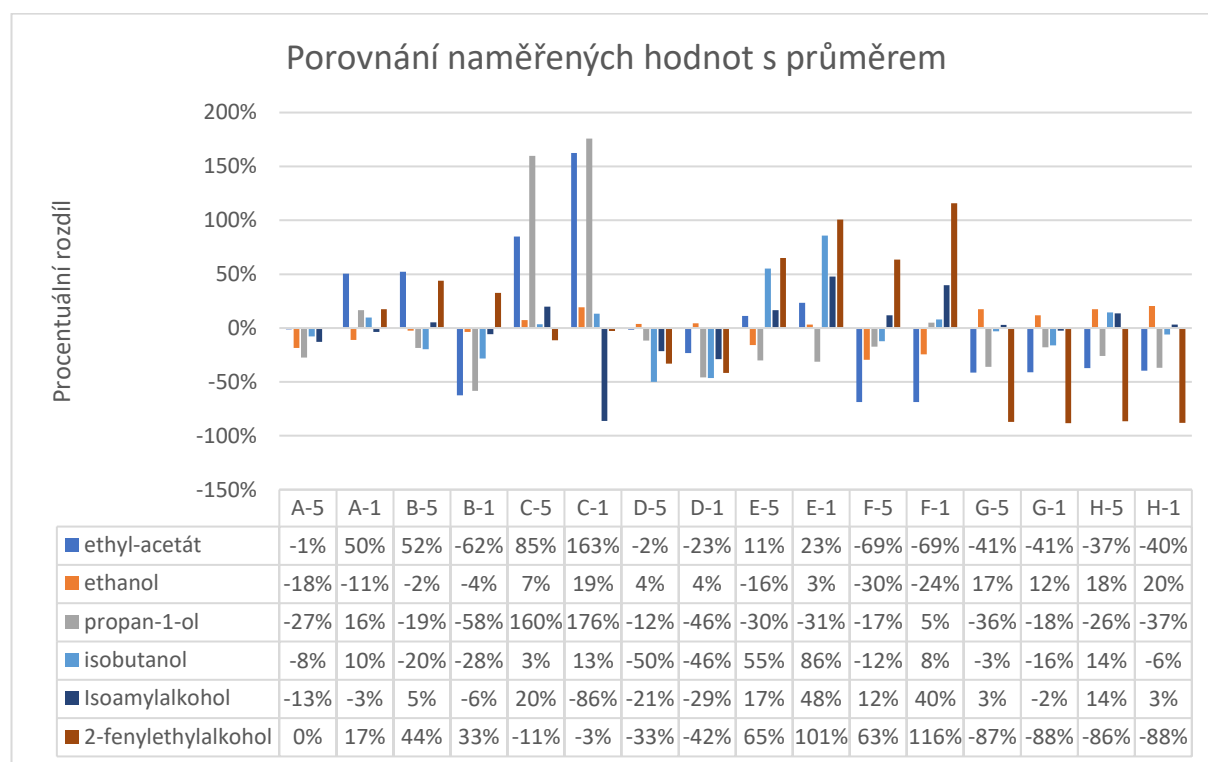
VZOREK	E-5	E-1	F-5	F-1	G-5	G-1	H-5	H-1
Methanol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Isoamylalkohol	0,042%	0,053%	0,040%	0,051%	0,037%	0,035%	0,041%	0,037%
Ethanol	8,7%	10,7%	7,3%	7,9%	12,2%	11,6%	12,2%	12,5%
Ethanol (hodnoty od výrobce)	7,5%	7,5%	4,8%	4,8%	8,5%	8,5%	8,5%	8,5%
Rozdíl	1,2%	3,2%	2,5%	3,1%	3,7%	3,1%	3,7%	4,0%

Mimo kvantifikovaných sloučenin byla detekována řada dalších, z nichž se několik podařilo identifikovat na základě retenčních časů či pomocí hmotnostního spektrometru. Identifikovanými sloučeninami byly ethyl-acetát, fenylethylalkohol (identifikace pomocí GC/MS), propan-1-ol, butan-1-ol a jeho izomery butan-2-ol a isobutanol. Jejich kvantifikace však bez použití standardů nebyla možná. Byly proto porovnávány pouze plochy píků daných sloučenin po korekci na vnitřní standard.

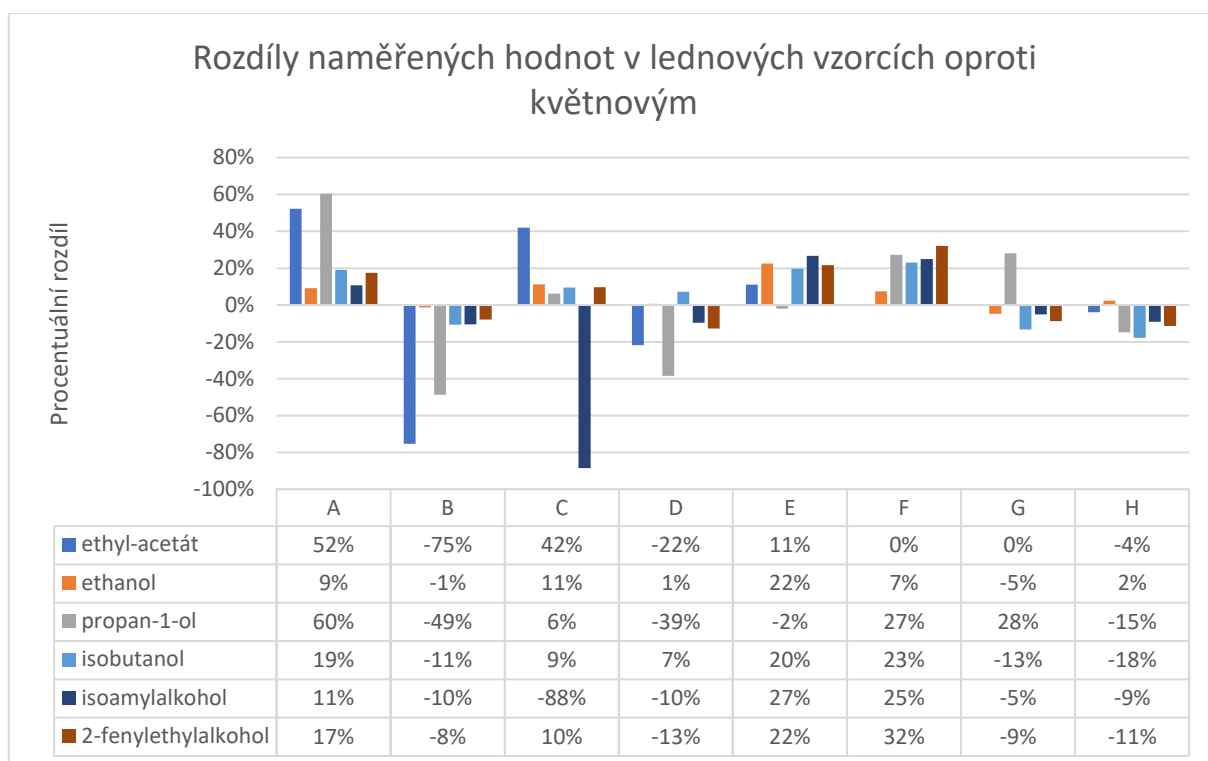
Jak je zobrazeno v grafu (graf 8), největších hodnot ethyl-acetátu bylo naměřeno v lednovém vzorku cideru LP 18. Menších, ale stále výrazně nadprůměrných hodnot, dosahovaly květnové vzorky Virgin Biohazard a LP 18 spolu s lednovým vzorkem Giganti. Oba vzorky hruškového cideru LP 18 také vykazovaly značně nadprůměrný obsah propan-1-

olu. Isobutanolu se nacházelo nejvíce v květnovém vzorku cideru Nonneta a v lednovém vzorku cideru Letní Biohazard. Obsah 2-fenylethylalkoholu byl výrazně podprůměrný u obou ciderů vlastní výroby, naopak vyšších hodnot dosahovaly lednové vzorky ciderů Nonneta a Letní Biohazard.

Tendence změn volatilních sloučenin mezi květnovými a lednovými vzorky byla značně různorodá (viz graf 9). U ciderů Giganti, LP 18, Nonneta a Letní Biohazard došlo až na určité výjimky k obecnému nárůstu obsahu volatilních sloučenin. U ciderů Virgin Biohazard a Kožená Reneta byl naopak spíše pokles. Nejdrastičtější změny nastaly v obsahu ethyl-acetátu (nárůst o 52 %) a propan-1-olu (nárůst o 60 %) u cideru Giganti, ethyl-acetátu (pokles o 75 %) a propan-1olu (pokles o 49 %) u cideru Virgin Biohazard, ethyl-acetátu (nárůst o 42 %) a isoamylalkoholu (pokles o 88 %) u hruškového cideru LP 18 a propan-1-olu (pokles o 39 %) u cideru Kožená Reneta. Ze zobrazení byl vynechán butan-2-ol, který byl detekován pouze u obou vzorků cideru LP 18 (v lednu nárůst o 12 %) a u květnového vzorku Giganti (v osminovém množství oproti LP 18). Další v grafu neuvedenou sloučeninou je butan-1-ol, který byl detekován pouze u lednového vzorku cideru Virgin Biohazard.



Graf 8: Porovnání obsahu vybraných sloučenin detekovaných metodou plynové chromatografie. Porovnávány jsou vzorky oproti příslušným průměrným hodnotám. Vysvětlení kódového označení: A – Giganti, B – Virgin Biohazard, C – LP 18, D – Kožená Reneta, E – Nonneta, F – Letní Biohazard, G – Vlastní cider (duben), H – Vlastní cider (květen); 5 – květen, 1 – leden



Graf 9: Porovnání rozdílů obsahu vybraných sloučenin detekovaných metodou plynové chromatografie. Porovnávány jsou páry vzorků. Vysvětlení kódového označení: A – Giganti, B – Virgin Biohazard, C – LP 18, D – Kožená Reneta, E – Nonneta, F – Letní Biohazard, G – Vlastní cider (duben), H – Vlastní cider (květen)

5.6 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

5.6.1 Analýza chromatogramů

Jelikož byla provedena necílená analýza bez použití standardů zájmových sloučenin, nebyla možná jejich stoprocentní identifikace. Na základě retenčních časů a hmotnostních spekter daných chromatografických píků byly odhadnuty nejpravděpodobnější sloučeniny dané povahou vzorků a jejich očekávané přítomnosti v nich.

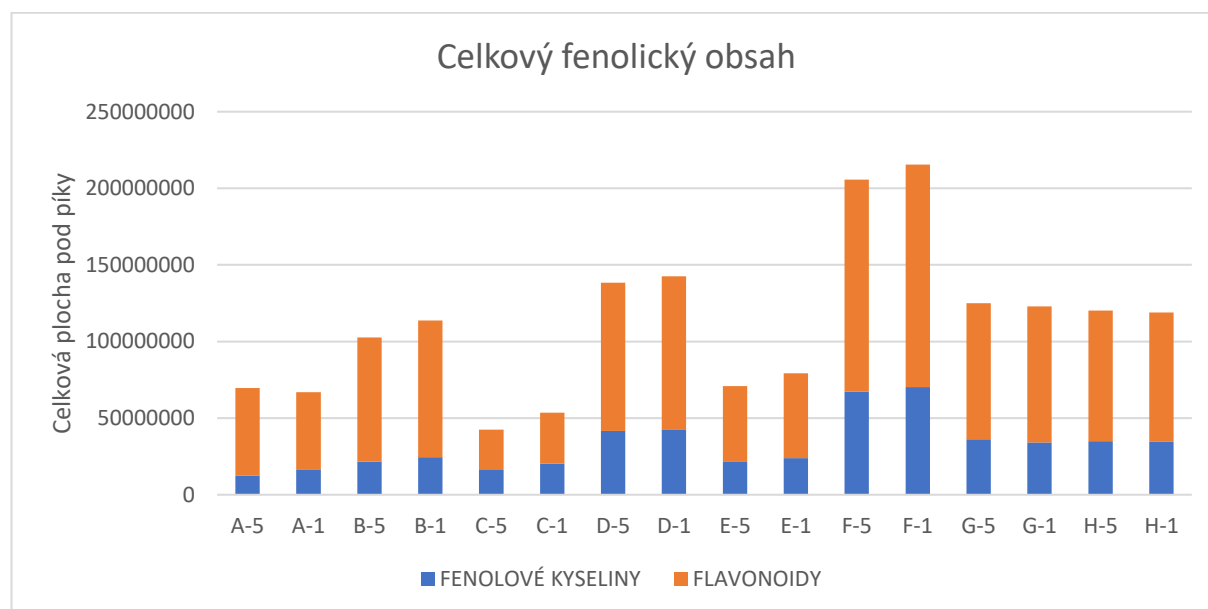
V rámci fenolických kyselin byly detekovány látky o hodnotách m/z korespondující s hodnotami pro kyselinu skořicovou a její hydroxyderiváty (kyseliny kumarová, kávová, ferulová, sinapová a chlorogenová), kyselinu syringovou a vanilovou. V rámci flavonoidů byly detekovány látky odpovídající katechinu a jeho izomerům, taxifolinu, luteolinu, myricitrinu, rhamnetinu, quercitrinu a jeho fragmentu quercetinu. V rámci dihydrochalkonů patří pod flavonoidy byly detekovány látky odpovídající florizinu a jeho fragmentu floretinu.

Vzhledem ke skutečnosti, že většina hodnot m/z odpovídá více látkám, není možné přesně určit, o kterou z nich se jedná. Všechny výše vyjmenované sloučeniny mohou být ve výčtu nahrazeny svými izomery o stejných hmotnostech. Další skutečností byl velký vliv

matrice, která způsobovala značnou hladinu šumu. Vzhledem k ohledu na tyto faktory nebylo počítáno s danými sloučeninami jednotlivě, nýbrž byly sečteny v rámci jednotlivých skupin a pro porovnání byla použita tato sumární data. Srovnávány byly tedy pouze 2 skupiny sloučenin: fenolické kyseliny a flavonoidy.

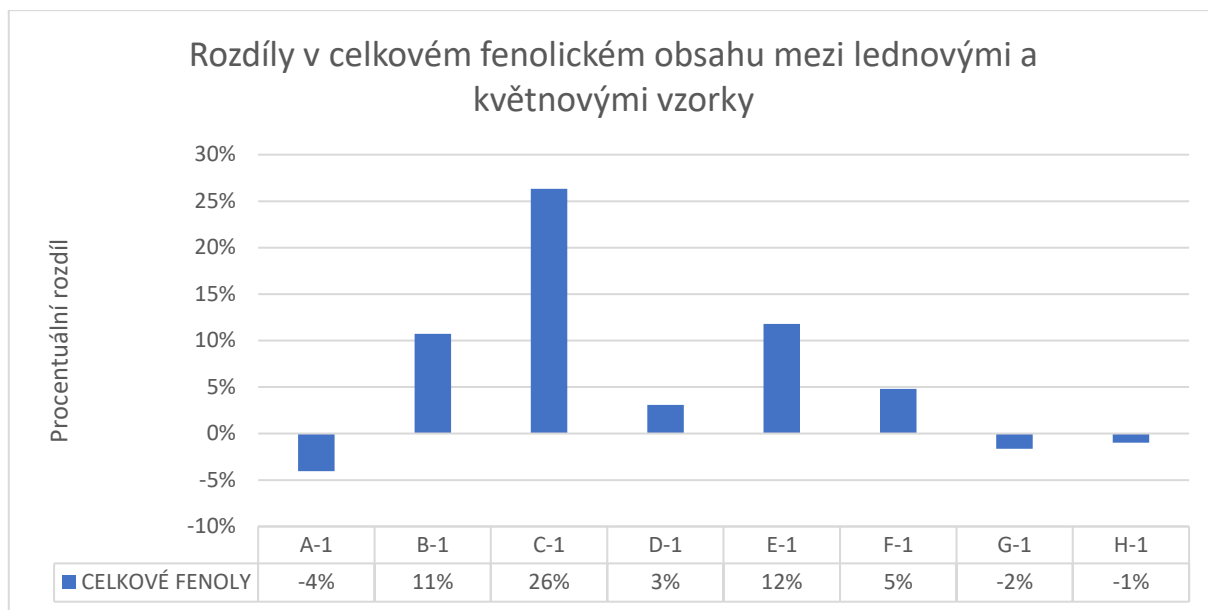
Na základě měření triplikátů pro určení robustnosti metody byla vypočítána směrodatná odchylka ve výši 2,7 %. Rozdíly mezi vzorky, které se pohybovaly kolem této hodnoty, byly brány jakožto možné důsledky chyby měření.

Porovnáním celkového fenolického obsahu (graf 10) součtem všech hodnot v rámci každého vzorku můžeme konstatovat, že nejvyšší celkový fenolický obsah byl naměřen ve vzorku Letní Biohazard. Nejmenších hodnot pak dosáhl vzorek hruškového cideru LP 18. Tyto údaje odpovídají očekávání vzhledem k naměřeným hodnotám spektrofotometrickou analýzou pomocí činidla Folin–Ciocalteu.



Graf 10: Celkový obsah detekovaných fenolických sloučenin metodou HPLC/MS. Vysvětlení kódového označení: A – Giganti, B – Virgin Biohazard, C – LP 18, D – Kožená Reneta, E – Nonneta, F – Letní Biohazard, G – Vlastní cider (duben), H – Vlastní cider (květen); 5 - květnový vzorek, 1 - lednový vzorek.

Zajímavý výsledek ukázalo porovnání procentuálních rozdílů v rámci jednotlivých párů vzorků (květen-leden), což je znázorněno na grafu níže (graf 11). U vzorků Virgin Biohazard, LP 18, Nonneta a Letní Biohazard došlo k nárůstu detekovaného množství fenolických sloučenin, v případě hruškového cideru LP 18 až o 26 %. U vzorku Giganti došlo k poklesu o 4 %, což je hodnota hraničící se spolehlivostí metody. Výsledky pro vzorek Kožená Reneta a pro oba vzorky vlastní výroby vyšly s minimálními rozdíly v rámci (či na hraně) chybovosti měření.



Graf 11: Rozdíly v celkovém fenolickém obsahu u lednových vzorků ve srovnání se vzorky květnovými pomocí metody HPLC/MS. Vysvětlení kódového označení: A – Giganti, B – Virgin Biohazard, C – LP 18, D – Kožená Reneta, E – Nonneta, F – Letní Biohazard, G – Vlastní cider (duben), H – Vlastní cider (květen); 5 - květnový vzorek, 1 - lednový vzorek.

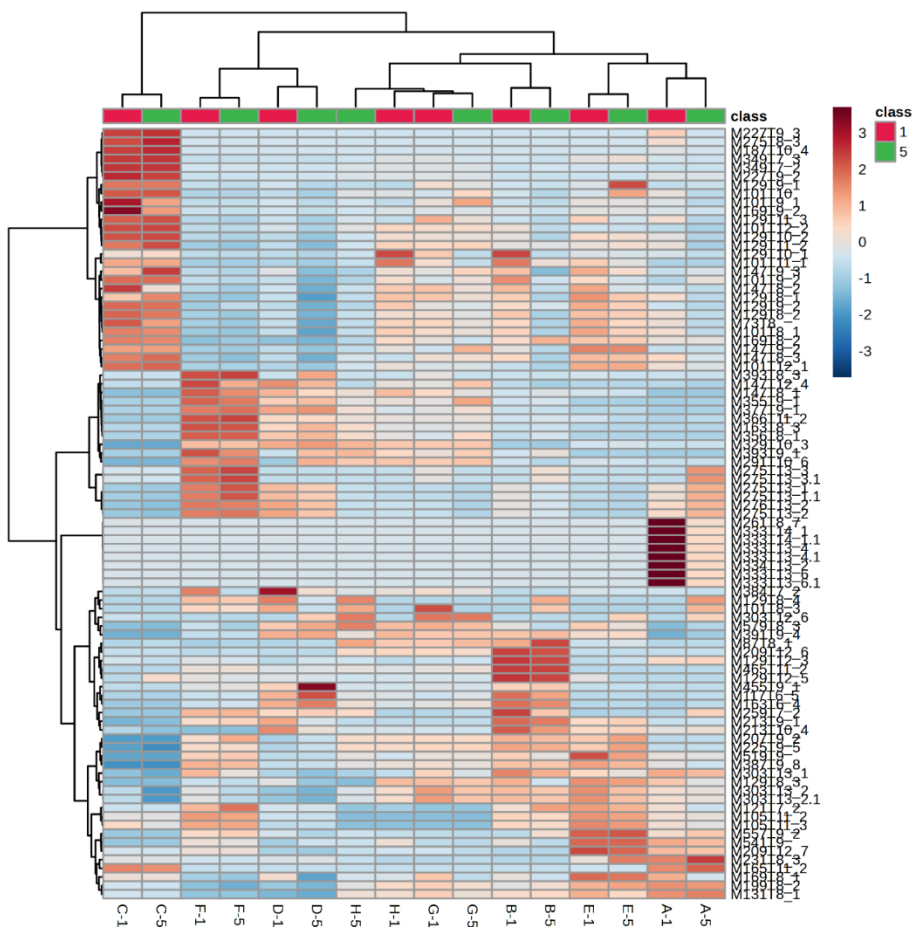
5.6.2 Iontový profil vzorků

Data z hmotnostního spektrometru byla využita pro analýzu hlavních komponent (PCA) pomocí programu MetaboAnalyst. Prvotní úprava dat proběhla v programech XCMS, FBL a MultiF. Opakovaným filtrováním dat bylo zjištěno několik iontů, které se nejvýznamnější měrou podílejí na odlišení jednotlivých sad vzorků. Některé tyto ionty korespondovaly s vytipovanými detekovanými sloučeninami, jiné však zůstaly zcela neznámé.

Mezi identifikované významné ionty patřily 275 m/z (floreitin), 169 m/z (kyselina vanilová), 165 m/z (kyselina kumarová) a 356 m/z který koresponduje s kyselinou chlorogenovou. U ní by byl očekáván ion 355 m/z, ale zřejmě vlivem chybné integrace a zpracování dat pomocí XCMS byl tento ion vyřazen a ponechán pouze ion 356 m/z, vyskytující se vlivem přirozeného izotopového složení dané sloučeniny.

Velký vliv na rozdíl mezi vzorky však měly neznáme ionty 101, 129, 147, 187, 333, 349 a 393 m/z. 101, 129, 187 a 349 m/z přispěly největší měrou k odlišení hruškového cideru LP 18 od ostatních jablečných ciderů. U vzorku Giganti to naopak byl ion 333 m/z, který nebyl detekován u žádného z ostatních vzorků a jehož obsah se v lednovém vzorku značně zvýšil oproti vzorku květnovému.

V rámci jednoho z finálních filtrovacích kroků byla vytvořena teplotní mapa přehledně ukazující rozdíly mezi jednotlivými druhy vzorků a naopak „přibuznost“ v rámci párů vzorků (například vzorků z jednoho ročníku a vzorků z jiného ročníku) jednotlivých vzorků (graf 12).



Graf 12: Teplotní mapa v kombinaci se shlukovou analýzou příbuznosti jednotlivých vzorků a detekovaných iontů. Vysvětlení kódového označení: A – Giganti, B – Virgin Biohazard, C – LP 18, D – Kožená Reneta, E – Nonneta, F – Letní Biohazard, G – Vlastní cider (duben), H – Vlastní cider (květen); 5 - květnový vzorek, 1 - lednový vzorek

5.7 Vliv vstupní suroviny na měřené parametry

Pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi hruškovým ciderem a jablečnými cidery byl v programu STATISTICA (verze 12; StatSoft, Inc.) proveden t-test pro řadu měřených parametrů, jejichž kompletní seznam je uveden i s výsledky v tabulce níže (tabulka 14). Pro parametry měřené pomocí plynové chromatografie (ethyl-acetát, ethanol, 1-propanol, 2-butanol, isobutanol, 1-butanol, isoamylalkohol, fenylethylalkohol) byly použity plochy píků korigované na příslušné plochy vnitřního standardu.

Provedený t-test odhalil statisticky významné rozdíly v následujících parametrech: obsahy ethyl-acetátu, 1-propanolu, 2-butanolu, obsah flavonoidů a celkový fenolický obsah (metoda FC) vyjádřený jako ekvivalent kyseliny gallové.

Tabulka 14: T-test vybraných parametrů pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi jablečnými a hruškovými cidery. Statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny červeně.

Proměnná	t-testy; grupováno: Vstupní surovina				
	Průměr (jablka)	Průměr (hrušky)	t	sv	p
zbarvení	28,23	22,20	1,0666	14	0,304201
pH	3,62	3,76	-1,3568	14	0,196315
titrační kyselost (k. jablečná [g/l])	5,13	6,23	-1,5253	14	0,149445
ethyl-acetát	8,94	24,31	-4,4464	14	0,000553
ethanol	67,95	78,56	-1,2950	14	0,216274
propan-1-ol	2,25	7,93	-13,5242	14	0,000000
butan-2-ol	0,08	9,09	-35,2372	14	0,000000
isobutanol	2,77	3,04	-0,3596	14	0,724527
butan-1-ol	0,06	0,00	0,3669	14	0,719180
isoamylalkohol	38,42	24,49	1,7660	14	0,099188
fenylethylalkohol	23,20	21,33	0,1546	14	0,879331
fenolické kyseliny	34446819	18288703	1,2900	14	0,217952
flavonoidy	77075619	29683120	2,1862	14	0,046278
celkový fenolický obsah (k. gallová [mg/l])	772	395	3,0567	14	0,008535

5.8 Vliv použitých kvasinek na měřené parametry

V programu STATISTICA byl opět proveden t-test pro stejnou řadu parametrů jako v případě testování vlivu vstupní suroviny, výsledky jsou uvedeny v tabulce níže (tabulka 15). Tentokrát byl sledován vliv použitého druhu kvasinek pouze u jablečných ciderů. Byly zjišťovány statisticky významné rozdíly mezi cidery, k jejichž výrobě byly použity kulturní vinné kvasinky a cidery, k jejichž fermentaci bylo využito přirozeně se vyskytujících divokých kvasinek. Použitý druh kvasinek měl statisticky významný rozdíl na následující parametry: zbarvení, pH, obsah isobutanolu, fenolických kyselin a ethyl-acetátu, 1-propanolu, 2-butanolu, obsah flavonoidů a celkový fenolický obsah (metoda FC) vyjádřený jako ekvivalentní množství kyseliny gallové.

Tabulka 15: T-test vybraných parametrů pro zjištění statisticky významných rozdílů v rámci jablečných ciderů mezi divokými a vinnými kvasinkami. Statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny červeně.

Proměnná	t-testy; grupováno: Druh kvasinek				
	Průměr (vinné kvasinky)	Průměr (divoké kvasinky)	t	sv	p
zbarvení	24,23	32,89	-2,64027	14	0,019394
pH	3,72	3,49	5,20901	14	0,000132
titrační kyselost (k. jablečná [g/l])	5,13	5,50	-0,71857	14	0,484226
ethyl-acetát	12,74	7,75	1,46065	14	0,166190
ethanol	72,87	63,29	1,79271	14	0,094646
propan-1-ol	3,40	2,24	1,12372	14	0,280032
butan-2-ol	1,93	0,00	1,22569	14	0,240536
isobutanol	3,22	2,11	2,69034	14	0,017586
butan-1-ol	0,00	0,15	-1,32288	14	0,207078
isoamylalkohol	36,64	36,73	-0,01548	14	0,987870
fenylethylalkohol	18,81	29,91	-1,43122	14	0,174312
fenolické kyseliny	25096563	44644541	-2,64489	14	0,019220
flavonoidy	61852434	86650096	-1,56759	14	0,139297
Celkový fenolický obsah (k. gallová [mg/l])	614	910	-3,93879	14	0,001484

5.9 Vliv skladování na měřené parametry

Byl proveden t-test v programu STATISTICA pro porovnání všech květnových měření proti lednovým měřením, které neodhalilo žádný statisticky významný rozdíl v měřených parametrech. Vzhledem k absenci většího počtu vzorků jednotlivých druhů cideru nebylo možné provést statistické porovnání změn párů květnového a lednového měření v rámci jednotlivých druhů. I přes tento aspekt je možné vyvodit některé závěry, které však nemají statistickou váhu, ale jsou uplatnitelné na zkoumanou sadu vzorků. Celkový dojem, celkový fenolický obsah (metoda FC) a titrační kyselost měly spíše tendenci klesat, naopak byl u většiny vzorků zaznamenán nárůst v intenzitě zbarvení a celkovém obsahu fenolických látek.

6 Diskuze

V rámci této práce bylo měřeno 6 vzorků ciderů značky „BACHA!“ v rámci spolupráce s malovýrobcem Cidérka Lobeč s.r.o. spolu s 2 vzorky pocházejících z vlastní výroby v domácích podmínkách. Kromě 1 vzorku značky „BACHA!“, který byl vyroben ze 100% hruškového moštu, byly všechny ostatní vzorky vyrobeny z čistě jablečného moštu. Vzorky jednotlivých druhů ciderů byly nejprve podrobeny senzorické analýze ve dvou sadách s celkovým rozestupem 7 měsíců a 18 dní. Vzorky z první senzorické analýzy byly posléze uchovány v takových podmínkách, aby došlo k minimalizaci biochemických změn. Výsledky senzorické analýzy se ukázaly jako statisticky neprůkazné vlivem zapojení nedostatečného počtu hodnotitelů, kteří byli zároveň neodbornými degustátory. Tato skutečnost však byla dána omezeným množstvím vzorků a dostupností dobrovolných hodnotitelů během zvolených datumů. Byl prokázán statisticky významný vliv použité vstupní suroviny (jablka nebo hrušky) a použitého druhu kvasinek (kulturní/vinné nebo divoké) na řadu měřených parametrů. Vliv doby skladování se nepodařilo statisticky prokázat v rámci jednotlivých druhů ciderů vzhledem k nedostatečnému počtu vzorků. Ani při porovnání lednové a květnové sady všech vzorků nebyla zjištěna statisticky významná rozdílnost v žádném z měřených parametrů důsledkem vysoké variability napříč jednotlivými druhy ciderů.

6.1 Vliv použité vstupní suroviny.

Wicklund et al. (2020) ve své studii porovnávali vliv vstupní suroviny vytvořením 5 moštových směsí z kombinace 7 odrůd jablek, včetně například odrůdy Discovery a Jonagold. Výsledkem bylo zjištění rozdílů v obsahu ethyl-acetátu, 2-methyl-1-propanolu (isobutanol), 3-methyl-1-butanolu (isoamylalkohol) a fenylethyl-acetátu na základě použité směsi. Tento závěr podporuje studie z roku 2019, která se zabývala vlivem odrůdy jablek, stádia zralosti a kmene kvasinek na složení volatilních sloučenin v jablečném cideru (Rosend et al. 2019). Analýza moštů ze 4 druhů jablek pěstovaných v Estonsku ukázala, že obsah většiny sloučenin odlišujících vzorky od sebe byl vázán na použitou odrůdu jablka, přičemž nutriční složení daného moštu přímo ovlivňuje dostupnost živin pro kvasinky a tvorbu aromatických sloučenin.

Z důvodu malého počtu vzorků pro jednotlivé odrůdy jablek či směsi odrůd byl v této práci porovnáván rozdíl pouze mezi jablečnými a hruškovými cidery. V rámci volatilních sloučenin byly v této práci zjištěny významné rozdíly v obsahu ethyl-acetátu, propan-1-olu a butan-2-olu. Všechny tyto 3 sloučeniny se v cideru vyrobeném z hrušek vyskytovaly ve

větším množstvím než v ciderech jablečných. Největší rozdíl byl v případě butan-2-olu, který prakticky v jablečných ciderech detekován nebyl (výjimkou byl pouze lednový vzorek cideru Giganti a to v desetinovém množství). Identifikovány byly dále sloučeniny isobutanol, isoamylalkohol a fenylethylalkohol. Tyto sloučeniny vznikají jako přirozené sekundární metabolity během fermentace kvasinkami. V nízkých koncentracích mají často příjemné ovocné aroma, při zvýšené koncentraci způsobují zápach připomínající ředidlo.

Vlivem přidavku hruškového moštu do cideru se zabývala studie Kliks et al. (2021), která zjistila zvýšené množství některých aromaticky aktivních volatilních sloučenin. Nejvýznamnější takovou sloučeninou byl ethyl(2E,4Z)-deka-4-dienoát, zodpovědný za typické hruškové aroma. Fenylethylalkohol se v měřeních této studie nejvíce procentuálně podílel na složení volatilních alkoholů u jablečného cideru, zatímco u hruškového tvořil část nejmenší.

Faktor, který nebyl měřen, ale zásadně se podílí na ovlivnění senzorického vjemu, je obsah sorbitolu. Sorbitol, který není kvasinkami fermentovatelný, se v hruškách přirozeně vyskytuje a zastává zde roli například jako osmoregulátor (Dietrich et al. 2007; Gu et al. 2021). Jak udává Jolicoeur (2013), cider vyrobený z podstatné části z hrušek si zachová určitou úroveň sladkosti i po fermentaci všech fermentovatelných cukrů. Senzorické hodnocení sladkosti tedy odpovídá této skutečnosti, kdy hruškový cider LP 18 získal v květnovém hodnocení nejvíce bodů a při lednovém se umístil na druhém místě.

V rámci fenolických sloučenin byl v této práci zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu celkových flavonoidů. Obsah fenolických kyselin byl poloviční oproti průměrným hodnotám v jablečných ciderech, ovšem z důvodu vysoké variability nebyly tyto výsledky statisticky průkazné. S nižším obsahem flavonoidů a fenolických kyselin souvisí i celkový fenolický obsah měřený metodou Folin-Ciocalteu. Data vykazují očekávanou silnou korelaci ($r = 0,81625$), jelikož hlavní sloučeniny obsažené v cideru reagující při měření metodou FC jsou právě fenolické sloučeniny. Odchyly v datech mohou být způsobeny u FC přítomností jiných redukujících sloučenin, u měření pomocí HPLC/MS je důvodem malé množství detekovaných sloučenin z celkové škály fenolických sloučenin obsažených ve vzorcích a nemožnost jejich přesné identifikace.

Mattila et al. (2006) zjišťovali ve své studii obsah fenolických kyselin jakožto aglykonů po zásadité a kyselé hydrolýze v různých druzích ovoce a nápojů. Hodnoty se u celých jablek pohybovaly v závislosti na odrůdě od 7 mg/100 g čerstvé váhy až po 28 mg/100 g. U hrušek byl naměřen obsah 8 mg/100 g. Měření jablečného džusu odhalilo obsah 16 mg/100 g, jablečného cideru 2 mg/100 g a hruškového cideru 0 mg/100 g (kávové kyseliny bylo naměřeno 0,106 mg/100 g a syringové 0,09 mg/100 g, tyto hodnoty však byly při celkovém součtu

zaokrouhleny dolů). Tato studie ukazuje, že ačkoliv obsah fenolických kyselin postupným zpracováním vstupní suroviny klesá, jejich poměrný rozdíl mezi jablky a hruškami zůstává relativně stejný.

Ve studii Tanrıöven & Ekşi (2005) byly měření obsahu fenolických sloučenin v moštích ze 7 odrůd hrušek zjištěny průměrné obsahy kyseliny chlorogenové 151 mg/l, epikatechinu 32,4 mg/l, kyseliny kávové 3,9 mg/l a kyseliny p-kumarové 0,8 mg/l s celkovým obsahem fenolických sloučenin pohybujících se v rozsahu 196–457 mg/l. Jak ukázal výzkum Oszmiański & Wojdyło (2007) je obsah fenolických sloučenin v jablečném moštu značně variabilní v závislosti na použité odrůdě. Celkové množství 13 měřených fenolických sloučenin v moštu z odrůdy Idared dosáhlo hodnoty 229,65 mg/l, u odrůdy Šampion byla tato hodnota více jak 3krát vyšší.

Gökmen et al. (2001) ve své studii zabývající se vlivem čířících metod na obsah patulinu, fenolických sloučenin a organických kyselin v jablečném moštu. Použitou odrůdou jablek byl Golden Delicious kde průměrná hodnota celkových fenolických sloučenin (z celkem 14 zkoumaných sloučenin) v surovém neupraveném moštu dosáhla necelých 1560 mg/l při korekci na 11,2 °Brix.

Srovnáním obsahu vybraných fenolických sloučenin v ovocných džusech a nektarech se zabývala studie Fernandez de Simon et al. (1992). Hodnoty chlorogenové kyseliny se pohybovaly v rozmezí 2,49-9,14 mg/l pro jablka a 1,14-7,88 pro hrušky. Výraznější rozdíl byl u kyseliny kávové, u jablek se její obsah pohyboval v rozmezí 0,86-1,05 a u hrušek 0,01-0,07 mg/l. V rámci flavonoidů byl nejmarkantnější rozdíl u floretinu 2'-O-glukosidu (florizinu), obsah se u jablečných produktů pohyboval v rozmezí 18,81-26,9 mg/l. U moštů a nektarů z hrušek byla jeho hodnota stanovena na 2,54 mg/l, přičemž autoři poznamenávají možnou kontaminaci jablečným džusem, jelikož florizin spolu s quercetin 3-O-rhamnosidem a quercetin 3-O-arabinosidem (které byly také detekovány) nejsou pro hrušky typické.

Data a závěry z těchto studií jsou v souladu se zjištěními této práce. Značně nízké hodnoty u studií Fernandez de Simon et al. (1992) a Mattila et al. (2006) v rámci měřených parametrů v porovnání s výsledky ostatních výše uvedených studií jsou zřejmě vlivem rozdílů v použité metodice..

6.2 Vliv použitého druhu kvasinek.

V rámci této práce byl zjištěn statisticky významný rozdíl v zabarvení, pH, obsahu isobutanolu, fenolických kyselin a s nimi související celkovém fenolickém obsahu (metoda FC)

na základě použití různých druhů kulturních vinných kvasinek či využití spontánní fermentace (divokých kvasinek). Cidery ponechány fermentovat spontánně měly vyšší intenzitu zabarvení a mírně nižší pH. Obsah isobutanolu byl menší o 1/3, naopak obsah fenolických kyselin byl téměř dvojnásobný. S tím souvisel i zvýšený celkový fenolický obsah odpovídající přibližně 300 mg kyseliny gallové navíc.

Při spontánní fermentaci se uplatňuje celá řada dalších rodů kvasinek kromě *Sacharomyces cerevisiae*, což může poskytnout značnou variabilitu výsledných produktů (Valles et al. 2007). Wicklund et al. (2020) použili ve své studii vyšlechtěné kvasinky značky Mangrove Jack's M02 a divoké kvasinky, tedy nechali proběhnout spontánní fermentaci. Zjištěný rozdíl byl pouze v délce fermentace, kdy divoké kvasinky potřebovaly delší průměrnou dobu na dokončení fermentace než kvasinky kulturní. Nebyl zjištěn žádný rozdíl ve vzniku volatilních aromatických sloučenin mezi cidery dle použitého druhu kvasinek.

Lachowicz et al. (2019) se ve své studii zabývali rozdíly v jablečných ciderech na základě použitého druhu kvasinek (*S. cerevisiae* nebo *S. bayanus*). Statisticky významné rozdíly byly pozorovány u celkové kyselosti, zbarvení, obsahu antokyanů, fenolických kyselin, flavonolů, flavan-3-olů a dihydrochalkonů. Použitý druh kvasinek neměl vliv na obsah alkoholu a pH.

Rosend et al. (2019) zjistili vliv použité komerční kultury kvasinek na obsah isobutanolu, ethyl-propionátu, ethyl-2-methylpropanoátu, ethyl-3-methylbutanoátu, kyseliny butanové (máselné) a 2-methylmáselné. Jednalo se však o malou část měřených volatilních sloučenin, na většinu z nich měl významný vliv použitý kultivar jablek.

Guerrini et al. (2023) zkoumali rozdíly v hruškových ciderech fermentovaných čistě kvasinkami *S. cerevisiae* a ciderech, kde byla použita simultánní a sekvenční fermentace *S. cerevisiae* spolu se *Starmerella bacillaris*. Výsledky ukázaly rozdíly ve zbarvení, průzračnosti, aroma a chuti, dále také v obsahu acetaldehydu, ethyl-acetátu, 1-propanolu, acetoinu, 2-methyl-1-butanolu, 3-methyl-1-butanolu, kyselinách gallové a p-kumarové, quercetinu, isorhamnetinu a tyrosolu.

Výsledky těchto studií ukazují různorodý vliv použitých kvasinek na složení a poměry volatilních sloučenin, fenolických sloučenin a řady dalších parametrů. V některých případech však vliv kvasinek může být zastřen vlivem použité suroviny, jejíž výběr má významnější vliv na souhrnné výsledné složení produktu. Celkově jsou však zjištění této práce v souladu se výsledky dřívějších studií, ačkoliv ne všechny parametry, které vykazují statisticky významnou změnu, přesně odpovídají parametrům zkoumaným v rámci těchto studií. Vzhledem k neznámému složení kultur divokých kvasinek (a bakterií), které působily při spontánní

fermentaci měřených vzorků je možné, že konkrétní kombinace má největší vliv i na jiné parametry, než byly zjištěny v uvedených studiích.

6.3 Vliv doby skladování.

Nepasterované cidery v sobě obsahují stále živé více či méně dormantní mikroorganismy, které mohou během skladování měnit chemické a organoleptické vlastnosti. Příkladem takových změn může být podstoupení malolaktické fermentace, které může mít mírný ale i značný vliv na celkovou kvalitu produktu (Zhao et al. 2014; Calugar et al. 2021).

Měřením dostupných vzorků se v rámci této studie nepodařilo prokázat statisticky významné změny ve vybraných sledovaných parametrech na základě doby skladování. Vyjma vždy jednoho či dvou případů dosáhly vzorky při lednovém měření oproti květnovému nižšího skóre při hodnocení celkového dojmu, měly nižší celkový fenolický obsah (metoda FC, vyjádřený jako ekvivalentní množství kyseliny gallové), nižší titrační kyselost (vyjádřenou jako ekvivalentní množství kyseliny jablečné), byly intenzivněji zabarvené (vyšší absorbance v oblasti 400-500 nm), měly vyšší celkový obsah fenolických sloučenin (metoda HPLC/MS) a mírně zvýšený průměrný obsah volatilních sloučenin, včetně ethanolu. Pro prokázání průkaznosti by bylo potřeba zajistit větší počet replikací (lahví) daných vzorků.

Vzhledem k poklesu hodnot celkového obsahu fenolických sloučenin měřených metodou Folin-Ciocalteu byl očekáván i pokles těchto látek při měření pomocí HPLC/MS. Zjištěné výsledky však spíše ukazují na opačný trend, kdy k významnějšímu poklesu (o 6 %) došlo pouze u cideru Giganti. Oba cidery vlastní výroby spolu s ciderem Kožená Reneta byly prakticky beze změn, co se celkového obsahu týče.

Zajímavé rozdíly byly zjištěny při srovnání jablečných ciderů vlastní výroby, jejichž celkové stáří bylo v době květnového odběru vzorků přibližně 8 měsíců a při lednovém odběru přibližně 15 měsíců, se vzorky vyrobenými Cidérkou Lobeč s.r.o., jejichž celkové stáří bylo v květnu necelé 2 roky (Virgin Biohazard, Kožená Reneta a Letní Biohazard) a necelé 4 roky (Giganti, LP 18 a Nonneta). Statisticky významný rozdíl byl zjištěn u zbarvení (intenzita byla u mladších ciderů nižší), pH (u mladších vyšší), obsah ethanolu (u mladších vyšší), obsah 2-fenylethylalkoholu (u mladších o jeden řád nižší) a obsah celkových flavonoidů, které byly u mladších ciderů vyšší. Řadu z těchto rozdílů je však možné vysvětlit jinými faktory než stářím vzorku, jelikož je mezi vzorky taktéž rozdíl v použitém druhu kvasinek a vstupní surovině. Její role je nejvíce patrná na obsahu ethanolu, kde jeho vyšší obsah u ciderů vlastní výroby je dán právě použitím jablek o vyšší cukernatosti, než v případě ciderů značky BACHA!

Porovnání míry změn zkoumaných parametrů v rámci jednotlivých druhů ciderů mezi „mladými“ a „starými“ cidery byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze pro isobutanol, kdy u „mladších“ ciderů poklesl a u „starších“ cideru se naopak v průměru navýšil. Míra změn řady parametrů byla u „mladších“ ciderů nižší, statisticky prokazatelné však nejsou.

Nepodařilo se však dohledat dostatek online literatury, která by se tomuto konkrétnímu tématu věnovala. Nalezená studie Techakanon & Sirimuangmoon (2020) se zabývala vlivem pasterace během skladování chladném prostředí (4 °C) na vlastnosti jablečného cideru. V rámci jejich měření byl pro kontrolu použit nepasterovaný jablečný cider, u něhož došlo ke změnám řadě parametrů. Během 6měsíčního skladování poklesl obsah rozpuštěných pevných látek, zatímco obsah ethanolu se zvýšil. Dále došlo k poklesu pH a ke zvýšení titrační kyselosti, snížení obsahu vitamínu C a celkového fenolického obsahu. Vzhledem k tomu, že primární fermentace proběhla během 10 dní a během měřené doby skladování stále probíhala sekundární fermentace, jednalo se o mladé nevyzrálé cidery. V této práci však byly použity maturované a již relativně stálé cidery, kde byl téměř všechn fermentovatelný cukr vyčerpán. Malý vliv u ciderů mladšího data lahvování by mohl mít přídavek sacharózy pro zajištění přirozeného nasycení CO₂, což by opětovně nastartovalo fermentační procesy. Studie Swaffield et al. (1997) se sice zabývala změnami mikrobiální ekologie během skladování cideru, šlo však o skladování v dubových sudech, což je zcela jiné prostředí, než uzavřená skleněná láhev. Řada ostatních studií se zabývá změnami během fermentace, nikoliv v dlouhodobém horizontu po jejím dokončení. Pro zjištění probíhajících změn během několikaletého skladování cideru je nutné vhodně nastavit experiment, vybrat například pouze kombinaci 2 odrůd jablek a 2 kmenů kvasinek a mít dostatečnou zásobu vzorků pro odběr během takto dlouhé doby. Experiment provedený v rámci této práce však tyto aspekty nesplňoval a ve výsledku se tak ukázal jako nevhodný pro zjišťování těchto skutečností.

6.4 Senzorická analýza a odchýlené hodnoty měření

Vysvětlení aromat a jejich možných příčin

Velice různorodé hodnocení a často protichůdné názory na jednotlivé parametry při vlastním hodnocení vzorků ciderů včetně slovního popisu chuti či aroma, je mimo jiné způsobeno složením panelu hodnotitelů, jelikož se jednalo o neprofesionální degustátory. Dále existuje napříč populací různá citlivost vůči určitým sloučeninám, což se značně projevuje především při hodnocení aroma.

Dle stránek certifikačního programu pro pivní porotce (Beer Judge Certification Program 2023) je rozlišována řada ciderových vad, které mohou mít různorodé důvody. V rámci zkoumaných vzorků se objevily následující vady: chuť po kvasnicích, stájové aroma, ethyl-acetát, chemické aroma, myšínové aroma, sirné aroma či aroma zkažené zeleniny/vajec.

Kvasnicová chuť může indikovat příliš dlouhé zrání na kvasnicích či nedostatečné stočení cideru z kalů. Může být také známkou probíhajících autolytických procesů či nadměrnému množství kvasinek v suspenzi, způsobeným například nesprávným naléváním či bouřlivým uvolněním bublinek CO₂ při otevření nápoje.

Stájové aroma (anglicky farmyard či barnyard aroma) může některým lidem připomínat zápach kůže, koňské příkrývky či dokonce hnoje. Jedná se o prvek přirozený pro některé druhy anglických a francouzských ciderů, avšak pouze ve slabé intenzitě. Myšínové aroma je velice specifické a schopnost ho vnímat je značně variabilní napříč populací. Záleží také na specifických podmínkách uvnitř úst hodnotitele, kdy nižší pH může zvýšit citlivost vůči sloučeninám toto aroma způsobujících. Obě tyto vady mohou být způsobeny kontaminací a pomnožením kvasinek druhu *Brettanomyces* či bakterií druhu *Lactobacillus*, například v rámci malolaktické fermentace. Vzhledem ke stylu výroby společnosti Cidérka Lobeč s.r.o. je tento znak možné brát jako pozitivum.

Ethyl-acetát v nízkých koncentracích dává cideru ovocný nádech, často svojí vůni připomínající hrušky. Ve vysokých koncentracích však způsobuje nepříjemný zápach po ředidle či odlakovači na nehty, což může být pro některé konzumenty velice odpuzivé. Tento ethylester kyseliny octové je přirozeným vedlejším meziproduktem při alkoholové fermentaci, měl by však vznikat v menším množství. Zvýšený obsah je důsledkem reakcí mezi kyselinou octovou a ethanolem, čehož je příčinou vznikající kyselina octová. Vznik kyseliny octové je vždy varovným signálem na nedokonalost těsnění kvasné zátky a přístupu kyslíku k fermentujícímu či již hotovému cideru. Dalším možným důvodem vzniku ethyl-acetátu je infekce bakteriemi rodu *Zymomonas*.

Aroma připomínající chemické pachutě může souviset s přesycením cideru nutrieny ve fermentační fázi, či se může jednat o zbytky sanitačních prostředků. Toto závadné aroma je též někdy spojováno s vyššími alkoholy, které mohou být přítomny vlivem nevhodně zvolené teploty při fermentaci, kdy vyšší teploty mohou vést ke vzniku stresových podmínek pro kvasinky a následné produkci vyšších alkoholů. Ty pak mohou zapříčinit zápach připomínající rozpouštědlo.

Zápach zkažené zeleniny, zkažených vajec či přímo sirný zápach je způsoben řadou sloučenin obsahujících síru. Methanethiol je příčinou zápachu připomínající odpadky, stojatou

vodu či ucpaný dřež. Dimethylsulfid je spojován se zápachem vařené či zkažené zeleniny. Sulfan svým zápachem připomíná zkažené vejce či septik. Detekce těchto sloučenin je velice rozdílná napříč populací, což se odráží i v rozptylu hodnocení v kategorii intenzity sirného aroma. Sulfan vzniká v rámci přirozeného metabolismu kvasinek a může být následně redukován na ostatní sloučeniny obsahující síru. V mírných koncentracích je vznikající sulfan odnášen během fermentace spolu s unikajícím CO₂. Zvýšená produkce může nastat například v důsledku teplotního nebo nutričního stresu kvasinek, či jako důsledek dlouhého setrvání cideru na kalech.

Titrační kyselost

U ciderů Giganti, Vlastní cider (květen) a Kožená Reneta došlo k výraznějším změnám titrační kyselosti v období mezi květnovým a lednovým měřením než u ostatních vzorků. U cideru Giganti došlo k poklesu o ekvivalentní množství přibližně 3 g/l kyseliny jablečné, u vzorku Vlastní cider (květen) se jednalo o přibližně 1,1 g/l. Pokles titrační kyselosti a zároveň stálé či mírně zvýšené pH může být příčinou probíhající či již dokončené malolaktické fermentace. Crapisi et al. (1987) uvádí pokles obsahu kyseliny jablečné o 62,1-74,7 % a pokles titrační kyselosti o 16,4-27,3 % u vzorků stolního vína. Kučerová & Široký (2014) naměřili v červeném víně podrobenému MLF pokles titrační kyselosti v průměru o 27 %, obsahu kyseliny vinné o 0,8 g/l (18 %) a kyseliny jablečné o 2,3 g/l (75 %). Jablečný mošt na rozdíl od moštu z hroznů révy vinné obsahuje větší množství kyseliny jablečné a menší množství kyseliny vinné, je tedy otázkou, zda by na jiném substrátu neměla MLF větší vliv na pokles titrační kyselosti. U cideru Vlastní (květen) je tedy procentuální změna titrační kyselosti relativně shodná s výsledky studií uvedených výše.

Jak můžeme vyčíst z dat ve studii Begić-Akagić et al. (2014), obsah organických kyselin a jejich vzájemné poměry se mohou značně lišit mezi různými kultivary jablek. Výpočtem z těchto dat můžeme zjistit variabilitu procentuálního zastoupení kyseliny jablečné z celkových kyselin, které se pohybuje v rozmezí 41-82 %. Vzhledem k tomu, že surovinou pro výrobu cideru Giganti byla směs jablek neznámých kultivarů, je možné, že tato jablka obsahovala zvýšený poměr kyseliny jablečné vůči ostatním kyselinám a její kompletní dekarboxylace v průběhu malolaktické fermentace způsobila razantní pokles v titrační kyselosti.

U ostatních vzorků došlo buď k malému rozdílu v titrační kyselosti, vysvětlitelném možnou variabilitou v rámci jednotlivých lahví, či její pokles odpovídá částečně proběhlé či stále probíhající malolaktické fermentaci. Výjimkou v datech je cider Kožená Reneta, kdy byl

naměřen značný nárůst v titrační kyselosti (+39,4 %) a zároveň nárůst pH (+6,7 %). Titrační kyselost a pH mají většinou opačné tendence, jelikož popisují rozdílné vlastnosti kyselin. Došlo tedy k značnému nárůstu pufrací kapacity vzorku, jehož důvody nejsou vzhledem k ostatním skutečnostem námi objasnitelné. Nepodařilo se též dohledat online odbornou literaturu věnující se této konkrétní problematice. Například Sadras et al. (2013) se ve své studii zabývali vlivem zvýšené teploty na parametry vína, kdy naměřili zvýšení pH a pokles titrační kyselosti. Manipulace se vzorky probíhala vždy s celou sadou současně a tedy ačkoliv by vystavení vyšší teplotě mohlo být vysvětlením nárůstu pH (nikoliv však nárůstu titrační kyselosti), zdá se vysoce nepravděpodobné v širším kontextu průběhu experimentu. S celou sadou vzorku bylo vždy zacházeno shodně. Při zjištění této odchylky během prvního měření bylo navíc provedeno druhé měření za použití jiné skleněné zazátkované láhve a jiné plastové lahvičky (pocházející z mrazničky), přičemž výsledky byly shodné.

Obsah ethanolu

Jak již bylo uvedeno ve výsledcích, naměřené údaje o obsahu ethanolu v % objemových neodpovídaly hodnotám udávaným výrobcem. Výrobce své hodnoty vypočítal na základě změřené cukernatosti moštu, z čehož je podle dostupných například online tabulek možné vypočítat očekávaný teoretický maximální obsah alkoholu v % objemových. Data, která byla naměřena pomocí metody plynové chromatografie tak dávají nereálné hodnoty, které jsou v průměru nadsazené o 3,5 %. Důvodem k tak značné odchylce od očekávaných hodnot je pravděpodobně vliv matrice, jelikož pro kalibraci byl zvolen postup přípravy ve vodném roztoku, nikoliv v reálném vzorku. Možným řešením, jak tomuto problému předejít, je kupříkladu zvolení metody standardního přídatku (také označované jako „spikování“), kdy je ke stanovovanému vzorku ještě před extrakcí přidáno známe množství standardu stanovované látky.

Neznámé ionty

Během analýzy dat získaných z měření metodou HPLC/MS byla objevena řada neznámých iontů, které se více či méně významnou rolí podílely na rozdílnosti jednotlivých vzorků. Nejvýraznější byly ionty 101 a 129 m/z, které se objevovaly v širokém rozmezí elučních časů v proměnlivých intenzitách. Jejich společný výskyt naznačuje, že se jedná o fragmenty větší molekuly. Jejich přesná identifikace je však bez použití standardů či měření MS/MS nemožná. Hmotnostní spektrogram těchto iontů jsou uvedeny v příloze (příloha 2).

Stejně tak je tomu s identifikací i u iontu 333 m/z, který se vyskytoval v jediném páru vzorků, kódově označených A-5 a A-1 (květnový a lednový vzorek cideru Giganti). Jeho

množství se navíc v lednovém vzorku oproti květnovému zvýšilo. Jedná se pravděpodobně o molekulu vzniklou reakcí několika jiných menších molekul, jelikož v příslušném spektrogramu nejsou patrné známky iontů o vyšší hodnotě m/z , jenž by mohly znamenat přítomnost „mateřské“ molekuly, které by byl iont 333 m/z fragmentem. Hmotnostní spektrogram tohoto iontu je uveden v příloze (příloha 3).

7 Závěr

Ve spolupráci s Cidérkou Lobeč s.r.o. bylo v této diplomové práci analyzováno celkem 8 druhů ciderů, z čehož 6 bylo značky BACHA! pocházející z výše zmíněné cidérky a 2 cidery byly z vlastní produkce v domácích podmínkách. Vzorky byly podrobeny široké škále analýz za účelem zjištění rozdílů mezi nimi a získání dat pro potvrzení či vyvrácení stanovených hypotéz.

Hypotézu o vlivu použité suroviny se podařilo prokázat na základě rozdílů mezi jablečnými a hruškovými cidery. Přítomnost butan-2-olu, který byl nalezen téměř výhradně v hruškových ciderech, by mohla posloužit jako markerová sloučenina. Pro prokázání rozdílů mezi jednotlivými druhy jablek nebylo zajištěno dostatek vzorků z jednotlivých ciderů, dostupná literatura však na jejich existenci ukazuje.

Hypotézu o vlivu použitých kvasinek se podařilo prokázat porovnáním ciderů fermentovaných kulturními vinnými kvasinkami a ciderů, u kterých proběhla spontánní fermentace pomocí divokých kmenů kvasinek. Významný rozdíl naměřeného obsahu fenolických kyselin, který byl u divokých kvasinek téměř dvojnásobný, by mohl být důležitým aspektem pro výrobce při výběru kvasinek pro fermentaci jeho produktů.

Pro potvrzení hypotézy o vlivu skladování nebylo zajištěno dostatek vzorků z důvodu ne úplně vhodného designu experimentu. Vzorky vykazovaly různorodé vlastnosti jak při porovnání mezi jednotlivými druhy ciderů, tak při porovnání změn za určenou dobu skladování. Související hypotézu o vlivu celkového stáří vzorků na míru změn během skladování se taktéž nepodařilo prokázat. Získaná data navíc ukazují spíše na opačnou tendenci, kdy cidery mladšího data výroby vykazovaly menší změny v řadě měřených parametrů než cidery staršího data výroby.

Ačkoliv se tedy nepodařilo prokázat všechny vytyčené hypotézy, tato práce přesto přináší zajímavé informace o portfoliu ciderů lokálního řemeslného malovýrobce. Výroba ciderů je v České republice odvětvím se stále se zvyšujícím zájmem. Stejně jako došlo k vývinu metod pro efektivní srovnávání profilů vín pomocí nukleární magnetické rezonance, mohlo by dojít k vytvoření obdobné metody i pro cidery. Například sestavení profilů ciderů vyrobených z jednotlivých Českých odrůd jablek by tak mohlo poskytnout nástroj pro kontrolu tvrzení výrobce, že daný produkt byl vyroben „pouze z Českých odrůd jablek“.

8 Seznam literatury

- Abdelfattah A, Whitehead SR, Macarasin D, Liu J, Burchard E, Freilich S, Dardick C, Droby S, Wisniewski M. 2020. Effect of Washing, Waxing and Low-Temperature Storage on the Postharvest Microbiome of Apple. *Microorganisms* **8**:944.
- Alberti A, Machado dos Santos TP, Ferreira Zielinski AA, Eleutério dos Santos CM, Braga CM, Demiate IM, Nogueira A. 2016. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. *LWT - Food Science and Technology* **65**:436–443.
- Alberti A, Vieira R, Drilleau J, Wosiacki G, Nogueira A. 2011. Apple Wine Processing with Different Nitrogen Contents. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **54**:551–558.
- Bartowsky EJ. 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology* **48**:149–156.
- Begić-Akagić A, Spaho N, Gaši F, Drkenda P, Vranac A, Meland M, Salkić B. 2014. Sugar and organic acid profiles of the traditional and international apple cultivars for processing. *Journal of Hygienic Engineering and Design*:190–196.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE. 1999. The Fining and Clarification of Wines. Pages 279–319 in Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE, editors. *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US, Boston, MA.
- B&P Engineering. 2023. The process of production of juices and concentrates in a nutshell! Available from <https://www.engineering-bp.com/news-art/articles-and-publications/the-process-of-production-of-juices-and-concentrates-in-a-nutshell/34> (accessed January 2023).
- Browin. 2023. Wine yeast nutrient with Vit. B1, 10g. Available from <https://browin.com/shop/product/401010/wine-yeast-nutrient-with-vit-b1-10g> (accessed January 2023).
- Calugar PC, Coldea TE, Salanță LC, Pop CR, Pasqualone A, Burja-Udrea C, Zhao H, Mudura E. 2021. An Overview of the Factors Influencing Apple Cider Sensory and Microbial Quality from Raw Materials to Emerging Processing Technologies. *Processes* **9**:502.
- Carr JG, Whiting GC. 1971. Microbiological Aspects of Production and Spoilage of Cider. *Journal of Applied Bacteriology* **34**:81–93.
- Carrín M. 2004. Characterization of starch in apple juice and its degradation by amylases. *Food Chemistry* **87**:173–178.
- Catania P, Vallone M, Planeta D, Pipitone F. 2011. Analysis of the filtration efficiency of white wine using different filter aids. *Journal of Agricultural engineering* **1**:7–12.
- Celik F, Gundogdu M, Kaki B, Kuru Berk S, Ilhan G, Sağbaş H. 2018. Variation in Organic Acid, Sugar and Phenolic Compounds in Fruits of Historical Apple Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **46**:601.
- Cidérka Lobeč s.r.o. (n.d.). Available from <http://cidreback.cz/> (accessed January 2023).
- Coton E, Coton M, Levert D, Casaregola S, Sohier D. 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **108**:130–135.
- Cousin F, Rozenn Le Guellec, Schlusshuber M, Dalmasso M, Laplace J-M, Cretenet M. 2017. Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* **5**:39.
- Crapisi A, Spettoli P, Nuti MP, Zamorani A. 1987. Comparative traits of *Lactobacillus brevis*, *Lact. fructivorans* and *Leuconostoc oenos* immobilized cells for the control of malolactic fermentation in wine. *Journal of Applied Bacteriology* **63**:513–521.

- Czech Brewery System s.r.o. 2019. Available from <https://eshop.czechminibreweries.com/> (accessed January 2023).
- Czech Brewery System s.r.o. 2023. Primary fermentation tanks for cider production. Available from <https://www.czechminibreweries.com/cider-production-technology/cider-fermentation-systems/primary-fermentation-tanks/> (accessed February 2023).
- Dharmadhikari M. 2001. Nitrogen Metabolism During Fermentation. Newsletter: Vineyard & Vintage View **17**:5–7.
- Dietrich DH, Krüger-Steden DE, Patz DC-D, Rheinberger A, Hopf I. 2007. Increase of sorbitol in pear and apple juice by water stress, a consequence of climatic change? Science & Research **17**:348–355.
- Dippel K, Matti K, Muno-Bender J, Michling F, Brezina S, Semmler H, Rauhut D, Wendland J. 2022. Co-Fermentations of Kveik with Non-Conventional Yeasts for Targeted Aroma Modulation. Microorganisms **10**:1922.
- Divol B, du Toit M, Duckitt E. 2012. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology **95**:601–613.
- Dobiáš J. 2004. Syllabus textů k přednáškám z předmětu Technologie zpracování ovoce a zeleniny II. VŠCHT Praha. Praha. Available from <https://ukp.vscht.cz/files/uzel/0007223/q0rNsc3LzEuMNwIA.pdf?redirected> (accessed January 2023)
- Doerflinger FC. 2015. Starch metabolism in apple fruit and its relationship with maturation and ripening [Dissertation]. Cornell University, Ithaca.
- Eisele TA, Drake SR. 2005. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. Journal of Food Composition and Analysis **18**:213–221.
- Eisenhour D, Brown R. 2009. Bentonite and Its Impact on Modern Life. Elements **5**:83–88.
- Espinoza-Simón E, Moreno-Álvarez P, Nieto-Zaragoza E, Ricardez-García C, Ríos-Castro E, Uribe-Carvajal S, Torres-Quiroz F. 2022. Self-Produced Hydrogen Sulfide Improves Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and Other Yeast Species. Fermentation. **8**:505.
- Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. 2010. A thorough study if reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent. Journal of agricultural and food chemistry **58**:8139–8144.
- Fairbairn SC, Smit AY, Jacobson D, Prior BA, Bauer FF. 2014. Environmental stress and aroma production during wine fermentation. South African Journal of Enology and Viticulture **35**:168–177.
- Fermentis. 2023. Cider making solutions. Available from <https://fermentis.com/en/fermentation/active-dry-yeast-cider/> (accessed February 2023).
- Fernandez de Simon Brigida, Perez-Ilzarbe Javier, Hernandez Teresa, Gomez-Cordoves Carmen, Estrella Isabel. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**:1531–1535.
- Ferreira Zielinski AA, Alberti A, Maia Braga C, Marques da Silva K, Giovanetti Canteri MH, Igarashi Mafra L, Granato D, Nogueira A, Wosiacki G. 2014. Effect of mash maceration and ripening stage of apples on phenolic compounds and antioxidant power of cloudy juices: A study using chemometrics. LWT - Food Science and Technology **57**:223–229.
- FoodData Central. 2019. Available from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173933/nutrients> (accessed January 2023).
- Shanghai Beyond Machinery. 2023. Carbonated Drink Production Line. Available from <https://fruitprocessingmachine.com/portfolio-items/carbonated-drinks-production-line/> (accessed February 2023).

- Garland MP, Donahue DW. 1998. B847: Review of Potential Pasteurization Methods for Apple Cider. *Bulletins of the Maine Agricultural and Forest Experiment Station*. **847**.
- Gökmen V, Artik N, Acar J, Kahraman N, Poyrazoğlu E. 2001. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *European Food Research and Technology* **213**:194–199.
- Grantina-Ievina L. 2015. Fungi Causing Storage Rot of Apple Fruit in Integrated Pest Management System and their Sensitivity to Fungicides. *Rural Sustainability Research* **34**:2–11.
- Grant-Preece P, Barril C, Schmidtke LM, Scollary GR, Clark AC. 2017. Light-induced changes in bottled white wine and underlying photochemical mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:743–754.
- Gu C, Wu R-F, Yu C-Y, Qi K-J, Wu C, Zhang H-P, Zhang S-L. 2021. Spatio-temporally expressed sorbitol transporters cooperatively regulate sorbitol accumulation in pear fruit. *Plant Science* **303**:110787.
- Guerrini S, Galli V, Barbato D, Facchini G, Mangani S, Pierguidi L, Granchi L. 2023. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* on the physicochemical and sensory characteristics of sparkling pear cider (Perry). *European Food Research and Technology* **249**:341–352.
- History of Cider | WSU Cider | Washington State University. (n.d.). Available from <https://cider.wsu.edu/history-of-cider/> (accessed November 2022).
- Hucker B, Wakeling L, Vriesekoop F. 2016. Vitamins in brewing: presence and influence of thiamine and riboflavin on wort fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* **122**:126–137.
- IEB Apple Breeding. 2020. Available from <http://applebreeding.ueb.cas.cz/> (accessed January 2023).
- Jaywant SA, Singh H, Arif KM. 2022. Sensors and Instruments for Brix Measurement: A Review. *Sensors (Basel, Switzerland)* **22**:2290.
- Johansen KL. 2010. Maturation of cider by malolactic fermentation. *Scandinavian Brewer's review* **67**:18–21.
- Jolicoeur C. 2013. *The New Cider Maker's Handbook: A Comprehensive Guide for Craft Producers*. Chelsea Green Publishing Company, Vermont.
- Kahle K, Kraus M, Richling E. 2005. Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**:797–806.
- Kearns P, Dagallier B, Oshima R. 2019. Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology consensus document of compositional considerations for new cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.): Key Food and Feed Nutrients, Allergens, Toxicants and Other Metabolites Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 31 JT03449758 OFDE. OECD **23**.
- Kliks J, Kawa-Rygielska J, Gasiński A, Rębas J, Szumny A. 2021. Changes in the volatile composition of apple and apple/pear ciders affected by the different dilution rates in the continuous fermentation system. *LWT* **147**:111630.
- Kučerová J, Šíroky J. 2014. Study of changes organic acids in red wines during malolactic fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **59**:145–150.
- Kumar G, Ramakrishnan V, Bisson L. 2010. Survey of Hydrogen Sulfide Production in Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* **61**:365–371.
- Labuschagne P, Divol B. 2021. Thiamine: a key nutrient for yeasts during wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**:953–973.

- Lachowicz S, Oszmiański J, Uzdzińska M, Chmielewska J. 2019. The Influence of Yeast Strain, β -Cyclodextrin, and Storage Time on Concentrations of Phytochemical Components, Sensory Attributes, and Antioxidative Activity of Novel Red Apple Ciders. *Molecules* **24**:2477.
- Łata B, Trampeczynska A, Paczesna J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* **121**:176–181.
- Lea AGH. 1992. Flavor, Color, and Stability in Fruit Products: The Effect of Polyphenols. Pages 827–847 in Hemingway RW, Laks PE, editors. *Plant Polyphenols*. Springer US, Boston, MA.
- Lea AGH. 1995. Mainstream Cidermaking. Available from <http://www.cider.org.uk/abridge.htm> (accessed February 2023).
- Lea AGH. 2011. Sulphur dioxide in cidermaking. Available from <http://www.cider.org.uk/sulphite.html> (accessed February 2023).
- Lea AGH. 2015. The Wittenham Hill Cider Pages. Available from <http://www.cider.org.uk/frameset.htm> (accessed January 2023).
- Lea AGH. 2021. To macerate or not... Available from <https://groups.google.com/g/cider-workshop/c/5Akza-5Kxy8/m/wwAOJ6I3AwAJ> (accessed January 2023).
- Lee E, Nomura N, Patil B, Yoo K. 2014. Measurement of total phenolic content in wine using an automatic Folin–Ciocalteu assay method. *International Journal of Food Science & Technology* **49**:2364–2372.
- Madalina M, Butac M, Popescu GC, Costinel B, Cosmina S. 2016. Influence of storage duration on apple fruit quality. *Fruit Growing Research* **32**:86–92.
- Magalhães F, Krogerus K, Vidgren V, Sandell M, Gibson B. 2017. Improved cider fermentation performance and quality with newly generated *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **44**:1203–1213.
- Magwaza LS, Opara UL. 2015. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae* **184**:179–192.
- Mattila P, Hellström J, Törrönen R. 2006. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:7193–7199.
- Mignard P, Beguería S, Giménez R, Font i Forcada C, Reig G, Moreno MÁ. 2022. Effect of Genetics and Climate on Apple Sugars and Organic Acids Profiles. *Agronomy* **12**:827.
- Millis NF. 1956. A Study of the Cider-sickness Bacillus—a New Variety of *Zymomonas anaerobia*. *Journal of General Microbiology* **15**:521–528.
- Ministerstvo zemědělství. 2018. Vyhláška č. 248/2018 Sb. ze dne 24. října 2018 o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. Aktuální znění 1. 12. 2018. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství. 2004. Zákon č. 321/2004 Sb. ze dne 29. dubna 2004 o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství). Aktuální znění 1. 7. 2017. Česká republika.
- Morrissey WF, Davenport B, Querol A, Dobson ADW. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* **97**:647–655.
- Mouret JR, Morakul S, Nicolle P, Athes V, Sablayrolles JM. 2012. Gas–liquid transfer of aroma compounds during winemaking fermentations. *LWT - Food Science and Technology* **49**:238–244.
- Munnecke DM. 1981. Basic Principles of Ethanol Fermentation. Pages 339–355 in Sofer SS, Zaborsky OR, editors. *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*. Springer US, Boston, MA.
- Obire O. 2005. Activity of *Zymomonas* species in palm-sap obtained from three areas in Edo State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **9**.

- Oszmiański J, Wojdyło A. 2007. Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. *European Food Research and Technology* **224**:755–762.
- Patrignani F, Chinnici F, Serrazanetti DI, Vernocchi P, Ndagijimana M, Riponi C, Lanciotti R. 2016. Production of Volatile and Sulfur Compounds by 10 *Saccharomyces cerevisiae* Strains Inoculated in Trebbiano Must. *Frontiers in Microbiology* **7**:243.
- Pavloušek P. 2011. Pěstování revy vinné - Moderní vinohradnictví. Grada Publishing. a. s., Praha 7.
- PRO Engineering/Manufacturing Inc. 2021. Batch & Tunnel Pasteurization | Cider | Hard Cider | PRO Engineering / Manufacturing. Available from <https://prowm.com/pasteurization/hard-seltzer-cider/> (accessed February 2023).
- Radenkovs V, Juhnevica-Radenkova K. 2017. Effect of storage technology on the chemical composition of apples of the cultivar ‘Auksis.’ *Zemdirbyste-Agriculture* **104**:359–368.
- Radenkovs V, Juhnevica-Radenkova K. 2018. Comparison of three storage techniques for post-harvest quality preservation of six commercially available cultivars of apple. *International Journal of Fruit Science* **18**:268–286.
- Ramos-Aguilar AL, Victoria-Campos CI, Ochoa-Reyes E, Ornelas-Paz J de J, Zamudio-Flores PB, Rios-Velasco C, Reyes-Hernández J, Pérez-Martínez JD, Ibarra-Junquera V. 2017. Physicochemical properties of apple juice during sequential steps of the industrial processing and functional properties of pectin fractions from the generated pomace. *LWT* **86**:465–472.
- Ribeiro-Filho N, Linforth R, Bora N, Powell CD, Fisk ID. 2022. The role of inorganic-phosphate, potassium and magnesium in yeast-flavour formation. *Food Research International* **162**:112044.
- Rita R-D, Zanda K, Daina K, Dalija S. 2011. Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. *Procedia Food Science* **1**:1709–1716.
- Rodríguez Madrera R, Lobo AP, Alonso JJM. 2010. Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits. *Food Research International* **43**:70–78.
- Rosend J, Kaleda A, Kuldjārv R, Arju G, Nisamedtinov I. 2020. The Effect of Apple Juice Concentration on Cider Fermentation and Properties of the Final Product. *Foods* **9**:1401.
- Rosend J, Kuldjārv R, Rosenvald S, Paalme T. 2019. The effects of apple variety, ripening stage, and yeast strain on the volatile composition of apple cider. *Heliyon* **5**:e01953.
- Sadras V o., Petrie P r., Moran M a. 2013. Effects of elevated temperature in grapevine. II juice pH, titratable acidity and wine sensory attributes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **19**:107–115.
- Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. 1993. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. Pages 213–294 in Neidleman S, Laskin AI, editors. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216408705975> (accessed April 2023).
- Savant L, McDaniel MR. 2004. Suppression of sourness: A comparative study involving mixtures of organic acids and sugars. *Perception & Psychophysics* **66**:642–650.
- Saywell LG. 1936. Wine and vinegar clarification process. The United States Patent and Trademark Office, USA. US 2043713.
- Shanghai Beyond Machinery. 2022, April 15. Fruit Crushing Machine Introduction. Available from <https://fruitprocessingmachine.com/fruit-and-vegetable-crushing-machine-introduction/> (accessed January 2023).

- Shi X, Liu Y, Ma Q, Wang J, Luo J, Suo R, Sun J. 2022. Effects of low temperature on the dynamics of volatile compounds and their correlation with the microbial succession during the fermentation of Longyan wine. *LWT* **154**:112661.
- Song Y, Gibney P, Cheng L, Liu S, Peck G. 2020. Yeast Assimilable Nitrogen Concentrations Influence Yeast Gene Expression and Hydrogen Sulfide Production During Cider Fermentation. *Frontiers in Microbiology* **11**:1264.
- Soomro T, Watts S, Migicovsky Z, Myles S. 2022. Cider and dessert apples: What is the difference? *Plants, People, Planet* **4**: 1-6.
- Spengler R. 2019. Origins of the Apple: The Role of Megafaunal Mutualism in the Domestication of *Malus* and Rosaceous Trees. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Splittstoesser DF. 1982. Microorganisms Involved in the Spoilage of Fermented Fruit Juices. *Journal of Food Protection* **45**:874–877.
- Steinmeyer K. 2020. Bottle Conditioning. Available from <https://homebrewacademy.com/bottle-conditioning/> (accessed February 2023).
- Štulíková K, Novák J, Vlček J, Šavel J, Košin P, Dostálek P. 2020. Bottle Conditioning: Technology and Mechanisms Applied in Refermented Beers. *Beverages* **6**:56.
- Swaffield CH, Scott JA, Jarvis B. 1997. Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats. *Food Microbiology* **14**:353–361.
- Tanriöven D, Ekşi A. 2005. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry* **93**:89–93.
- Techakanon C, Sirimuangmoon C. 2020. The Effect of Pasteurization and Shelf Life on the Physicochemical, Microbiological, Antioxidant, and Sensory Properties of Rose Apple Cider during Cold Storage. *Beverages* **6**:43.
- Tedesco F, Siesto G, Pietrafesa R, Romano P, Salvia R, Scieuzo C, Falabella P, Capece A. 2022. Chemical Methods for Microbiological Control of Winemaking: An Overview of Current and Future Applications. *Beverages* **8**:58.
- Tong C. 2018. Check Apple Ripeness with the Starch Iodine Test. Available from <https://blog-fruit-vegetable-ipm.extension.umn.edu/2018/08/check-apple-ripeness-with-starch-iodine.html> (accessed January 2023).
- Trioli G. 2010. Microbial Contamination in Wine. *Internet Journal of Enology and Viticulture* **3**.
- Turner J. 1949. The Metabolism of the Apple during Storage. *Australian Journal of Biological Sciences* **2**:138.
- USDA. (n.d.). pH of Selected Foods. Available from <https://pmp.errc.ars.usda.gov/phOfSelectedFoods.aspx> (accessed February 2023).
- Valles B, Bedrinana R, Tascon N, Simon A, Madrera R. 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* **24**:25–31.
- Van Gheluwe G, Chen E, Valyi Z. 1975. Factors affecting the formation of fusel alcohols during fermentation. *Technical Quartely* **12**:169–175.
- Vilanova M, Pretorius IS, Henschke PA. 2015. Chapter 58 - Influence of Diammonium Phosphate Addition to Fermentation on Wine Biologicals. Pages 483–491 in Preedy V, editor. *Processing and Impact on Active Components in Food*. Academic Press, San Diego.
- Watson B. 2013. *Cider, hard and sweet: history, traditions, and making your own*. Countryman Press, USA.
- Wicklund T, Skottheim E, Remberg S. 2020. Various factors affect product properties in apple cider production. *International Journal of Food Studies* **9**:184–196.
- Wilczyński K, Kobus Z, Dziki D. 2019. Effect of Press Construction on Yield and Quality of Apple Juice. *Sustainability* **11**:382–396.

- Wyeast Laboratories Inc. 2023a. Premium Liquid Yeast for Cider | Wyeast. Available from <https://weastlab.com/yeast-cultures/cider/strains/> (accessed February 2023).
- Wyeast Laboratories Inc. 2023b. Strain: 4007 for Malolactic Blend | Yeast & Cultures by Wyeast Labs. Available from <https://weastlab.com/product/malolactic-blend/> (accessed February 2023).
- Xu Y, Zhao G, Wang L. 2006. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **33**:192–196.
- Ye M, Yue T, Yuan Y. 2014. Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples. *European Food Research and Technology* **239**:67–77.
- Zhang D, Lovitt RW. 2006. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **81**:1130–1140.
- Zhang Z, Heinemann PH, Liu J, Baugher TA, Schupp JR. 2016. The Development of Mechanical Apple Harvesting Technology: A Review. *Transactions of the ASABE* **59**:1165–1180.
- Zhao H, Zhou F, Dziugan P, Yao Y, Zhang J, Lv Z, Zhang B. 2014. Development of organic acids and volatile compounds in cider during malolactic fermentation. *Czech Journal of Food Sciences* **32**:69–76.
- Zhao X, Procopio S, Becker T. 2015. Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology* **52**:7588–7598.

9 Seznam použitých zkratk

°Bx	stupně Brix
°NM	stupně normalizovaného moštoměru
ANOVA	analýza rozptylu
ATP	adenosintrifosfát
CO ₂	oxid uhličitý
DAP	hydrogenfosforečnan diamonný
FC	Folin-Ciocalteu
GC	plynová chromatografie
H ₂	vodík
H ₂ S	sulfan
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
M	mol/l
MLF	malolaktická fermentace, jablečno-mléčné kvašení
MS	hmotnostní spektrometrie
N ₂	dusík
NaOH	hydroxid sodný
PCA	analýza hlavních komponent
ppm	10 ⁻⁶ , jednotek v miliónu
Q-TOF	kvadrupól s měřením doby letu
RPM	otáčky za minutu
SO ₂	oxid siřičitý
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

10 Seznam grafů

Graf 1: Porovnání vlivu hodnotitelů a vzorků na jednotlivé parametry

Graf 2: Hodnocení celkového dojmu pomocí senzorické analýzy

Graf 3: Celkový obsah fenolických látek vyjádřený jako ekvivalent kyseliny gallové

Graf 4: Graf zobrazující korelaci celkového množství fenolických látek měřených metodou Folin-Ciocalteu a detekovaného množství fenolických sloučenin v rámci metody HPLC/MS

Graf 5: Naměřené hodnoty pH a jejich porovnání v rámci jednotlivých párů vzorků (květen-leden)

Graf 6: Naměřené hodnoty titrační kyselosti, vyjádřené jako ekvivalentní množství kyseliny jablečné, a její porovnání v rámci jednotlivých párů vzorků (květen-leden)

Graf 7: Naměřené hodnoty absorbance v rozmezí vlnových délek 400 - 500nm. Zobrazené hodnoty odpovídají plochám pod křivkami jednotlivých vzorků v rozmezí měřených vlnových délek

Graf 8: Porovnání obsahu vybraných sloučenin detekovaných metodou plynové chromatografie. Porovnávány jsou vzorky oproti příslušným průměrným hodnotám

Graf 9: Porovnání rozdílů obsahu vybraných sloučenin detekovaných metodou plynové chromatografie. Porovnávány jsou páry vzorků

Graf 10: Celkový obsah detekovaných fenolických sloučenin metodou HPLC/MS

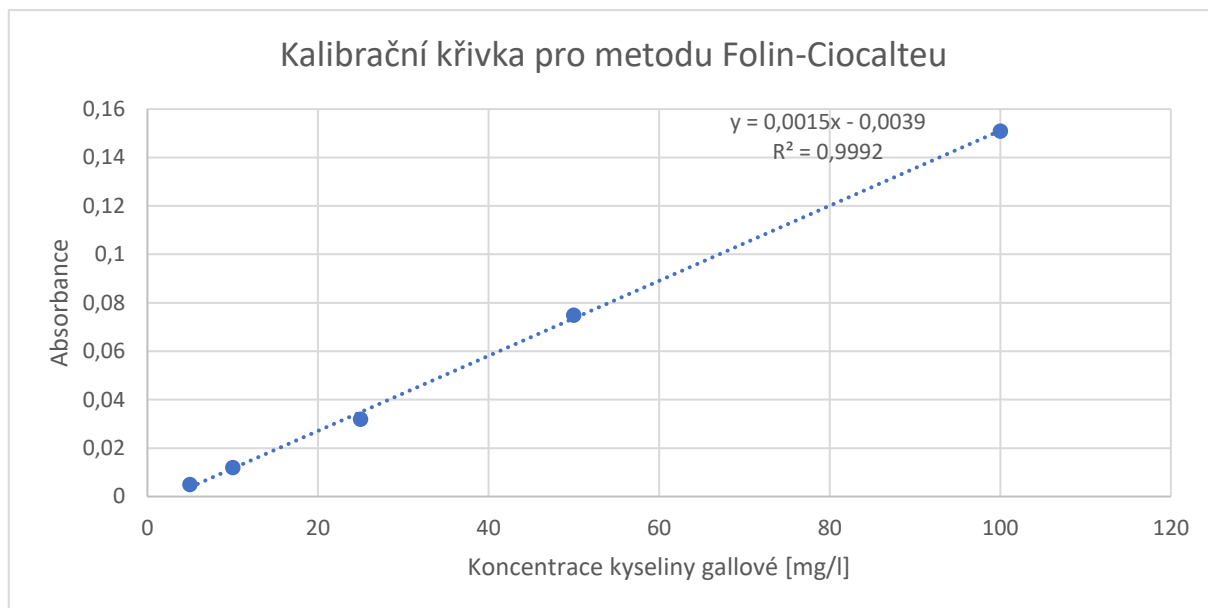
Graf 11: Rozdíly v celkovém fenolickém obsahu u lednových vzorků ve srovnání se vzorky květnovými pomocí metody HPLC/MS

Graf 12: Teplotní mapa v kombinaci se shlukovou analýzou příbuznosti jednotlivých vzorků a detekovaných iontů

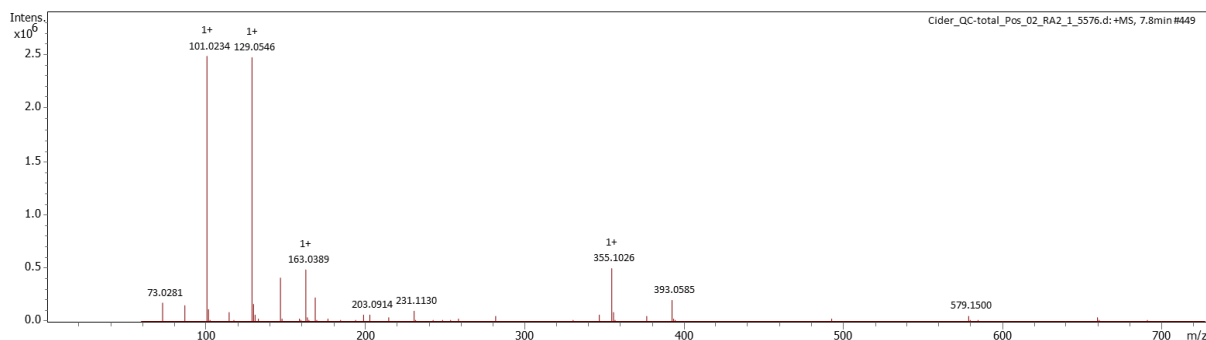
11 Seznam tabulek

- Tabulka 1: Klasifikace jablek dle chuti v Anglii (Jolicoeur, 2013; upraveno)
- Tabulka 2: Klasifikace jablek dle chuti ve Francii (Jolicoeur, 2013; upraveno)
- Tabulka 3: Klasifikace jablek dle chuti ve Španělsku (Jolicoeur, 2013; upraveno)
- Tabulka 4: Identifikované druhy kvasinek během výroby cideru (Coton et al. 2006; upraveno)
- Tabulka 5: Aromaticky aktivní těkavé látky v cideru (Rosend et al. 2019; upraveno)
- Tabulka 6: Seznam vzorků a jejich popis
- Tabulka 7: Bodovací tabulka pro senzorické hodnocení
- Tabulka 8: Specifikace chromatografické separace na přístroji SHIMADZU Nexis GC-2030)
- Tabulka 9: Specifikace chromatografické separace v kombinaci s hmotnostní spektrometrií na přístrojích VARIAN 450-GC a VARIAN 240-MS
- Tabulka 10: Specifikace chromatografické separace HPLC
- Tabulka 11: Specifikace hmotnostní spektrometrie
- Tabulka 12: Výsledné číselné hodnoty senzorické analýzy
- Tabulka 13: Naměřené hodnoty obsahu methanolu, ethanolu a isoamylalkoholu ve vzorcích pomocí metody GC
- Tabulka 14: T-test vybraných parametrů pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi jablečnými a hruškovými cidery
- Tabulka 15: T-test vybraných parametrů pro zjištění statisticky významných rozdílů v rámci jablečných ciderů mezi divokými a vinnými kvasinkami

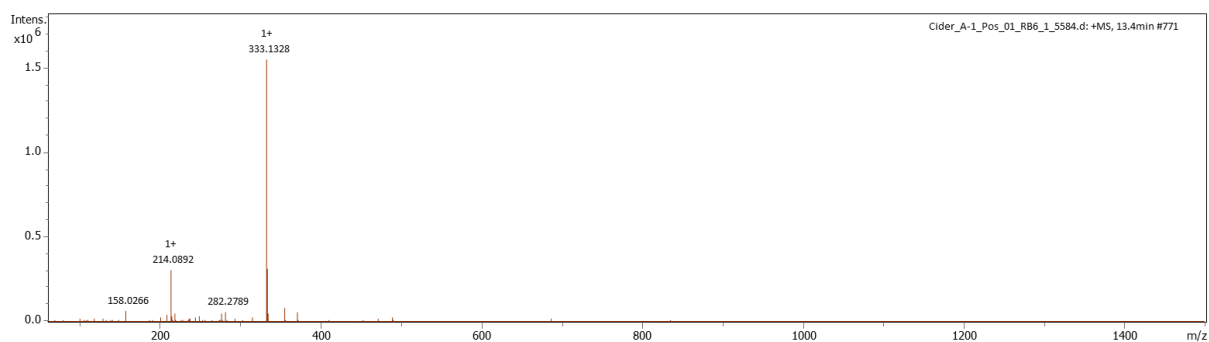
12 Samostatné přílohy



Příloha 1: Graf kalibrační křivky pro metodu Folin–Ciocalteu



Příloha 2: Hmotnostní spektrum piku v elučním čase 7,8 min. Viditelné dominantní ionty 101 a 129 m/z se významně podílely na odlišení všech vzorků mezi sebou



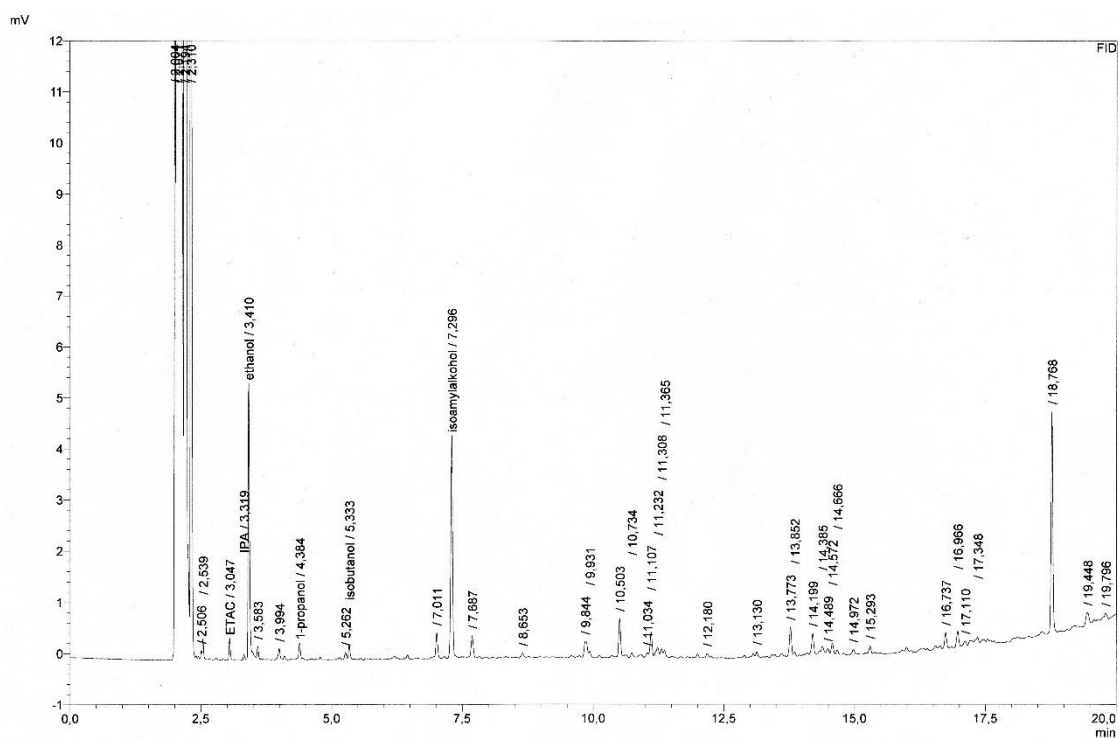
Příloha 3: Hmotnostní spektrum piku v elučním čase 13,4 min. Viditelný dominantní iont 333 m/z se významně podílel na odlišení vzorku s kódem A (Giganti) od ostatních vzorků



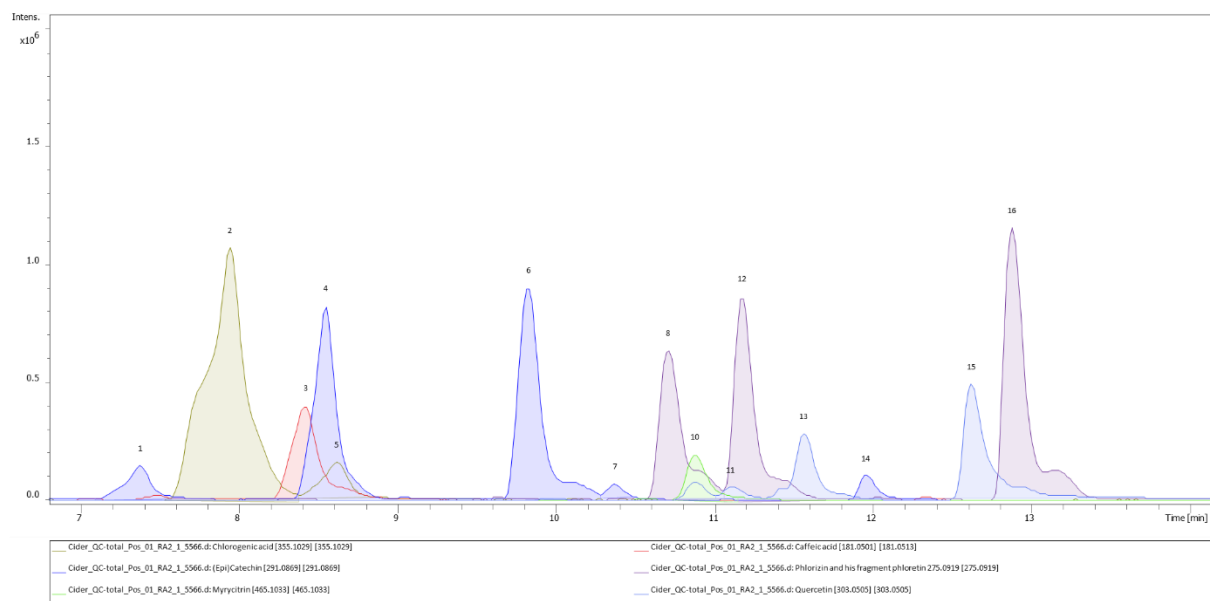
Příloha 4: Drtící a lisovací linka Hollman (1957) společnosti Cidérka Lobeč s.r.o.
(zdroj: <https://www.facebook.com/photo/?fbid=3050312631901390&set=pb.100057235275289.-2207520000>)



Příloha 5: Nerezové a plastové fermentační nádoby společnosti Cidérka Lobeč s.r.o.
(zdroj: <https://www.facebook.com/photo/?fbid=1980451308887533&set=pb.100057235275289.-2207520000>)



Příloha 6: Příkladový chromatogram z analýzy GC-FID pro vzorek Letní Biohazard (leden). Pík v čase 18,768 se pomocí GC/MS podařilo posléze identifikovat jako 2-fenylethylalkohol



Příloha 7: Příkladový chromatogram z analýzy HPLC/MS s vyznačenými píky sloučenin, u nichž byla provedena identifikace s nejmenší nejistotou