

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie



**IDENTIFIKACE MARKERŮ PRO CHARAKTERIZACI
POTRAVIN**

Disertační práce

Autor práce:

Mgr. Marcela Jelínková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Konzultant:

Doc. RNDr. Lubomír Čáp, CSc.

OLOMOUC 2011

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Velké poděkování patří vedoucímu disertační práce doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné rady, které mi poskytl při psaní práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Karlu Hronovi, Ph.D., za odborné rady a připomínky z oblasti statistického zpracování dat. Mé poděkování také patří Mgr. Martině Chromečkové, Mgr. Daně Klimčíkové a Mgr. Romanu Kreizigerovi za spolupráci při realizaci experimentů.

*Věnováno mým nejbližším za jejich podporu, trpělivost a
pochopení při mém studiu a psaní této práce.*

SOUHRN

Disertační práce se zabývá studiem a identifikací markerů za účelem charakterizace potravinářských produktů. Pro analýzu potenciálních markerů byla použita především metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME) ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Pro identifikaci markerů, odhalení případných souvislostí a vnitřní struktury dat byly aplikovány vícerozměrné statistické metody. Dále byly zkoumány možnosti využití matematických transformací na distribuci datového souboru a následnou interpretaci výsledků.

Pro objasnění odrůdových charakteristik vinných destilátů byla aplikována tzv. *clr* (centred logratio) transformace a analýza hlavních komponent (PCA). Byla identifikována skupina terpenických látek, které lze označit jako potenciální markery odrůdového aroma vinných destilátů: *o*-cymen, limonen, (*Z*)- β -ocimen, linalool oxid, linalool, isoborneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, (*E*)-sabinyl acetát a (*E*)-kalamenen. Terpenické látky, které jsou podstatnou složkou tzv. primárního aroma byly analyzovány také u moravských destilátů typu grapa. Pro analýzu byla aplikována metoda mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání (HS-SPME) a technika přímého ponoření vlákna do roztoku (DI-SPME) a bylo identifikováno 61 terpenických látek. Mezi destiláty typu grapa a vinnými destiláty byly zjištěny patrné rozdíly v zastoupení terpenických látek. Kromě výše uvedených látek byla u destilátů grapa identifikována také obsáhlá skupina sesquiterpenických látek (např. α -ylangen, β -bourbonen, γ -kadinen, (*E*)-nerolidol nebo (*2Z,6E*)-farnesol). Metoda HS-SPME byla také využita pro analýzu aromatických látek českých a zahraničních chmelů a pro studium zastoupení složek chmelové silice v pivech. V pivu bylo identifikováno 15 terpenických látek, jejichž zastoupení do jisté míry souvisí s použitým chmelem a technologií výroby.

Při studiu fenolických kyselin ve vínech byla aplikována transformace dat a porovnána klasická a robustní statistická metoda PCA. Aplikace *clr* transformace a robustní varianty PCA poskytla nejlépe interpretovatelné výsledky. Kyselina vanilová, syringová a gallová byly identifikovány jako významné markery červených vín, kyselina gentisová a kávová byly navrženy jako perspektivní markery technologického způsobu zpracování.

Za účelem studia procesu zrání a k identifikaci potenciálních markerů Olomouckých tvarůžků byla využita metoda mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií. U sýrů byly identifikovány některé látky, které můžeme označit jako markery vhodné

konzumní doby tvarůžků (dimethyl disulfid, propan-2-ol, butan-2-ol) anebo markery kvality použitých surovin (terpenické látky). Paralelně byly tvarůžky analyzovány metodou Ramanovy spektrometrie.

Pro studium aromatického profilu káv druhu Arabika a Robusta byla využita metoda HS-SPME. Pro statistické zpracování a hodnocení aromatického profilu káv byla použita *clr* transformace, analýza hlavních komponent a shluková analýza a bylo identifikováno šest aromaticky aktivních látek (kyselina octová, 2-methylpyrazin, furfural, 2-furfurylalkohol, 2,6-dimethylpyrazin, 5-methylfurfural), na jejichž základě bylo možné rozdělit soubor 30-ti komerčních káv podle převládajícího druhu kávy.

SUMMARY

This dissertation thesis deals with the study and identification of markers for food products characterization. The solid-phase microextraction (SPME) in connection with gas chromatography – mass spectrometry (GC/MS) was applied for analysis of prospective markers. Analytical results were processed by multivariate statistical methods on behalf of the identification of possible markers and detection of any relations and structures within the framework of experimental data. Furthermore, the using of mathematical transformations for data processing and the studying of their effects on the data set distribution and subsequent interpretation of the results was performed.

So-called *clr* (centred logratio) transformation and principal component analysis (PCA) were applied for investigation of the wine distillates varietal characteristics. Some terpenic compounds (*o*-cymene, limonene, (*Z*)- β -ocimene, linalool oxide, linalool, isoborneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, (*E*)-sabinyl acetate and (*E*)-calamenene) were identified as potential markers of varietal aroma of wine distillates. Terpenic compounds, essential components of the so-called primary aroma, were also analysed in the Moravian grape distillates. The headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and method of direct immersion of fibre into the solution (DI-SPME) were applied. A total of 61 terpenic compounds were identified in grape distillates. There were found noticeable differences in the representation of terpenic compounds among grape distillates and wine distillates. In addition to above mentioned compounds, there was identified a large group of sesquiterpenoic compounds in grape distillates (e.g. α -ylangene, β -bourbonene, γ -cadinene, (*E*)-nerolidol, (*2Z,6E*)-farnesol). HS-SPME method was also used for analysis of aromatic compounds of Czech and foreign hops, and for profiling of essential oil components in beers as well. A total of 15 terpenic compounds were identified in beers, which representation could be linked with the hops and the beer production technology.

The data transformation and comparison of classical and robust PCA was used for the study of phenolic acids content in wines. Application of *clr* transformation and robust variant of the PCA provided better interpretable results. Vanillic, syringic and gallic acids were identified to be significant markers of red wines, when gentisic and caffeic acids were proposed as promising markers of technological process.

The solid-phase microextraction in connection with gas chromatography – mass spectrometry was used in order to study the process of maturing, and even to identify

potential markers of the Olomouc curd cheese. Certain compounds were identified as suitable markers of maturation time (dimethyl disulfide, butan-2-ol, propan-2-ol). Moreover, there was identified a group of markers describing quality of raw materials used (terpenic compounds).

HS-SPME was also used for the study of the aromatic profile Arabica and Robusta coffee. Centred logratio transformation, principal component analysis and cluster analysis were applied for the statistical processing and evaluation of the aromatic profile of coffee for particular coffee varieties. There were identified six aromatic compounds (acetic acid, 2-methylpyrazine, furfural, 2-furfuryl alcohol, 2,6-dimethylpyrazine and 5-methylfurfural), which were essential for distinguishing of 30 coffee samples.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
	2.1 Analýza markerů v potravinách.....	2
	2.2 Aromatické složky alkoholických nápojů	4
	2.2.1 Aromatické složky vinných nápojů	4
	2.2.2 Aromatické složky piva	9
	2.2.3 Biosyntéza terpenických látek	12
	2.3 Fenolické kyseliny ve vínech	15
	2.4 Aromatické složky sýrů	19
	2.5 Aromatické složky kávy	22
	2.6 Možnosti zpracování dat vícerozměrnými statistickými metodami	24
	2.6.1 Metody pro určení struktury a vazeb	25
	2.6.2 Metody pro klasifikaci objektů do skupin	27
	2.6.3 Transformace vstupních dat	28
	2.6.4 Klasické versus robustní přístupy k řešení problému	29
3	CÍLE PRÁCE	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
	4.1 Chemikálie.....	32
	4.2 Pomůcky a přístroje	32
	4.3 Software.....	33
	4.4 Použité postupy	33
	4.4.1 Analýza aromatických složek odrůdových vinných destilátů.....	33
	4.4.2 Analýza terpenických látek v destilátech grapa.....	34
	4.4.3 Analýza aromatických složek chmelů a piv.....	35
	4.4.4 Analýza fenolických kyselin ve vínech	36
	4.4.5 Analýza Olomouckých tvarůžků.....	36
	4.4.6 Analýza aromatických složek kávy	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
	5.1 Analýza aromatických složek odrůdových vinných destilátů	39
	5.2 Analýza terpenických látek v destilátech grapa	44
	5.3 Analýza aromatických složek chmelů a piv	50
	5.4 Analýza fenolických kyselin ve vínech	58
	5.5 Analýza Olomouckých tvarůžků	62
	5.6 Analýza aromatických složek kávy	72
6	ZÁVĚR	78
7	LITERATURA	80
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	93

1 ÚVOD

Potraviny a potravinářské výrobky obsahují široké spektrum látek, které mohou být pro daný produkt do jisté míry specifické. Tyto látky, které svým obsahem charakterizují určitý produkt a s jistou pravděpodobností poukazují na studované parametry, můžeme označit jako tzv. markery. Z hlediska původu bychom mohli markery v potravinách rozdělit na tři hlavní skupiny látek.

Primární látky jsou obsažené v původní surovině a do jisté míry tuto surovinu charakterizují. Během zpracování jsou tyto látky transportovány do produktu. Mezi tyto markery řadíme např. primární aromatické složky aroma vín a vinných destilátů, které mohou být tzv. markery „odrůdové vlastností“. Do skupiny primárních látek se řadí např. i složky chmelové silice, které se během výroby dostávají do piva a dodávají mu nezaměnitelné chmelové aroma.

Sekundární látky jsou produkované během výrobního procesu z látek obsažených v původní surovině. Tyto látky jsou formovány chemickými, enzymatickými nebo termálními reakcemi. Do skupiny můžeme zařadit např. aromatické látky, které vznikají při pražení kávy, nebo sekundární aromatické látky vín a destilátů.

Terciární látky vznikají v průběhu skladování a zrání produktu z obsažených látek (z látek primární a sekundárních) řadou biochemických reakcí nebo vlivem okolního prostředí. Na zastoupení terciárních látek mají vliv především podmínky skladování produktu. Do této skupiny složek aroma můžeme zařadit např. aromatické látky odpovědné za charakteristické aroma zrajících sýrů.

Analýza chemických markerů v potravinách je složitá procedura, která vyžaduje aplikaci vhodně zvolené instrumentální metody a zařazení některé z extrakčních technik. V řadě případů se pro zpracování a interpretaci chemických výsledků využívají také vícerozměrné statistické metody analýzy dat, které umožní v obsáhlé skupině látek identifikovat specifické látky, tzv. markery.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Analýza markerů v potravinách

Pro stanovení složek potravin se uplatňují především analytické separační techniky¹⁻³, jako je plynová³⁻⁶ a kapalinová chromatografie^{3,7,8} a také kapilární elektromigrační techniky⁹⁻¹¹. V moderních aplikacích se běžně pro identifikaci neznámých látek využívá spojení separačních technik s hmotnostně-spektrometrickou detekcí, které umožňuje získat maximum informací o struktuře sledovaných analytů a dosáhnout vysoké citlivosti detekce¹¹⁻¹³. Pro studium chemické struktury studovaných látek obsažených v potravinách se uplatňují také spektrální techniky¹⁴.

Plynová chromatografie je nezastupitelnou analytickou metodou pro analýzu těkavých a semitěkavých látek. Umožňuje analyzovat nepolární a středně polární látky, které jsou termicky stabilní. K běžným aplikacím patří analýza aromaticky aktivních látek, jako jsou alkoholy, estery, karboxylové sloučeniny, terpenické látky, sírné sloučeniny, nitrily, nitrosloučeniny, dále také analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem, glykolů, sterolů a olejů^{3,15-18}. Pokud analyzované látky nespĺňují požadavky pro dostatečnou těkavost a tepelnou stabilitu, nemohou být GC systémem separovány či detekovány, anebo jsou polárnějšího charakteru, je nutné použít při zpracování vzorků některou z derivatizačních technik¹⁹⁻²¹. Hlavním účelem derivatizace je odstranění aktivních vodíkových atomů zavedením nové funkční skupiny do molekuly. Pro derivatizaci je možné využít silylace (BSTFA, TMCS aj.), acylace (acetanhydrid aj.) nebo alkylace (diazomethan aj.). S využitím derivatizace je možné pomocí GC systému analyzovat také sacharidy, aminokyseliny, karboxylové kyseliny, lipidy a lipofilní látky, fenolické látky nebo vitaminy^{1,22-25}. Separace látek je do velké míry ovlivněna polaritou stacionární fáze. Pro analýzu směsí látek s rozdílnými body varu se využívá teplotního programu. K detekci se nejčastěji využívá plamenově-ionizační (FID) nebo hmotnostně-spektrometrický detektor^{13,26} (MSD). Pro další aplikace lze pro detekci využít např. detektor elektronového záchytu (ECD), plamenově-ionizační detektor se solí alkalického kovu (AFID) aj.

Metoda kapalinové chromatografie je základní metodou pro analýzu potravin, která umožňuje analyzovat široké spektrum látek, od nepolárních až po silně polární. Zejména se ale využívá pro analýzu termolabilních a polárních látek, které nelze převést na těkavou

formu a analyzovat je GC systémem. Stanovení složek potravin lze provádět v systému normálních nebo reverzních fází. Separace analytů je významně ovlivněna složením mobilní fáze (vč. vlivu pH, iontové síly) a průtokovou rychlostí. Vhodnou volbou chromatografického systému je možné identifikovat a stanovit sacharidy, organické kyseliny, aminokyseliny, vitaminy, přírodní fenolické látky (anthokyaniny, fenolické kyseliny, flavonoidy), lipidy a fosfolipidy, biogenní aminy, proteiny, nukleové kyseliny a další vysokomolekulární organické látky^{1,3,27-31}. Pro detekci látek se využívá zejména fotometrický (UV/VIS) detektor a hmotnostně spektrometrický detektor¹³. Podle charakteru látek se uplatňuje také fluorescenční (FLD), refraktometrický (RID) nebo elektrochemický (ECD) detektor.

Alternativními analytickými technikami pro stanovení složek potravin jsou elektromigrační techniky, které pracují na principu rozdílné migrace iontů na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Kapilární zónová elektroforéza se primárně uplatňuje při analýze makromolekul, separaci proteinů a aminokyselin, při analýze chirálních látek, vitaminů, barviv a organických kyselin^{9,32,33}. Micelární elektrochromatografie umožňuje stanovit elektroneutrální látky pomocí přidavku povrchově aktivní látky do základního elektrolytu. Metoda může být aplikována např. pro analýzu vitaminů, antioxidantů nebo barviv³⁴. Kapilární izotachoforéza se využívá pro separaci ionogenních organických i anorganických látek^{10,35,36}, možnosti aplikace jsou z oblasti analýzy organických kyselin a bází, aminokyselin, peptidů nebo proteinů. Detekce je u elektromigračních technik obdobná jako u kapalinové chromatografie.

Z ostatních analytických metod mají uplatnění i spektrální techniky¹⁴, které poskytují důležité informace o chemické struktuře studovaných látek nebo slouží k povrchové analýze různých matic. Řadíme mezi ně spektrofotometrické metody v ultrafialové a viditelné (UV/VIS), infračervené oblasti (IR), nukleární magnetickou resonanci (NMR) a Ramanovu spektrometrii.

Nedílnou součástí analýzy potravin je výběr a použití vhodné extrakční techniky³⁷⁻⁴⁰. Klasickými analytickými technikami pro izolaci analyzovaných látek od ostatních složek matrice nebo naopak oddělení balastních látek od analytu jsou metody extrakce tuhá fáze - kapalina (SLE) a extrakce kapalina - kapalina (LLE). Tyto metody umožňují volbou různě polárních rozpouštědel extrahovat široké spektrum látek jako jsou aromatické látky obsažené ve vínech a destilátech, fenolické látky nebo mastné kyseliny^{28,38,39,41}. Pro zpracování kapalných vzorků a extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich

selektivnímu zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek matrice lze použít i extrakci tuhou fází (SPE), která v řadě aplikací nahrazuje klasickou LLE metodu. SPE je využívána např. pro zakoncentrování laktonů, flavonoidů ve vínech nebo aromatických látek v destilátech^{28,39,42-45}. K extrakci a zkoncentrování těkavých látek se využívá řada dalších technik, mezi které řadíme destilaci s vodní parou^{38,40} nebo headspace metody^{37,40} jako je statická (analýza těkavých látek v parní fázi nad vzorkem) a dynamická headspace (stripování vzorku inertním plynem). V řadě aplikací se pro analýzu aromatických složek potravin uplatňuje metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME), která se využívá k extrakci analytů z roztoku (DI-SPME) nebo z plynné fáze (HS-SPME) nad kapalným či pevným vzorkem. Výběrem vhodného vlákna je možné dosáhnout selektivní extrakce pro analyzované těkavé a semitěkavé látky bez nežádoucích příměsí. Metoda umožňuje mimo jiné prekoncentraci aromatických látek z rostlinných materiálů, alkoholických a nealkoholických nápojů, kávy, sýrů nebo medů^{39,46-51}.

2.2 Aromatické složky alkoholických nápojů

2.2.1 Aromatické složky vinných nápojů

Mezi vinné alkoholické nápoje, které se vyrábí zpracováním vinné révy řadíme víno, vínovici a grapu. Víno je alkoholický nápoj, který se vyrábí kvašením čerstvých a rozdrcených hroznů nebo hroznového moštu. Jeho destilací je možné získat vinný destilát, známý také jako vínovice. Vínovici však je možné označit pouze destilát s minimálním obsahem alkoholu 37,5 % (obj.), který zrál určitou dobu v nádržích⁵². Matolinovice (grapa) je destilát, který se vyrábí výhradně destilací zkvašených vinných výlisků (matolin). V zahraničí je matolinovice známá jako Grappaⁱ (Itálie), Eau-de-vie de marc (Francie), Bagaceira (Portugalsko), Tsipouro (Řecko) nebo Orujo gallego (Španělsko).

Tyto alkoholické nápoje obsahují velké množství sensoricky aktivních látek, které ovlivňují jejich kvalitu a vlastnosti. Dosud bylo identifikováno více než 800 různých látek^{53,54}, které se podílí na aroma vinných nápojů, avšak pouze malá část z nich patří mezi sensoricky významné látky⁵⁵. Hlavní skupiny aromatických látek vznikají během

ⁱ Grappa je dle EU chráněným názvem⁵¹, který mají právo užívat italské destilerie pro destilát vyrobený z výlisků hroznů očištěných o dřevité části stonků. Fermentace a destilace musí probíhat bez přídavku vody a jiných surovin.

technologického zpracování hroznů, v průběhu kvasného procesu, případné destilace a zrání produktů. Obsah látek je ovlivněn odrůdou vinné révy a také zralostí, kvalitou a původem hroznů. Významný podíl na chemickém složení mají i podmínky technologického zpracování a způsob a doba skladování produktů^{56,57}.

Látky obsažené v rostlinných buňkách hroznů nebo v moštu tvoří primární složku aroma vinných nápojů, tzv. odrůdové aroma⁵⁷. Jedná se především o látky ze skupiny monoterpenoidů (např. linalool, geraniol, nerol, citronellol a terpeniol), které se vyskytují v hroznech ve volné formě a určují charakteristické odrůdové tóny některých aromatických odrůd vinné révy⁵⁷ jako jsou např. muškátové odrůdy. Řada dalších sensoricky významných látek je v hroznech vázaná ve formě nearomatických prekurzorů. Tyto tzv. prekurzory aroma jsou při zpracování hroznů transportovány do moštu, kde dochází k jejich přeměně na odpovídající aromatické látky⁵⁸⁻⁶¹ jako jsou monoterpeny, C13-norisoprenoidy, těkavé fenoly, C6 sloučeniny nebo alifatické a aromatické alkoholy. Někdy bývají tyto látky řazeny také mezi složky primárního aroma^{62,63}. Mezi prekurzory aroma patří např. karotenoidy, glykokonjugáty, nenasycené mastné kyseliny nebo fenolické kyseliny. V závislosti na odrůdě vinné révy a stupni zralosti hroznů jejich obsah kolísá⁶⁴⁻⁶⁶ a ovlivňuje i množství aromatických látek s konečným produktem. Např. se zvyšujícím se stupněm zralosti hroznů se zvyšuje obsah tzv. C13-norisoprenoidů. Tyto významné sensorické látky vznikají postupnou přeměnou karotenoidů⁶⁷ (β -karoten, lutein a další) obsažených ve slupkách a jsou v hroznech vázány ve formě glykokonjugátů⁶⁷⁻⁶⁹. Některé norisoprenoidy mohou vznikat až při zpracování hroznů (tzv. neenzymatickou degradací karotenoidů) vlivem kontaktu slupek s moštem⁷⁰⁻⁷². Mezi sensoricky významné norisoprenoidy⁷³⁻⁷⁷ obsažené ve vínech a destilátech patří např. β -damascenon, α -ionon, β -ionon, vitispiran, (*E*)-1-(2,3,6-trimethylfenyl)-buta-1,3-dien (TPB) nebo 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen (TDN). Z uvedených látek byl β -damascenon identifikován jako významná složka aroma červených vín nebo odrůdových destilátů Muškát^{78,79}, β -ionon je považován za klíčovou aromatickou složku destilátů odrůdy Cabernet Sauvignon⁷⁷.

Během zpracování hroznů a následné fermentace mohou vznikat tzv. C6-sloučeniny⁸⁰ (hexan-1-al, hexen-2-al, hexanol, hex-2-en-1-ol a hex-3-en-1-ol), významné aromatické složky obsažené v moštu. K jejich vzniku dochází při enzymatické přeměně esterů nenasycených mastných kyselin (zejména ethyl linoleátu a linolenátu). Jejich obsah se snižuje se stupněm zralosti hroznů. Během fermentace dochází také ke vzniku sensoricky aktivních

fenolických látek (např. 4-vinylfenol, 4-ethylfenol, 4-vinylguaiakol a 4-ethylguaiakol), které se tvoří dekarboxylací volných hydroxyskořicových kyselin^{81,82}, kyseliny kumarové a ferulové. Z uvedených fenolů je 4-vinylguaiakol významnou složkou odrůdového aroma vína Tramín⁵⁷.

Významnou skupinu tzv. prekuzorů aroma reprezentují glykokonjugáty, tzn. glykosidicky vázané aromatické látky, které do velké míry přispívají ke složce odrůdového aroma^{60,61,83,84}. Předními zástupci jsou terpenoidy, a v menší míře také těkavé fenoly nebo C6-sloučeniny. K uvolnění aglykonu (necukerná část glykosidu) a rozvinutí jeho aroma dochází během enzymové nebo chemické hydrolýzy^{85,86}. Aromatické odrůdy jako je Muškát mohou obsahovat v porovnání s „neutrálními“ odrůdami hroznů až desetinásobné množství^{61,83,87} glykosidicky vázaných látek. Sensoricky významné látky reprezentují monoterpenoidy (linalool, geraniol, roseoxid, eukalyptol a vinný-lakton), které jsou důležité zejména pro odrůdy bílých vín⁶², dále těkavé fenolické deriváty eugenol, guaiakol, zingeron a methyl salicylát⁸⁸⁻⁹⁰, nebo výše uvedené norisoprenoidy. Některé další látky mohou vznikat chemickými přeměnami během fermentace, kdy dochází v aglykonech působením kvasinek ke strukturálním změnám (např. redukce geraniolu na citronello)⁵⁷.

K aroma vína a destilátů mohou přispívat i další terpenické látky ze skupiny sesquiterpenoidů⁹¹. Tyto látky jsou je v hroznech pravděpodobně obsaženy ve formě glykokonjugátů a k jejich uvolnění dochází vlivem enzymové hydrolýzy⁹². Tyto závěry nejsou ale dostatečně podloženy, protože problematika obsahu terpenických látek obsažených ve vinné révě byla doposud zaměřena především na skupinu monoterpenických látek. Nedostatečné vysvětlení výskytu sesquiterpenů v hroznech může být způsobeno také nevhodně zvolenými extrakčními technikami pro jejich izolaci nebo jejich malým výskytem u studovaných odrůd vinné révy. V hroznech některých německých odrůd (Tramín, Müller Thurgau, Optima aj.) byly identifikovány sesquiterpenické látky α -kopaen, β -ylangen, β -bourbonen, β -karyofyllen, α -humulen, α - a δ -muurolen, β -selinen, α -farnesen, γ - a δ -kadinen aj.^{63,93}, u španělských odrůd rovněž farnesol^{94,95}. U odrůdy Baga a Shiraz byly sesquiterpenické látky identifikovány jako volné složky aroma^{96,97}. Během výroby vín zřejmě nedochází k jejich dostatečnému přenosu do moštu a proto nejsou ve vínech a tudíž ani ve vinných destilátech běžně obsaženy. Výjimkou jsou např. sladká madeirská vína^{98,99}, u kterých byl identifikován farnesol, nerolidol, γ -eudesmol, α -kadinol a τ -muurolol. Naproti tomu jsou sesquiterpenické látky běžnou složkou matolinových destilátů, zejména pokud se

jedná o destiláty vyrobené z aromatických odrůd Muškát, Müller Thurgau nebo Tramín¹⁰⁰. Technologie výroby matolinových destilátů spočívá v přímém (dlouhodobém) kvašení drcených hroznů a tudíž se mohou tyto látky z hroznů lépe uvolnit a přejít do kvasu. Aromatické složky hroznů byly v řadě studií využity pro určení odrůdového aroma vinné révy. Můžeme tedy předpokládat, že mohou být prospěšné pro odhalení eventuálního falšování vín a odrůdových destilátů.

Majoritní část aromatických látek obsažených ve vínech a destilátech tvoří tzv. sekundární aroma. Tyto látky jsou formovány za působení kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰¹ během technologického zpracování hroznů a kvašení moštu chemickými, enzymatickými a termálními reakcemi (tzv. Maillardova reakce). Představiteli sekundárního aroma jsou vyšší alkoholy, estery, těkavé kyseliny, karbonylové sloučeniny, aj.⁴⁴ Jejich obsah je ovlivněn složením kvasu a různými fermentačními podmínkami¹⁰². Významné rozdíly ve složení způsobují také různé kultury kvasinek¹⁰³.

Alkoholy se vyznačují výraznými sensorickými vlastnostmi a zejména u destilátů představují majoritní složku sekundárního aroma^{44,104}. V závislosti na koncentraci mohou mít pozitivní (ovocné tóny vín a destilátů při nižších koncentracích) nebo negativní vliv (při vyšších koncentracích) na aroma¹⁰⁵. Hlavním zástupcem je ethanol, který je důležitý pro zrání vín a destilátů, jejich stabilitu a sensorické vlastnosti. Ovlivňuje také množství produkovaných aromatických látek a hraje důležitou roli při extrakci barviv a tříslovin během výroby červeného vína. Ze skupiny vyšších alkoholů můžeme uvést propanol, 2-methylpropan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol a pentan-1-ol, přičemž 3-methylbutan-1-ol a pentan-1-ol patří mezi hlavní sensoricky významné alkoholy obsažené v destilátech¹⁰⁶. Z aromatických alkoholů je významný 2-fenylethyl alkohol, a ve vínech také tyrosol. Jejich obsah se liší u jednotlivých odrůd vín, obecně se uvádí, že obsah alkoholů u červených vín je vyšší než u bílých vín⁵⁷. Rozdíl je zřejmě spočívá v různém technologickém způsobu zpracování hroznů.

Důležitou složku aroma představují mastné kyseliny (MK), zejména nasycené a nerozvětvené MK. Mezi hlavní zástupce nižších MK patří kyselina octová, která ve vínech představuje až 90 % z celkově obsažených MK¹⁰⁷, dále kyselina propionová, máselná a mléčná, které vznikají jako vedlejší produkty během fermentace. Kyseliny C8, C10 a C12 jsou produkovány kvasinkami jako meziprodukty biosyntézy C16 a C18 kyselin a společně

s ethylestery jsou přirozenými složkami alkoholických nápojů. Malá část mastných kyselin jako jsou kyselina olejová (18:1), linolová (18:2), linolenová (18:3) a palmitolejová (16:1) a kyselina palmitová (16:0) pochází přímo z hroznů, kde se vyskytují vázané ve formě lipidů^{108,109}. Kyseliny C14-C18 jsou ve vínech zastoupeny jen v nízkých koncentracích, ovšem představují podstatnou složku matolinových destilátů.

Charakteristické ovocné tóny do aroma vnáší estery¹¹⁰⁻¹¹⁵, které vznikají při přímé enzymové esterifikační reakci mezi alkoholy a mastnými kyselinami. Vzhledem k velkému množství přítomných alkoholů a MK jsou estery obsaženy ve velké variabilitě. K sensoricky významným se řadí ethyl acetát, 3-methylbutyl acetát, 2-methylpropyl acetát, 2-fenylethyl acetát, a dále ethyl estery nasycených nerozvětvených MK C4-C10^{112,116,117}. Ethylestery jsou oproti alkoholům v destilátech obsaženy v daleko nižších koncentracích, ale protože mají nízké prahové hodnoty, mohou i malé změny v jejich obsahu podstatně ovlivnit celkové sensorické vlastnosti destilátů⁵³.

Nízké prahové hodnoty vykazují i karbonylové sloučeniny, které jsou spolu s keto-kyselinami, klíčovými látkami při biochemické přeměně aminokyselin a sacharidů na vyšší alkoholy¹¹⁸. Hlavním zástupcem aldehydů ve vínech je acetaldehyd, který představuje až 90 % z celkového množství obsažených aldehydů a je důležitou složkou pro stabilizaci barvy červených vín. Z dalších aldehydů se ve vínech a destilátech vyskytují propan-1-al, 2-methylpropan-1-al, 3-methylbutan-1-al, 2-methylbutan-1-al, benzaldehyd a také furfural, který vzniká z obsažených sacharidů působením vyšších teplot¹¹⁹.

Během skladování a zrání se pomocí biochemických reakcí (oxidačně-redukční, esterifikační, polymerizační, polykondenzační a Maillardovy reakce) dotváří celkové aroma alkoholických nápojů⁵⁷. U vín je toto aroma označováno jako buket. Působením ethanolu dochází k nárůstu obsahu ethyl esterů vyšších mastných kyselin a vlivem transesterifikačních reakcí ke snížení obsahu ostatních esterů vyšších alkoholů (např. 3-methylbutyl acetátu aj.). V této fázi může také docházet k oxidaci terpenů či hydrolýze acetátů a ethyl esterů mastných kyselin. Všechny tyto reakce přispívají ke změnám v aroma. Někdy může být až potlačen prvotní květinovo-ovocný charakter aroma^{57,120}.

Pokud jsou alkoholické nápoje skladovány v dřevěných sudech, může docházet k extrakci látek obsažených ve dřevě a do vína a destilátů jsou transportovány další sensoricky významné látky. Proces je ovlivněn dobou skladování nápojů^{121,122}, kvalitou

sudů^{123,124} a jejich původem¹²⁵⁻¹²⁸. Skladování vín může probíhat v dřevěných sudech nebo speciálních vypalovaných dubových sudech nazývaných barrique (tato vína označujeme jako bariková). Za významné látky můžeme označit vanilin, syringaldehyd, kyselinu vanilovou (prekurzorem je lignin), různé hexosy a pentosy (prekurzorem je celulóza), polyfenolické látky a jednoduché fenoly jako je eugenol, guaiakol, furfural a 5-methylfurfural, mastné kyseliny a ostatní látky jako laktony, alkoholy nebo uhlovodíky¹²⁹⁻¹³¹. Extrahované látky mohou podléhat řadě mikrobiálních přeměn, jako je redukce furanových a dalších aromatických aldehydů na příslušné alkoholy¹³². To se odráží i na sensorických vlastnostech, protože alkoholy mají vyšší prahové hodnoty než aldehydy. Tento efekt je zvláště důležitý pro bariková vína^{133,134}. Některé látky přeměnám nepodléhají, např. eugenol a guaiakol jsou stabilnější než fenolické aldehydy¹³⁵⁻¹³⁷. V průběhu skladování může docházet kromě extrakce látek ze sudů i k částečné adsorbci těkavých látek jako je linalool nebo ethyl oktanoát^{138,139}. Všechny uvedené reakce významně ovlivňují organoleptické vlastnosti a kvalitu vína a destilátů. Vhodně skladovaná vína a destiláty patří mezi vysoce ceněné alkoholické nápoje a uvedené extrahovatelné látky mohou do jisté míry sloužit jako ukazatele kvality produktu.

2.2.2 Aromatické složky piva

Charakteristické aroma a další organoleptické vlastnosti piva¹⁴⁰ jsou ovlivněny obsahem celé skupiny látek. Významné složky aroma pocházejí ze základních pivovarnických surovin sladu a chmele nebo jsou formovány v průběhu vaření piva. Jejich obsah závisí na řadě faktorů jako je druh a původ použitých surovin a jejich množství, technologické podmínky výrobního procesu a druh použitých pivovarnických kvasinek¹⁴¹.

Chmel dodává pivu charakteristické chmelové aroma a specifickou nahořklou chuť zprostředkovanou tzv. α -hořkými (humulony) a β -hořkými kyselinami (lupulony)¹⁴²⁻¹⁴⁴. Celkový charakter vůně chmele je dán vzájemným poměrem všech složek chmelové silice. Na kvalitu chmele a složení obsahových látek má vliv půda a klimatické podmínky v oblasti pěstování¹⁴⁵. Chmelová silice obsahuje z 50-80 % terpenické uhlovodíky. Hlavní podíl v chmelové silici mají monoterpen β -myrcen a sesquiterpenické uhlovodíky β -karyofyllen a α -humulen^{143,146,147}. U české odrůdy chmele Žatecký poloraný červeňák byl také identifikován β -farnesen (14-20 %), který se u ostatních chmelů vyskytuje jen ve velmi malém množství nebo není obsažen vůbec¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Přítomnost farnesenu u české odrůdy je

pohlavně vázaným znakem¹⁵⁰. Jeho obsah může vlivem nevhodných skladovacích podmínek kolísat a je ukazatelem čerstvosti chmele¹⁵¹. Velký podíl terpenických uhlovodíků obsažených v chmelové silici se během chmelovaru ztrácí (vytěká) a do piva přechází jen malá část. Množství aromatických látek je dáno nejen odrůdou chmele, ale i technologií chmelovaru.

Významnou složkou chmelové silice jsou kyslíkaté sloučeniny^{143,150}, které se tvoří během zrání, zpracování a skladování chmele. Tyto složky jsou v porovnání s výše uvedenými terpenickými uhlovodíky lépe rozpustné ve vodě, ochotněji přecházejí do mladiny a do piva, a spoluvytvářejí tzv. chmelové aroma piva. K důležitým složkám patří izomerní mono- a di- epoxidy (humulen epoxid aj.)¹⁵⁰, které vznikají oxidací sesquiterpenických uhlovodíků β -karyofyllenu a α -humulenu. Obsaženy jsou některé estery terpenových alkoholů (geranyl acetát, propionát a 2-methylpropionát), které dodávají chmelové silici květinové aroma. Při jejich následné hydrolýze se tvoří terpenoidy^{143,150}, zejména terpenické alkoholy (geraniol, linalool, nerol, α -terpineol aj.) a aldehydy (geranial, neral aj.).

Mimo terpenické látky obsahuje chmel i další sensoricky významné látky^{143,146,152}, jako jsou různé estery karboxylových kyselin od C3 do C13 (zejména methyl hexanoát, methyl oktanoát, methyl dekanoát, methyl 4-decenoát, methyl deka-4,8-dienoát, 2-methylbutyl 2-methylpropionát aj.), aldehydy (od C6 výše, alifatické i aromatické) a ketony (methylketony od C6 výše, zejména undekan-2-on).

Slad je jednou ze základních surovin pro výrobu piva. Jeho kvalita má velký význam na požadované chemické složení a organoleptické vlastnosti piva. Během jeho zpracování (tzv. sladování) dochází k řadě enzymatických reakcí, které generují výchozí komponenty pro následné alkoholové kvašení. Mezi tyto pochody patří enzymové štěpení obsaženého škrobu na maltózu a dextriny pomocí amylázy, rozrušení celulózové kostry zrna cytázou nebo proteolytické štěpení bílkovin na polypeptidy¹⁵⁰. V průběhu alkoholového kvašení dochází působením např. kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (svrchně kvašená piva, např. anglická piva typu „ale“) nebo kvasinek *Saccharomyces uvarum* (spodně kvašená piva plzeňského typu „lager“) k přeměně zkvasitelných cukrů na alkohol. Mimo to se v malé míře tvoří i další sensoricky významné látky, které určují chuť a aroma piva^{150,153}.

Vyšší alkoholy patří k hlavním zástupcům aromatických látek a hrají také důležitou roli při vnímání ostatních složek piva. Hlavními zástupci jsou 2-methylpropan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol, propan-1-ol a 2-fenylethyl alkohol^{143,150}. Obsah

a zastoupení vyšších alkoholů je závislé na výběru vhodných kvasinek. Obecně se u svrchně kvašených piv vyskytuje vyšší koncentrace alkoholů než u spodně kvašených piv plzeňského typu¹⁵⁴. Významný rozdíl v obsahu alkoholů je také u piv domácí výroby, u nichž může být obsah alkoholů až desetkrát vyšší¹⁵⁰ než u komerčně vyráběných piv. Tyto rozdíly jsou dány technologií výroby. Vyšší alkoholy jsou prekurzory sensoricky významných esterů, společně s kterými představují významné komponenty aromatického profilu piv^{150,155} a jsou označovány za důležité ukazatele aroma jakostních piv¹⁴¹. Estery dodávají pivům květinovo-ovocné aroma, hlavními zástupci jsou ethyl acetát, 3-methylbutyl acetát, ethyl hexanoát, ethyl oktanoát a 2-fenylethyl acetát^{111,156}. Jejich obsah se liší podle druhu sladu, jeho složení a fermentačních podmínek¹⁵⁷. Významné rozdíly v obsahu ethylesterů jsou známy také pro použité kvasinky. Svrchně kvašená piva se projevují květinovo-ovocnými tóny, na kterých se do velké míry podílí obsažené estery. Obsah esterů se vlivem esterifikačních reakcí během skladování a zrání piva zvyšuje. Mohou vznikat i další významné estery jako je ethyl 3-methylbutanoát, ethyl 2-methylbutanoát, ethyl 2-methylpropionát, diethyl sukcinát, ethyl laktát, ethyl 2-fenylacetát, ethyl formiát, ethyl furoát nebo ethyl cinnamát¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Výjimkou je ethyl acetát, jehož obsah v průběhu skladování piv klesá¹⁶¹.

Před počátkem kvašení se v pivu v tzv. mladíně vyskytují i organické kyseliny. Jedná se zejména o kyselinu octovou a propionovou, a nižší mastné kyseliny C6-C12. Spodně kvašená piva obsahují také např. kyselinu 2-methylbutanovou a 3-methylbutanovou. Vzhledem k charakteru kyselin je jejich přítomnost v pivu ve vyšších koncentracích nežádoucí¹⁴³. Další složky aroma, jako jsou karbonylové sloučeniny, mohou vznikat oxidací alkoholů, odbouráváním aminokyselin^{150,158}, nebo se do piva dostávají jako složky chmele. Hlavním zástupcem aldehydů je acetaldehyd. Dále se v pivech vyskytují butan-1-al, pentan-1-al, 2-methylbutan-1-al, 3-methylbutan-1-al, benzaldehyd nebo 2-fenylacetaldehyd¹⁶². Z ketonů jsou přítomny např. aceton, butan-2-on, pentan-2-on, 3-hydroxybutan-2-on a 4-methylpentan-2-on. Během stárnutí piva se vlivem oxidace může zvyšovat obsah některých ketonů (např. 4-methylpentan-2-onu, 3-methylbutan-2-onu) a vicinálních diketonů (pentan-2,3-dionu, diacetylu)^{150,158}.

Způsob následné úpravy (např. pasterizace) a skladování piva se také podílí na celkovém aroma piva. Příkladem jsou ležácká piva, která získávají svou jedinečnou chuť a aroma dlouhodobým skladováním za vhodných podmínek. Během stárnutí piva dochází k dalším chemickým změnám ve složení, jako je degradace aminokyselin, oxidace vyšších

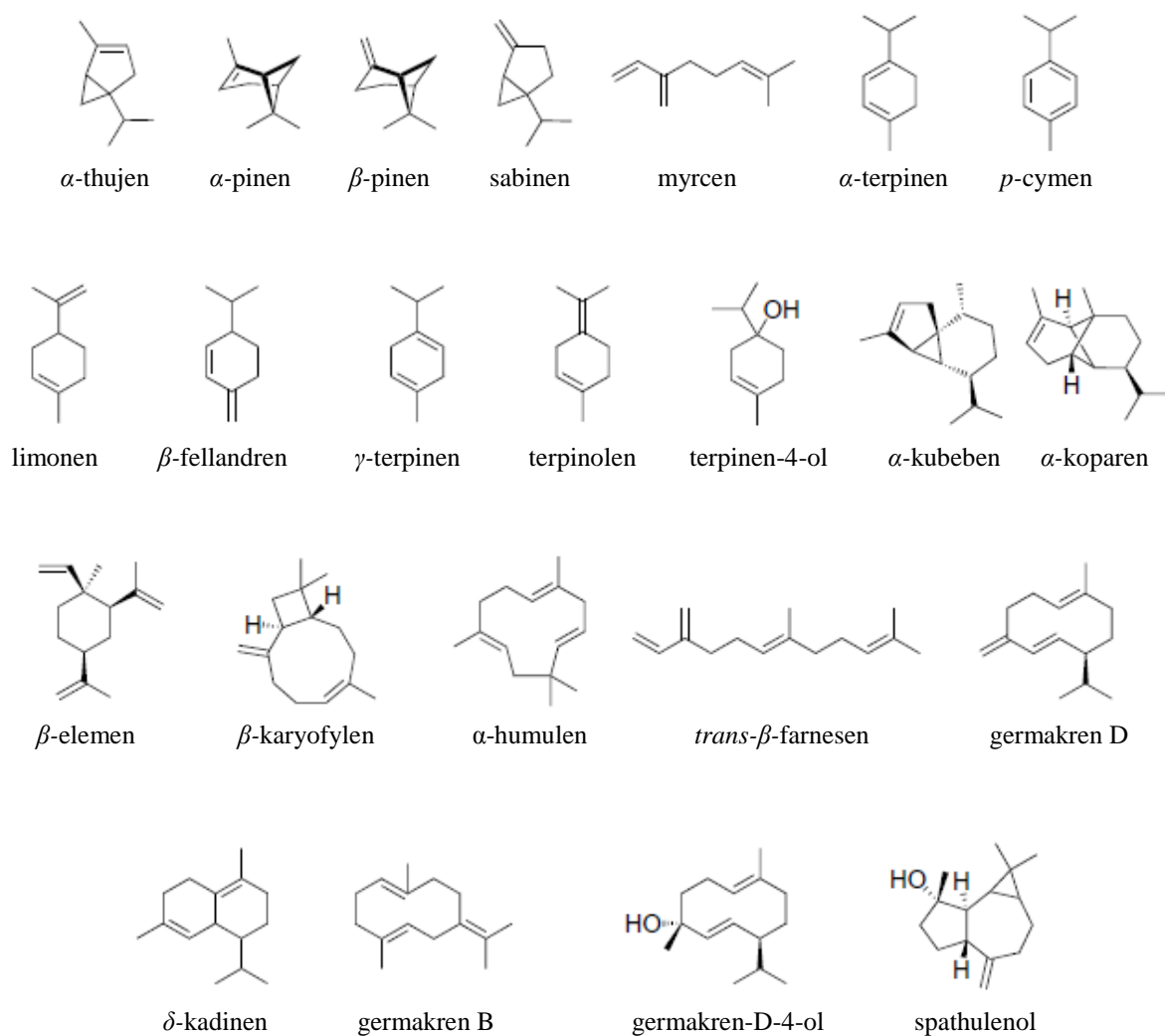
alkoholů nebo kondenzace karbonylových sloučenin s jinými látkami obsaženými v pivu¹⁶³⁻¹⁶⁵. Mohou vznikat také některé heterocyklické sloučeniny jako furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 2-propionylfuran, furan a 2-furfuryl alkohol, které jsou určitými ukazateli kvality piva^{166,167}. Podle podmínek skladování^{143,150,158} (vlivem teploty a intenzity světla) může docházet i k rozkladu a přeměnám mastných kyselin^{168,169} a α -hořkých kyselin na sensoricky nežádoucí látky, různé thioly (3-methylbut-2-en-1-thiol) a nenasycené aldehydy (2-(*E*)-non-2-enal).

2.2.3 Biosyntéza terpenických látek

Terpenoidyⁱⁱ jsou přírodní látky převážně rostlinného původu. Jsou podstatnou složkou rostlinných silic (etherických olejů) a pryskyřic. Mohou také sloužit k ochraně rostlin a zprostředkovávat důležité interakce mezi rostlinou a okolním prostředím¹⁷⁰ (interakce rostlina – opylovač). Jejich struktura je odvozena od jednotek isoprenu, podle počtu isoprenových jednotek dělíme terpenické látky na hemiterpeny (1 jednotka, C₅), monoterpeny (2 jednotky, C₁₀), sesquiterpeny (3 jednotky, C₁₅), diterpeny (4 jednotky, C₂₀) atd. Jako složky aroma se uplatňují především monoterpenické a sesquiterpenické látky¹⁴³.

Základními stavebními bloky pro biosyntézu všech terpenoidů jsou isopentenyl difosfát (IPP) a 3,3-dimethylallyl difosfát (DMAPP). IPP a DMAPP mohou vznikat dvěma nezávislými drahami^{171,172} (obr. 1). Tzv. MEV (isoprenoidní) cesta vychází z kondenzace jednotek acetyl-CoA na mevalonát, který je následně fosforylován a dekarboxylován na IPP. Druhou cestou je tzv. MEP cesta (cesta 2-C-methyl-D-erytriol 4-fosfátu), která vychází ze syntézy glyceraldehyd-3-fosfátu a pyruvátu. IPP a DMAPP mohou být vzájemně izomerovány pomocí IPP izomerasy. Kondenzace dvou jednotek C₅ (tedy IPP a DMAPP) je katalyzována enzymem prenyltransferasou. V případě, že se jedná konfiguraci „hlava-pata“, vzniká geranyl difosfát (GPP), který je prekurzorem pro monoterpenoidy limonen, linalool a eukalyptol aj. V případě konfigurace „pata-pata“ se jedná o neryl difosfát (NPP), prekurzor β -felandrenu nebo α -terpinenu.

ⁱⁱ Termín terpeny se používá pro označení terpenických uhlovodíků (např. limonen). Jako terpenoidy (resp. terpenické látky) se označují látky, které mají v molekule obsaženou některou funkční skupinu. Jedná se tedy např. o alkoholy (linalool), aldehydy (neral), ketony (karvon), ethery (roseoxid), estery (geranyl acetát) aj.



Obr. 2 Přehled některých terpenických látek⁹².

Reakcí GPP s další molekulou IPP dochází v případě klasické konfigurace „hlava-pata“ k syntéze farnesyl difosfátu (FPP) nebo konfigurací „pata-pata“ k syntéze *Z,Z*-FPP¹⁷¹, výchozí sloučeniny pro biosyntézu sesquiterpenů. Eliminací kyseliny pyrofosforečné z molekuly FPP dochází k syntéze β -farnesenu, β -karyofyllenu, nerolidolu aj. *Z,Z*-FPP je prekurzorem např. α -santalenu nebo *endo*- α -bergamotenu. Adice další jednotky IPP vede k tvorbě geranylgeranyl difosfátu (GGPP), prekurzoru pro tetraterpeny. Další reakce vzniku polyterpenů jsou analogické^{171,172}.

Monoterpeny, sesquiterpeny a diterpeny se vyskytují v podstatě v celé rostlině (květech, listech, plodech, semenech i kořenech). Jejich produkce je pro jednotlivé rostlinné

druhy specifická a liší se navzájem i mezi příslušnými varietami jednoho druhu (např. přítomnost β -farnesenu u odrůdy chmele Žatecký poloraný červeňák¹⁴⁸⁻¹⁵⁰). Proto právě terpenické látky mohou sloužit jako určité markery odrůdových vlastností. Příklady některých terpenických látek jsou na obr. 2.

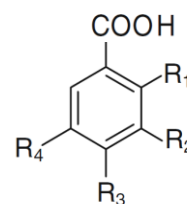
2.3 Fenolické kyseliny ve vínech

Fenolické kyseliny patří mezi významné sekundární metabolity rostlin^{173,174} rozšířené v celé rostlinné říši¹⁷⁵. Sekundární metabolity zastávají v rostlinách různé specifické funkce. Fenolické kyseliny mají antibakteriální účinky a také antioxidační vlastnosti. Zastoupení fenolických kyselin je pro dané rostlinné druhy specifické a stejně jako u ostatních sekundárních metabolitů se může mezi příslušnými varietami rostlinných druhů lišit¹⁷⁶.

Fenolické kyseliny se dělí podle chemické struktury na deriváty kyseliny hydroxybenzoové (C6-C1 struktura) a deriváty kyseliny hydroxyskořicové (C6-C3). Hlavními deriváty hydroxybenzoových kyselin jsou kyselina gallová, gentisová, p-hydroxybenzoová, protokatechová, syringová, salicylová a vanilová (tab. 1). Mohou se vyskytovat v různých částech hroznů, především jsou obsaženy ve slupkách. Obvykle se nachází ve volné formě¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, vázané s cukry, organickými kyselinami nebo vázané na buněčné stěny^{180,181} např. ve formě ligninů. Kyselina gallová je také součástí tanninů (tríslovin). Dimerizací kyseliny gallové vzniká kyselina ellagová, jeden z nejběžněji se vyskytujících rostlinných metabolitů, která je prekurzorem tzv. ellagotanninů¹⁸². Hydroxybenzoové kyseliny jsou ve vínech obsaženy v různém množství, které závisí na odrůdě hroznů a podmínkách pěstování. Z hydroxybenzoových kyselin má ve vínech nejvyšší zastoupení kyselina gallová, která nepochází pouze z hroznů, ale vzniká také hydrolýzou z hydrolyzovatelných a kondenzovaných tanninů během výroby a skladování vín^{57,183}. Ve vínech mohou být přítomny také další deriváty kyselin, např. ethyl ester kyseliny vanilové, p-hydroxybenzoové, methyl ester kyseliny vanilové a protokatechové¹⁸⁴.

Tab. 1 Struktura hydroxybenzoových kyselin

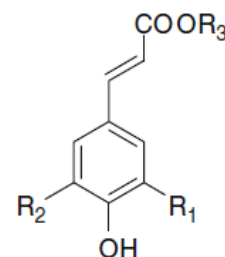
Kyselina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
gallová	H	OH	OH	OH
gentisová	OH	H	H	OH
p-hydroxybenzoová	H	H	OH	H
protokatechová	H	OH	OH	H
salicylová	OH	H	H	H
syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
vanilová	H	OCH ₃	OH	H



Hydroxyskořicové kyseliny (C6-C3) patří do skupiny fenyylpropanoidů⁵⁷. Hlavními zástupci jsou kyselina kávová, p-kumarová, ferulová a sinapová (tab. 2). Běžně se mohou v hroznech vyskytovat vázané především ve formě esterů s kyselinou chinovou (kyselina chlorogenová) a kyselinou vinnou nebo vázané ve formě glykosidů (estery glukózy)¹⁸⁰. Volné kyseliny jsou v podstatě produkty chemické nebo enzymatické hydrolýzy. Vzhledem k jejich skeletu (obsahují násobnou vazbu) se mohou vyskytovat v *cis*- nebo *trans*- konfiguraci. V rostlinách se vyskytují hlavně v *trans*-formě, která je stabilnější, ale působením UV záření mohou přecházet na *cis*-formu. Hydroxyskořicové kyseliny jsou primárně lokalizovány v pevných částech hroznů. Jejich obsah v hroznech je ovlivněn odrůdou vinné révy, stupněm zralosti (se zvyšujícím se stupněm zralosti obsah klesá^{57,187}), klimatickými a geografickými podmínkami pěstování^{173,185,186}. V průběhu technologického zpracování hroznů, fermentace a zrání vína dochází vlivem biochemických reakcí k dotváření výsledného profilu kyselin^{173,188,189}. Volné formy hydroxyskořicových kyselin mohou během zpracování vína sloužit také jako prekurzory aromaticky aktivních vinylfenolů^{81,82} (pouze kumarová a ferulová). Obsah hydroxyskořicových kyselin je v moštu a mladých vínech relativně malý, ale během skladování vín se jejich obsah zvyšuje. Ve vínech se vyskytují jako volné nebo ve formě esterů s kyselinou vinnou, které jsou hydrolyzovatelné a poskytují volné kyseliny. Kyselina chlorogenová se ve vínech nevyskytuje⁵⁷.

Tab. 2 Struktura hydroxyskořicových kyselin

Kyselina	R ₁	R ₂	R ₃
kávová	OH	H	H
p-kumarová	H	H	H
ferulová	OCH ₃	H	H
sinapová	OCH ₃	OCH ₃	H

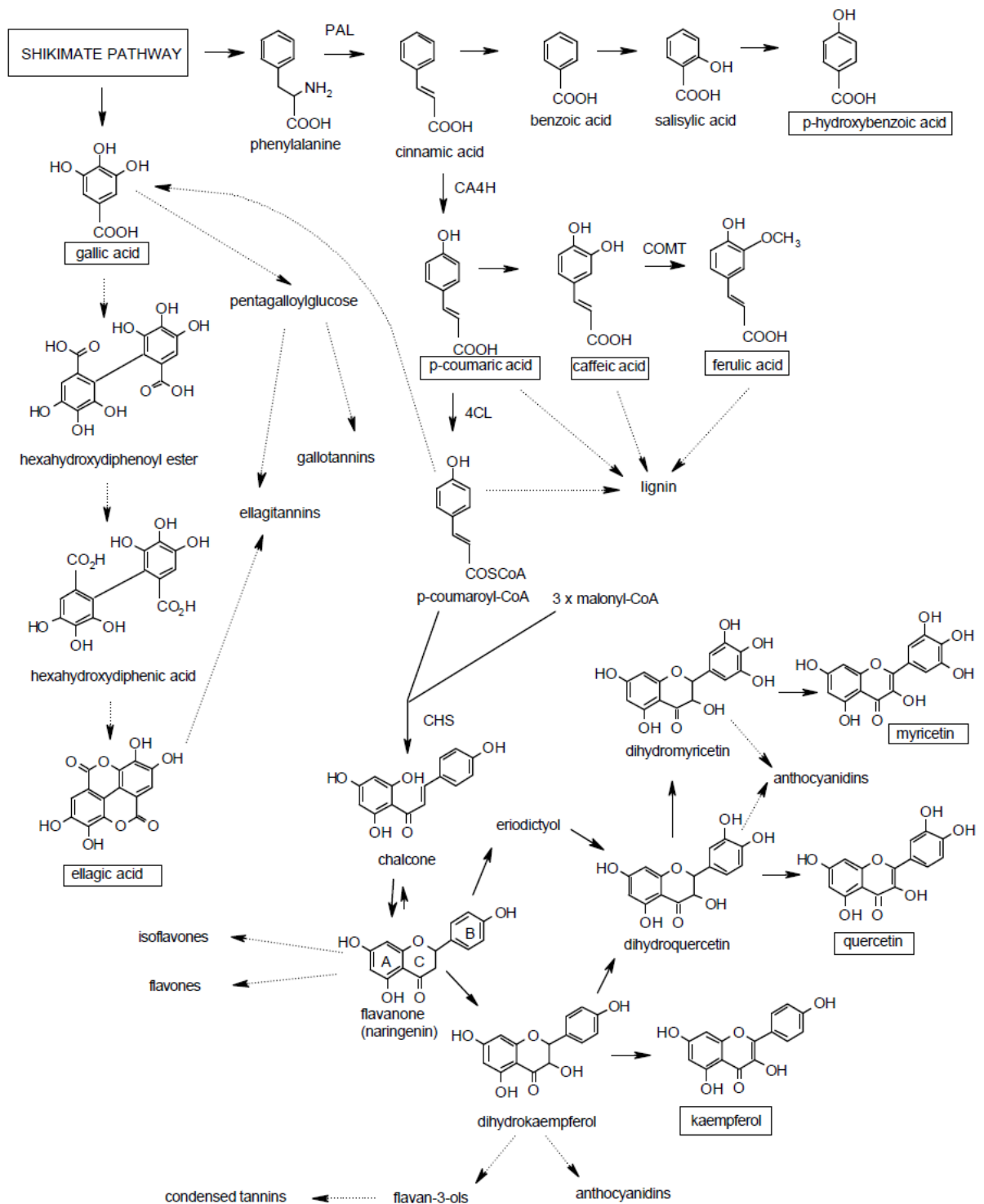


Biosyntéza fenolických kyselin probíhá několika navzájem nezávislými metabolickými drahami. Principiálně se uplatňují dvě hlavní metabolické dráhy^{171,176}. Jednou z nich tzv. polyketidová cesta, která je pokračováním biosyntézy mastných kyselin. Tato cesta vychází z kondenzace kyseliny octové nebo kyseliny propionové a dochází k tvorbě poly- β -ketonického řetězce. Tato dráha je důležitá pro syntézu *m*-substituovaných látek. Druhou možností je šikimátová dráha, která vychází z metabolismu sacharidů. Důležitými látkami jsou erytrosa-4-fosfát a fosfoenolpyruvát, které poskytují kyselinu šikimovou. Tato cesta vede k biosyntéze dvou aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu, které jsou důležitými prekurzory fenolických látek. Touto cestou také vznikají látky substituované v *o*- a *p*- poloze.

Biosyntéza hydroxyškořicových kyselin vychází z šikimátové cesty (z fenylalaninu) a je součástí metabolismu fenylpropanoidů^{171,176} (lignin, flavonoidy, kumariny aj.). Dekarboxylace fenylalaninu poskytuje kyselinu skořicovou. Reakce je katalyzována enzymem fenylalanin-amoniak lyasa (PAL). Z kyseliny skořicové vznikají následnými reakcemi různé fenolické kyseliny. Navázáním hydroxylové skupiny vzniká kyselina *p*-kumarová, reakce je katalyzována enzymem cinamát-4-hydroxylasa (CA4H). Systémem následných reakcí vznikají další hydroxyškořicové kyseliny. Kyselina kávová vzniká hydroxylací kyseliny *p*-kumarové, její následnou methoxylací vzniká kyselina ferulová. Kyselina *p*-kumarová může v některých případech vznikat také z tyrosinu. Preferovaná biosyntetická dráha se u jednotlivých rostlinných druhů liší¹⁷⁶. Hydroxyškořicové kyseliny jsou důležitými prekurzory ligninů, flavonoidů a dalších polyfenolů (obr. 3).

Biosyntéza hydroxybenzoových kyselin vychází také z šikimátové dráhy^{171,176}. Důležitým metabolitem je kyselina 3-dehydrošikimová, která je prekurzorem pro kyselinu gallovou a kyselinu protokatechovou. Řadou enzymatických reakcí dochází také k přeměně 3-dehydrošikimátu na deriváty kyseliny benzoové, jako je kyselina salicylová a kyselina gentisová. Hydroxybenzoové kyseliny mohou vznikat také z hydroxyškořicových kyselin tzv. β -oxidací^{171,176}, např. z kyseliny kumarové vzniká kyselina hydroxybenzoová, z kyseliny ferulové kyselina vanilová, z kyseliny sinapové kyselina syringová apod. Dalšími reakcemi, které zahrnují hydroxylace a methylace, mohou vznikat další hydroxybenzoové kyseliny, analogicky jako u hydroxyškořicových kyselin. Hydroxybenzoáty mohou vznikat také degradací flavonoidů¹⁹⁰. Biosyntéza hydroxybenzoových kyselin patří mezi méně prostudované dráhy v porovnání s biosyntézou hydroxyškořicových kyselin. Při syntéze fenolických látek se totiž

často uplatňuje pouze konkrétní část dráhy podle daných potřeb a preferencí příslušného rostlinného druhu¹⁷⁶.



Obr. 3 Biosyntéza fenolických látek¹⁹⁰.

2.4 Aromatické složky sýrů

Typické aroma a chuť sýrů jsou komplexním vjemem, na které má vliv především původ použitých surovin a způsob jejich technologického zpracování. Základní surovinou pro výrobu sýrů je kravské, kozí, ovčí nebo buvolí mléko. Mléko se dále upravuje přirozeným tzv. kyselým srážením (tzv. kyselé, tvarohovité sýry) nebo srážením pomocí syřidla a v něm obsažených enzymů (tzv. sladké sýry). Na výsledné složení sýrů má vliv nejen technologický způsob zpracování mléka, ale i podmínky pro zrání produktu a mikroorganismy použité zračí kultury^{191,192}. Bylo prokázáno, že schopnost produkovat aromatické sloučeniny je vysoce závislá na individuálním kmenu bakterií¹⁹³⁻¹⁹⁶. Například pro sýry zrající pod mazem (Romadúr, Olomoucké tvarůžky, Limburger) je důležitá kultura *Brevibacterium linens*, pro sýry s plísní na povrchu (Hermelín, De Brie) směsná kultura *Penicillium camemberti* a *Penicillium caseicolum* a pro sýry s plísní uvnitř (Roquefort, Niva) kultura *Penicillium roqueforti*^{192,196}.

Senzoricky aktivní látky vznikají během hlavních metabolických procesů z mléčné bílkoviny a tuků obsažených v mléce^{192,197}. Tyto procesy zahrnují proteolýzu a katabolismus aminokyselin, lipolýzu a katabolismus volných mastných kyselin, glykolýzu zbytkové laktózy a katabolismus laktátu, a katabolismus citrátu. K aktivaci procesů dochází působením endogenních enzymů obsažených v surovém mléce, vlivem srážecích enzymů nebo mikrobiálních enzymů¹⁹⁸. Převážná část uvedených mikrobiálních, biochemických a chemických pochodů probíhá během zrání, kdy sýry získávají své specifické vlastnosti. Obsah čítné skupiny aromatických látek a především jejich vzájemný poměr mohou být prostředkem pro charakterizaci jednotlivých sýrů.

Hlavními prekurzory aromatických látek obsažených v sýrech (methyl ketonů, alkoholů, laktonů a esterů) jsou mastné kyseliny. Volné mastné kyseliny (>C4) vznikají lipolýzou mléčného tuku z triglycerolů nebo odbouráváním aminokyselin^{197,199}. K lipolýze dochází vlivem enzymatického působení lipázy obsažené v mléce, nebo vlivem mikrobiální lipázy. Menší podíl volných mastných kyselin (obecně s 2 až 6 uhlíkovými atomy) pochází z rozkladu laktózy a aminokyselin. Kyseliny s kratším řetězcem lze také odvodit oxidací od ketonů, esterů a aldehydů^{200,201}. Na obsah těkavých mastných kyselin v sýrech má velký vliv pH prostředí. Pouze protonované formy mastných kyselin jsou aromaticky aktivní a přispívají k aroma sýrů²⁰². Významnými MK jsou kyselina octová a propionová, které jsou hlavními složkami pro sýr Čedar a Ementál²⁰³, kyselina butanová pro plísňový sýr

Camembert a zralý nízkotučný Čedar¹⁹², a dále kyselina pentanová, hexanová, dekanová a dodekanová. Pro aroma kozích a ovčích sýrů jsou sensoricky významné kyselina nonanová a rozvětvené MK^{201,204}, zejména kyselina 2-methylbutanová a 3-methylbutanová (produkty odbourávání aminokyselin isoleucinu a leucinu). Důležitými jsou také kyselina linolová a linolenová, které jsou významnými prekurzory pro osmi-uhlíkaté sloučeniny^{192,200} (1-okten-3-on, 1-okten-3-ol aj.).

Pro aroma sýrů zrajících na povrchu a sýrů s modrou plýsní (*P. roqueforti*, *candidum* nebo *G. P. camemberti*) jsou sensoricky významnými složkami ketony a methylketony. Methylketony vznikají z volných mastných kyselin při lipolýze mléčného tuku¹⁹². Mezi významné patří heptan-2-on, oktan-2-on, nonan-2-on, dekan-2-on a undekan-2-on. Ze sensorického hlediska je také důležitý 1-okten-3-on, který přispívá k aroma zralých sýrů a je obvykle spojován s houbovým pachem^{205,206}. Důležitým diketonem je butan-2,3-dion, který je formován z metabolismu laktózy a citrátu. Jeho produkce je podmíněna aktivitou mléčných bakterií²⁰⁷.

Deaminací aminokyselin a neenzymatickou Streckerovou degradací při termických procesech během zrání sýrů dochází ke vzniku aromaticky významných aldehydů²⁰⁸⁻²¹⁰. Fenylnaldehyd je důležitou složkou aroma pravé italské Mozzarely, aldehydy s rozvětveným řetězcem jako je 2-methylpropan-1-al, 2-methylbutan-1-al a 3-methylbutan-1-al jsou charakteristické pro zralé a plísňové sýry^{208,211,212}. Mezi sensoricky významné patří i nerozvětvené aldehydy²⁰¹ butan-1-al, pentan-1-al, hexan-1-al a nonan-1-al. Aldehydy jsou však pouze přechodné látky, které jsou během krátké doby přeměněny na odpovídající kyseliny nebo alkoholy. Ze skupiny sensoricky významných alkoholů můžeme uvést 2-fenylethyl alkohol²¹³, který byl identifikován jako jedna ze sensoricky významných složek aroma kozího sýra a také u Olomouckých tvarůžků²¹⁴. Pro čerstvé sýry je charakteristická přítomnost 3-methylbutan-1-olu. Dalším sensoricky významným alkoholem je 1-okten-3-ol, který je jednou z hlavních aromatických složek měkkých sýru Camembert nebo Mozzarella, a také složkou aroma některých tvrdých sýrů (Grana Padano). Intenzita jeho vnímání se zvyšuje v přítomnosti 1-okten-3-onu^{204,215}. To je důsledek synergického působení, tzn. že intenzita aroma látek s podobnými aromatickými vlastnostmi se sčítá. Sekundární alkoholy, jako je heptan-2-ol, byly identifikovány v aroma sýru Gorgonzola či Grana Padano²⁰¹. Sekundární alkoholy vznikají enzymatickou redukcí příslušných methyl ketonů.

Sladké květinovo-ovocné aroma sýrů je dáno přítomností sensoricky významných esterů, které vznikají esterifikačními reakcemi mastných kyselin s primárními nebo sekundárními alkoholy^{192,201}. Ethyl butanoát, ethyl hexanoát a ethyl oktanoát patří k hlavním složkám zrajících sýrů typu Ementál, Čedar či Gorgonzola²⁰¹. Ethyl 2-methylpropionát a ethyl 3-methylbutanoát patří mezi významné složky aroma sýru Mozzarella²¹² a 2-fenylethyl acetát sýru Camembert²¹⁵.

Řada klíčových sensoricky významných látek je produkována z metabolismu aminokyselin, které vnikají proteolýzou kaseinu. Rozkladem aminokyseliny methioninu vznikají sirné sloučeniny^{216,217}, které se vyznačují silným česnekovým aroma a vůní přezrálého sýra. Jejich prahové hodnoty jsou velice nízké. Ve velké míře se podílí na aroma plísňových sýrů a sýrů zrajících pod mazem^{192,201}. Hlavní sirnou sloučeninou je methional (3-methylsulfanylpropanal), který může při nízkých koncentracích pozitivně přispívat k celkovému aroma sýrů²¹⁸. Další významnou složkou je methanethiol, který je prekurzorem řady významných sirných látek, jako je dimethyldisulfid (DMDS) a dimethyltrisulfid (DMTS). Methanethiol je produkován z aminokyseliny methioninu²¹⁹ řadou mikroorganismů (*P. camemberti*, *G. candidum* a *B. linens*). Zvláště *B. linens* jsou klíčovými kulturami produkce sirných látek u sýrů zrajících pod mazem (Olomoucké tvarůžky) a sýrů s plísní na povrchu (Camembert)^{200,216}. Aminokyseliny valin a tryptofan jsou prekurzory dusíkatých látek. Ze skupiny pyrazinů^{193,220} se v sýrech vyskytují např. 3-isopropyl-2-methoxypyrazin, 2-isobutyl-3-methoxypyrazin, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin a 2,3-diethyl-5-methylpyrazin. Indol je hlavní dusíkatá složka sýru Mozzarella a skatol významně přispívá k vůni sýru Ementál^{193,201,220}. Rozkladem aminokyseliny tyrosinu vznikají fenolické látky^{193,221}, které přispívají k aroma sýrů již při velmi nízkých (prahových) koncentracích, avšak při vyšších koncentracích mohou nepříznivě působit na aroma sýrů a mohou způsobovat nepříjemný zápach. Hlavním zástupcem je p-kresol jako majoritní složka aroma sýru Čedar²²⁰.

Z dalších látek můžeme uvést např. laktony, které vznikají z hydroxymastných kyselin z metabolismu triacylglycerolů²²². Vzhledem k nízkým prahovým koncentracím jsou γ - a δ - laktony důležité pro celkové vnímání aroma. Mezi laktony vyskytující se v sýrech patří δ -lakton, složka sýrů Camembert a Ementál, a také δ -oktalakton a δ -dodekalakton, složky aroma sýru Čedar.

Uvedené metabolické dráhy mohou být ovlivněny jak surovinami a zrácími kulturami, tak i podmínkami pro zrání sýrů. Významnými parametry, které je nutné při výrobě sýrů kontrolovat jsou teplota a vlhkost vzduchu, které se také do jisté míry podílejí na jedinečnosti sýrů. Díky tomu mají sýry, svou příznačnou chuť a charakteristické aroma.

Kromě uvedených látek mohou sýry obsahovat i terpenické látky, které nepochází z výše uvedených metabolických drah, ale mají původ v rostlinné potravě dobytka. Vyskytují se často v sýrech, které jsou vyráběny z mléka pasoucího se dobytka²²³ a u ručně vyráběných sýrů. Mezi nejčastěji vyskytující se terpenické látky patří α -pinen, linalool, terpineol a isoborneol^{192,201}. Terpeny obsažené v sýrech mohou do jisté míry sloužit jako markery kvality použitých surovin.

2.5 Aromatické složky kávy

Káva patří pro svou chuť a nezaměnitelnou vůni mezi celosvětově oceňované nápoje. Aroma kávy je značně komplexní vjem. Doposud bylo identifikováno více než 800 látek²²⁴, které přispívají k celkovému aromatu kávy. Obsah aromatických látek je silně závislý na odrůdě kávy²²⁵, lokalitě jejího pěstování²²⁶⁻²²⁸ a podmínkách použitých při zpracování (pražení, způsob balení a skladování²²⁹⁻²³¹). Na trhu jsou k dostání především kávy z oblasti tropické Afriky, Střední a Jižní Ameriky a jižní Asie²³². Mezi nejvíce ceněné produkty patří plody kávovníku *Coffea arabica* (kávovník arabský), který zaujímá majoritní podíl trhu v celkové produkci kávových zrn (přibližně 70 %), a *Coffea canephora* (kávovník robusta) čítající přibližně 25% z celosvětové produkce kávy^{229,233}.

Hlavními složkami nepražených kávových zrn jsou sacharidy (fruktosa, glukosa, arabinosa aj., 5 – 15 %) a polysacharidy (hemicelulosa, celulosa, 34 – 53 %), lipidické sloučeniny (vosky, oleje, 8 - 18 %), kyseliny (kyselina octová, chinová, 1 – 3 %; kyselina chlorogenová 6 – 12 %), bílkoviny (8-12 %) a další dusíkaté látky (volné aminokyseliny, kofein, trigonellin, 1 – 4 %), které jsou prekurzory řady sensoricky významných látek²³⁴. Čerstvá nepražená káva obsahuje také některé aromaticky aktivní látky^{227,235,236}, jako jsou alkoholy (pentan-2-ol, 3-methylbutan-1-ol, 3-methyl-3-buten-1-ol, 2-fenylethyl alkohol), karbonylové sloučeniny (pentan-2-one, heptan-2-on, 3-hydroxybutan-2-one, 3-methylbutan-1-al, hexan-2-al, 2-nonen-1-al aj.) nebo estery (butyl acetát, 2-methylpropyl acetát, butyl acetát, 3-methyl-1-butyl acetát aj.). Identifikována byla také skupina

terpenických látek²³⁷, monoterpeny α - a β - pinen, β -myrcen, limonen, kamfen, sabinen, thujen, sesquiterpeny kopaen, β -bourbonen, karyofyllen, α -humulen nebo D-germakren. Zastoupení obsažených látek se může lišit jak stupněm zralosti kávových zrn²³⁸, tak i vlivem skladovacích podmínek (teplota, vlhkost)^{235,239}.

Klíčovým procesem pro tvorbu hlavní skupiny aromatických látek je pražení kávy^{224,240-243}. Při pražení dochází v kávových zrnech k přeměně obsažených škrobů na jednoduché sacharidy, jako je glukóza nebo fruktóza. Tyto sacharidy společně s ostatními sacharidy obsaženými v kávě částečně karamelizují za vzniku různých furanů (furanol, furfural, 2-furfuryl alkohol, 5-methylfurfural, hydroxymethylfurfural, sotolon, emoxyfuron aj.), které dodávají kávě karamelovou příchuť. Fragmentací sacharidů může docházet ke vzniku kyselin, jako je např. kyselina mravenčí, octová, glykolová a mléčná.

Tepelný rozklad tuků a sacharidů vede k tvorbě složek tzv. kávové esence^{232,244,245}, kdy dochází k tzv. Maillardově reakci mezi dusíkatými sloučeninami (proteiny, peptidy, aminokyseliny) a redukujícími cukry, hydroxykyselinami nebo fenoly. Probíhá také Streckerova degradace, na které se podílí aminokyseliny a α -dikarbonylové sloučeniny za vzniku dusíkatých heterocyklických sloučenin a oxazolů^{232,245}. Mezi složky kávové esence se řadí obsáhlá skupina heterocyklických sloučenin. Například aminokyseliny prolin a 4-hydroxyprolin jsou prekurzory různých pyridinů, pyrolů (1-methyl-*1H*-pyrol, 2-methyl-*1H*-pyrol, 1-ethyl-3-methyl-*1H*-pyrol, aj.) a pyrolyzinů (alkyl-, acyl- a furfurylpyrroly). Aminokyseliny serin a threonin jsou prekurzory pyrazinů a alkylpyrazinů. Mezi důležité se řadí 2-isopropyl-3-methoxypyrazin a 2-isobutyl-3-methoxypyrazin, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin nebo 2,3-diethyl-5-methylpyrazin. Rozkladem aminokyselin obsahujících síru (cystin, cystein a methionin) vznikají různé merkaptany, thiofeny, thiazoly. Ze sensorického hlediska jsou pro aroma kávy důležité 2-furfurylthiol, 2-furanmethanthiol s praženou vůní připomínající kávu¹⁴³ a také 5-methyl-2-furanmethanthiol. Dále vznikají některé alifatické sirné sloučeniny, které reprezentuje methional, dimethyltrisulfid, methanthiol, 3-methylbut-2-enthiol, 3-methylbut-1-enthiol, 3-merkpto-3-methylbutan-1-ol nebo 3-merkpto-3-methylbutyl formiát. Množství obsaženého methanthiolu je určitým ukazatelem čerstvosti kávy. Čerstvá káva obsahuje pouze malé množství methanthiolu a s dobou skladování jeho obsah narůstá^{241,246}.

Při pražení mohou vznikat také další karbonylové sloučeniny²²⁹ jako je 1-hydroxy-propan-2-on, ethan-1,2-diol diacetát, butan-2,3-dion, pentan-2,3-dion a některé

Streckerovy aldehydy jako je acetaldehyd, propan-1-al, methylpropan-1-al, 2-methylbutan-1-al, 3-methylbutan-1-al a další. Tvorba dusíkatých heterocyklických látek a oxazolů²³² (2-ethyloxazol, 2,4-dimethyloxazol aj.) probíhá také pomocí Streckerovy degradace, na které se podílí aminokyseliny a α -dikarboxylové sloučeniny.

Další heterocyklické látky vznikají z trigonellinu^{244,247} (N-methylnikotinová kyselina). Tento alkaloid obsažený v zelených zrnech kávovníku se během pražení kávy rozkládá na kyselinu nikotinovou a těkavé sensoricky aktivní látky²⁴⁸, jako jsou některé další pyridiny (pyridin, 3-methylpyridin a další alkylderiváty), bicyklické pyridiny a pyroly (1-methylpyrol, 1*H*-pyrol, 2-formyl-1-methylpyrol, 1-furfurylpyrol aj.). Pyridinům je do jisté míry přisuzován negativní vliv na aroma kávy¹⁴³.

Současně také probíhá degradace bílkovin a rozklad kyseliny chlorogenové, za vzniku kyseliny chinové, hydroxyskořicových kyselin a dalších fenolických látek jako jsou vanilin, guaiakol, 4-vinylguaiakol a 4-ethylguaiakol. Mohou vznikat i laktony kyseliny chinové a chlorogenové. Během pražení dochází také k rozkladu kávových pigmentů (karotenoidů) za vzniku β -damascenonu nebo vzniku některých diterpenoidů vlivem degradace lipidů^{143,245}.

Na chemické složení má také velký vliv způsob balení a skladování kávy. Složky aroma kávy, zejména sirné sloučeniny podléhají snadno oxidaci a pražená mletá káva při skladování za přístupu vzduchu brzy ztrácí své typické aroma. Aby se zabránilo nežádoucím změnám a káva si zachovala chuť a vůni, je nutné ji uchovávat v obalech v inertní atmosféře²²⁹.

2.6 Možnosti zpracování dat vícerozměrnými statistickými metodami

Identifikace několika málo klíčových látek (tzv. markerů) v obsáhlé skupině sloučenin, které jsme schopni moderními analytickými technikami stanovit, patří mezi složité analytické postupy. V praxi se často pro zpracování a interpretaci chemických výsledků využívají metody statistické analýzy vícerozměrných dat^{47,48,98,249-256}.

Vstupní vícerozměrná data určují tzv. zdrojovou matici dat, kterou tvoří **proměnné** v m sloupcích (tj. analyzované látky) a **objekty** nebo-li **pozorování** v n řádcích (jednotlivé vzorky), u kterých byly příslušné proměnné zkoumány²⁵⁷⁻²⁵⁹.

$$X \cdot \cdot \begin{bmatrix} \mathbf{x}_1^T \\ \cdot \\ \cdot \\ \mathbf{x}_j^T \\ \cdot \\ \cdot \\ \mathbf{x}_n^T \end{bmatrix} \cdot \cdot \begin{bmatrix} x_{1,1} & \cdot & x_{1,j} & \cdot & x_{1,m} \\ \cdot & & \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot & & \cdot \\ x_{i,1} & \cdot & x_{i,j} & \cdot & x_{i,m} \\ \cdot & & \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot & & \cdot \\ x_{n,1} & \cdot & x_{n,j} & \cdot & x_{n,m} \end{bmatrix} \cdot \cdot \begin{bmatrix} \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \end{bmatrix}$$

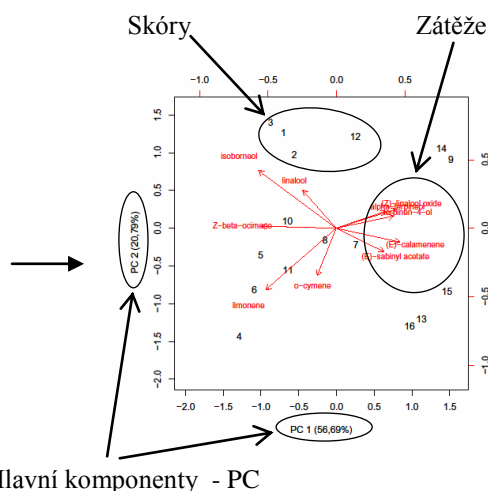
Postup interpretace závisí na typu dat a na druhu požadované informace, kterou chceme z dat získat²⁵⁹. Pokud chceme určit strukturu a vzájemné vazby mezi proměnnými a pozorováními, volíme metody redukce dimenzionality dat proměnných do menšího počtu nových tzv. latentních proměnných (analýza hlavních komponent, faktorová analýza aj.). Pro hledání struktury a vzájemných vazeb mezi pozorováními se využívají tzv. klasifikační metody, které jsou založené na jistých předpokladech o vlastnostech klasifikovaných objektů (shluková analýza, diskriminační analýza).

2.6.1 Metody pro určení struktury a vazeb

Analýza hlavních komponent – PCA

Jedná se o nejčastěji využívanou vícerozměrnou statistickou metodu. Hlavním cílem PCA je redukovat dimenzi původní matice dat s minimální ztrátou informace (ztotožněné s rozptýly statistických znaků) a transformovat primární data na nové proměnné tzv. hlavní komponenty (*Principal Component - PC*), obr. 4. Již několik prvních komponent obsahuje většinu informace z původních statistických znaků. Každá hlavní komponenta zároveň představuje lineární kombinaci původních hodnot z datové matice a výsledné tzv. skóry a zátěže umožňují studovat míru závislosti mezi proměnnými a pozorováními²⁵⁷⁻²⁵⁹. Výsledky PCA analýzy jsou zobrazeny formou biplotu²⁶⁰, který představuje tzv. zátěže a skóry prvních dvou hlavních komponent. Jednotlivé vzorky (pozorování) jsou v biplotu zobrazeny jako body (skóry) a studované proměnné jako šipky nebo vektory (zátěže).

DESTILÁT ^a	VYBRANÉ AROMATICKÉ LÁTKY ^b									
	(E)-kalamenen	limonen	o-cymen	linalool	isoborneol	(Z)-linalool oxid	terpinen-4-ol	Z-β-ocimen	(E)-sabinyl acedát	α-terpineol
1 An	2,25	4,84	1,87	207,64	6,88	7,34	8,54	3,88	7,75	50,40
2 Fr	2,43	2,87	1,39	117,91	3,63	4,33	8,93	2,84	5,59	17,86
3 Mer	2,84	2,89	0,77	90,56	4,80	3,68	5,22	1,90	1,24	11,25
4 CM	4,18	19,07	8,81	54,98	2,98	2,59	2,29	2,75	3,74	16,00
5 Rub	2,08	11,72	6,20	72,54	3,38	5,89	8,83	4,19	2,93	27,38
6 RM	3,47	7,76	3,52	41,62	2,60	1,91	2,21	2,44	3,88	10,84
7 Ari	12,30	3,98	2,79	56,40	1,45	8,33	8,61	3,49	7,73	51,31
8 Ali	2,88	5,02	3,72	49,94	2,00	5,95	16,78	2,26	5,49	30,74
9 Lau	35,14	0,89	1,48	45,41	1,19	18,63	20,88	1,15	5,33	70,56
10 Dom	3,10	4,45	2,41	71,87	2,73	2,54	4,44	2,35	4,85	28,89
11 MP	2,55	5,33	1,80	35,34	1,79	3,19	3,43	1,98	6,36	8,46
12 Ag	4,81	1,11	1,86	85,32	2,87	8,17	6,18	1,73	7,22	48,05
13 Ner	3,71	3,22	1,64	33,66	<0,20	4,72	7,14	<0,20	8,68	27,74
14 Zw	4,33	0,64	1,38	30,93	1,50	13,29	9,89	<0,20	7,95	52,77
15 CS	3,90	1,10	1,57	15,36	<0,20	5,66	9,68	<0,20	7,32	17,44
16 Dom	7,73	1,89	1,15	9,46	<0,20	4,27	6,63	1,28	7,03	17,42



Obr. 4 Redukce vstupní matice dat do prostoru hlavních komponent. Biplot popsán dvěma hlavními komponentami PC1 a PC2.

Faktorová analýza – FA

Faktorová analýza se podobně jako metoda hlavních komponent používá pro redukci počtu původních proměnných. U této metody se předpokládá, že každou vstupní proměnnou je možné vyjádřit jako lineární kombinaci společných skrytých faktorů a jediného chybového faktoru²⁵⁹. Na rozdíl od PCA se při faktorové analýze snažíme vysvětlit závislost proměnných. Nevýhodou metody je požadavek zadání počtu společných faktorů ještě před prováděním vlastní analýzy.

Na první pohled se tyto metody ve svých výstupech neliší a bývají někdy v praxi zaměňovány a nevhodně užity. Významný rozdíl však vychází právě z principu metod. Faktorová analýza se snaží najít vhodný model, který umožní objasnit kovariance a korelace původních proměnných pomocí několika málo společných teoretických faktorů. Analýza hlavních komponent není založena na predikujícím modelu, analyzuje celkovou varianci obsaženou v datech a slouží k zobrazení rozptýlů původních proměnných. V případě, že dojde u PCA ke zvýšení počtu komponent které popisují celkovou varianci v datech, nedojde ke změně původních komponent (např. přidáním další hlavní komponenty PC3 nedojde ke změně prvních dvou hlavních komponent PC1 a PC2), ale přidání dalšího faktoru

u faktorové analýzy se ostatní faktory podstatně změňí. Také výpočet skóůů je u faktorové analýzy daleko složitější než u metody hlavních komponent²⁵⁹.

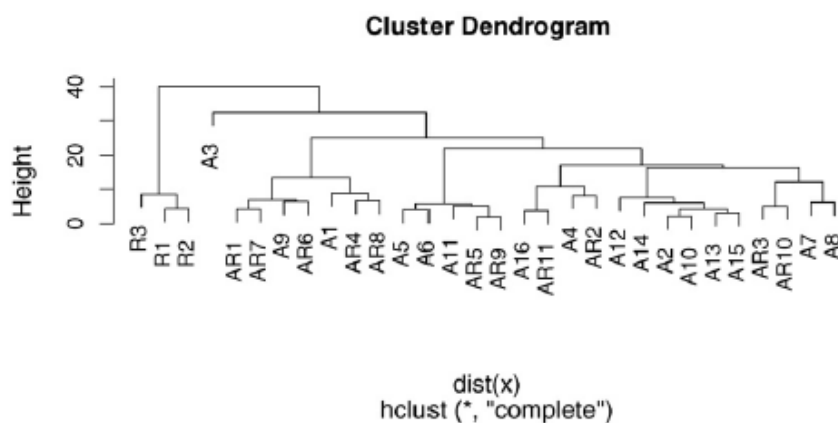
Kanonická korelační analýza – CA

Důležitá metoda pro určení vzájemných vazeb mezi proměnnými, která se používá ke zkoumání závislosti mezi dvěma skupinami proměnných, bez toho, aby byla specifikována závislost jedné skupiny proměnných na druhé²⁵⁹.

2.6.2 Metody pro klasifikaci objektů do skupin

Shluková analýza – CLU

Metoda se využívá pro hledání vazeb mezi pozorováními a k jejich následné klasifikaci do tříd nebo shluků na základě vzájemně podobných znaků, anebo pro identifikaci shluků v datech, které je možné využít v další analýze pro zjednodušení vícerozměrné matice²⁵⁹. Podle způsobu shlukování se postupy dělí na hierarchické a nehierarchické. Výsledky hierarchického shlukování jsou zobrazeny formou dendrogramu (obr. 5), který je určen použitou metrikou vzdáleností a shlukovacím algoritmem. Princip shlukové analýzy je založen na postupném spojování objektů do nadřazenějších skupin.



Obr. 5 Dendrogram – grafický výstup shlukové analýzy s využitím hierarchického shlukování.

Diskriminační analýza – DA

Diskriminační analýza se používá pro zkoumání závislosti mezi skupinou nezávisle proměnných (tzv. diskriminátory) kvantitativního typu a jednou kvalitativní závisle proměnnou. Metoda umožňuje zařazení (klasifikaci) objektu do jedné z předem daných tříd na základě největší míry jeho podobnosti s příslušnou třídou²⁵⁹.

2.6.3 Transformace vstupních dat

Ve většině případů, kdy pracujeme s chemickými pozorováními, vstupní matice dat obsahuje data vyjadřující kvantitativně podíly částí na celku, tzv. kompoziční data (kompozice). Často se taková data vyjadřují formou relativních procent nebo proporcí^{261,262}. Jediná relevantní informace je takto vlastně obsažena v podílech mezi jednotlivými proměnnými. Zejména při výskytu mnoha proměnných (převážně s nízkými koncentracemi) tak při použití standardních statistických metod často dochází k chybné interpretaci výsledků analýzy²⁵³. Například známá metoda hlavních komponent, založená na snaze o vysvětlení co největšího podílu celkové variability datového souboru pomocí několika málo nových proměnných, takto (původním) proměnným s nízkými koncentracemi nutně přiřadí malou váhu důležitosti. Přitom ale rozdíly mezi proměnnými s malými koncentracemi mohou mít daleko větší význam na odlišení objektů než proměnné s vysokými koncentracemi. Možným řešením se může zdát tyto proměnné z matice vyloučit, avšak to by mohlo vést v konečné fázi k nepřesným a zkreslujícím výsledkům analýzy. Jako rozumné řešení (pro získání relevantních výsledků analýzy) se proto nabízí upravit metodiku práce s daty⁴⁸.

Důležitým požadavkem je, aby metoda pro statistické zpracování kompozičních dat respektovala jejich přirozené vlastnosti, zejména tzv. relativní škálu kompozic. Například, pokud vedle sebe postavíme dvojice dat s koncentracemi určitých relativních jednotek 0,50 a 0,51 a dvojici 0,01 a 0,02, vidíme, že vzájemné rozdíly mezi hodnotami jsou u obou dvojic čísel stejné (liší se o 0,01 jednotky). V prvním případě je rozdíl v koncentracích zanedbatelný (nárůst o faktor 1,02). V druhém případě ale dochází ke dvojnásobnému zvýšení koncentrace (nárůst o faktor 2). Z hlediska vizuální konfrontace se jedná o stejnou „vzdálenost“ (tzv. euklidovská vzdálenost), ale z hlediska vzájemných poměrů se „vzdálenost“ mezi hodnotami liší. Standardní statistické metody pracující na principu užití euklidovské

vzdálenosti (obecněji euklidovské geometrie) nedokáží s tímto přístupem data zpracovat. V případě, že by tyto dvojice byly obsaženy v datové matici, klasická PCA by nedokázala rozdíly v koncentracích vhodně posoudit a výstupy analýzy by byly zatíženy chybou. K řešení problému se využívá aplikace tzv. logratio transformací na kompozice obsažené v datové matici. Tyto transformace umožní opět pracovat ve smyslu euklidovské geometrie a užít běžné statistické metody pro jejich zpracování. Konkrétně je v předkládané práci použita *clr* (centred logratio) transformace²⁶¹, která je výhodná právě pro konstrukci tzv. kompozičního biplotu, a následně také *ilr* (isometric logratio) transformace, která je využívána při jeho robustifikaci (viz níže).

Clr transformace zobrazuje D-složkovou kompozici $x = [x_1, \dots, x_D]$ na D-rozměrné pozorování²⁶³ podle rovnice (1)

$$y = [y_1, y_2, \dots, y_D] = \left[\ln \frac{x_1}{\sqrt[D]{\prod_{i=1}^D x_i}}, \dots, \ln \frac{x_D}{\sqrt[D]{\prod_{i=1}^D x_i}} \right] \quad (1)$$

Ve jmenovateli zlomků je geometrický průměr složek původní kompozice $x = [x_1, \dots, x_D]$, které jsou transformovány na nové proměnné $[y_1, y_2, \dots, y_D]$. *Clr* transformace datového souboru umožní výhodně interpretovat výsledky statistických metod, např. metody hlavních komponent²⁶³. PCA analýza zobrazí data formou kompozičního biplotu, kde střed souřadnic odpovídá geometrickému průměru datového souboru. PCA skóry mají obdobný význam jako v případě klasické PCA, tzn. zobrazují multivariační datovou strukturu proměnných.

2.6.4 Klasické versus robustní přístupy k řešení problému

Samotné statistické analýze kompozičních dat předchází analýza datového souboru (struktura dat a vzájemné vztahy mezi proměnnými). Případné odchylky reprezentované odlehlými pozorováními, které by ovlivnily výsledné výstupy a rozložení dat v biplotu je nutné eliminovat. K tomuto účelu je nutné aplikovat odpovídající robustní statistické nástroje, např. užít robustní PCA nebo metodu detekce odlehlých hodnot. Konkrétně v práci bylo pro řešení problematiky identifikace odlehlých hodnot v datové struktuře užito robustního kompozičního biplotu, jehož výsledky získané na základě užití robustní PCA jsou resistantní

vůči odlehlým hodnotám. Vzhledem k tomu, že použití robustní PCA není možné pro *clr* transformovaná data, je nutné skóry a zátěže metody hlavních komponent nejprve určit pomocí tzv. *ilr* transformace²⁶⁴.

Ilr transformace je definovaná pro kompozici $x = [x_1, \dots, x_D]$ vztahem (2)

$$\mathbf{z} = (z_1, \dots, z_{D-1})', z_i = \sqrt{\frac{i}{i+1}} \ln \frac{\sqrt[i]{\prod_{j=1}^D x_j}}{x_{i+1}}, i = 1, \dots, D-1 \quad (2)$$

kde (z_1, \dots, z_{D-1}) jsou nové transformované proměnné. *Ilr* transformovaná data jsou následně převedena do prostoru *clr* transformovaných kompozic²⁶⁴, které je možné zobrazit pomocí PCA. Výsledky PCA analýzy jsou zobrazeny formou robustního kompozičního biplotu.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené disertační práce bylo studium a identifikace specifických látek za účelem charakterizace a autentifikace vybraných potravin. Práce je blíže zaměřena na využití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro analýzu složek potravin a aplikaci vícerozměrných statistických metod pro interpretaci dat. Dílčí cíle lze formulovat takto:

- aplikovat vícerozměrné statistické metody za účelem identifikace markerů v potravinách
- prozkoumat možnosti aplikace některých matematických transformací pro studium a charakterizaci markerů ve vybraných potravinách
- analyzovat aromatické látky odrůdových vinných destilátů a aplikovat analýzu hlavních komponent s využitím transformace dat za účelem odhalení markerů odrůdových vinných destilátů
- analyzovat terpenické složení moravských destilátů typu grapa metodou mikroextrakce tuhou fází
- analyzovat aromatické složky v českých a zahraničních chmelech a prostudovat zastoupení složek chmelové silice v pivech za účelem charakterizace použitých surovin
- analyzovat fenolické kyseliny ve vínech a prostudovat možnosti aplikace analýzy hlavních komponent při zpracování a interpretaci dat
- analyzovat chemické složení Olomouckých tvarůžků a prostudovat proces zrání sýrů plynovou chromatografií a Ramanovou spektrometrií
- analyzovat aromatické složky kávy a identifikovat skupinu markerů pro rozlišení druhových káv

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemikálie

Při přípravě vzorků a následných experimentech byla využita kyselina vanilová, syringová, kávová, p-kumarová, ferulová, 4-cyklohexylbutanová, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), (*E*)-anethol, *allo*-aromadendren, aromadendren, borneol, α -bisabolol, citronelol, citronellal, β -ionon, isoborneol, eugenol, geraniol, α -humulen, limonen, linalool, (*E*)-karyofyllen, α -terpineol, (*Z*)- β -farnesen, furfural, β -myrcen, α -pinen, β -pinen (Fluka, Buchs, Švýcarsko); kyselina protocatechová (Dr. Theodor Schuschar dt, Mnichov, Německo); kyselina gallová, ethyl acetát, hexan, methanol, pyridin, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), směs n-alkanů C5–C20, β -damascenon, farnesol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty.

5.2 Pomůcky a přístroje

Pro experimenty byly využity 25, 35, 40 ml vialky pro headspace analýzu podle doporučení EPA (US Environmental Protection Agency), pH-metr Inolab SET/Sentix 41 (WTW, Weilheim, Německo), termoblok Evaterm (Labicom, Olomouc, Česká republika), centrifuga Eppendorf 5702 (Eppendorf, Hamburg, Německo), magnetická míchačka (Helago, Hradec Králové, Česká republika), SPME extrakční vlákna (Supelco, Bellefonte, USA):

- 75 μm - CAR/PDMS (Carboxen/Polydimethylsiloxane)
- 85 μm - CAR/PDMS (Carboxen/Polydimethylsiloxane)
- 100 μm - PDMS (Polydimethylsiloxane)
- 65 μm - CW/DVB (Carbowax/Divinylbenzene),
- 85 μm PA - (Polyacrylate)
- 50/30 μm - DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene/Carboxene/Polydimethylsiloxane, 2 cm, Stableflex)

Chromatografické analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu HP 6890 s hmotnostním detektorem 5973N (Agilent, Palo Alto, CA, USA) nebo plynovém

chromatografu HP 7890A s hmotnostním detektorem 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Byly použity kolony ZB-5MS (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm, Phenomex, Torrance, CA, USA), Rtx-5Sil MS (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm, Restek, Bellefonte, PA, USA), HP-5MS (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm, Agilent, Palo Alto, USA). Nosným plynem bylo helium (99,998 %; průtoková rychlost 0,9 ml/min).

Spektrometrická analýza sýrů byly provedena na FT-IR spektrometru (Nicelet FT-IR 6700, USA) vybaveným Nd:YaG argonovým laserem s excitační vlnovou délkou 1064 nm a germaniovým detektorem chlazeným kapalným dusíkem.

5.3 Software

Pro statistické zpracování dat byl použit software R (cit.²⁶⁵). Vyhodnocení dat měřených Ramanovou spektrometrií bylo provedeno pomocí vyhodnocovacího softwaru Origin 8.

5.4 Použité postupy

4.4.1 Analýza aromatických složek odrůdových vinných destilátů

Odrůdové vinné destiláty byly vyrobeny z červených vín (ročník 2007) pocházejících z pracoviště Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Oblekovicích. Hrozny odrůd André (An; 1), Frankovka (Fr; 2), Merlot (Mer; 3), Cabernet Moravia (CM; 4), Rubinet (Rub; 5), Rulandské modré (RM; 6), Ariana (Ari; 7), Alibernet (Ali; 8), Laurot (Lau; 9), Dornfelder (Dorn; 10), Modrý Portugal (MP; 11), Agni (Ag; 12), Neronet (Ne; 13), Zweigeltrebe (Zw; 14), Cabernet Sauvignon (CS; 15) a Domina (Dom; 16) byly pěstovány ve stejné lokalitě (Oblekovice, trať Finsko) a zpracovány stejnou technologií. Rozdrcené hrozny byly fermentovány po dobu 11 dní v plastových nádobách při teplotě 15 – 17 °C, následně byly hrozny vylisovány a mladé víno uchováno ve skleněných nádobách. Při výrobě vína nebyly použity žádné kvasné kultury ani pektolytické enzymy. Tato mladá vína byla použita pro výrobu odrůdových vinných destilátů. Vinné destiláty byly vyrobeny

z odrůdových vín opakovanou dvoustupňovou destilací v laboratorní destilační aparatuře. Získaný destilát byl naředěn na 47 % (obj.) ethanolu.

Extrakce aromatických látek u 16-ti odrůdových vinných destilátů byla provedena metodou HS-SPME. Pro extrakci bylo do 35 ml EPA vialky napipetováno 3 ml vzorku a 7 ml nasyceného roztoku NaCl, vialka byla uzavřena a do volného prostoru nad vzorkem bylo umístěno 50/30 μm – DVB/CAR/PDMS vlákno. Extrakce probíhala 60 min za stálého míchání (600 rpm) při laboratorní teplotě (23 °C). Pro analýzu byl použit plynový chromatograf HP 7890A vybavený kolonou HP-5MS a hmotnostním detektorem 5975C. Desorpce SPME vlákna probíhala 5 minut při 250 °C, teplotní program byl následující 50 °C – 5 °C/min – 250 °C (5 min), MS scan 29 – 370 m/z (70 eV). Identifikace neznámých aromatických látek byla provedena na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST 08 a známých elučních charakteristik. Kvantifikace látek byla provedena ze záznamu celkových spekter (TIC). Opakovatelnost metody byla určena ze tří paralelních stanovení, vypočítané relativní směrodatné odchylky (RSD %) ploch píků nebyly vyšší než 5 %. Zastoupení těkavých látek v odrůdových vinných destilátech bylo vyjádřeno formou průměrných hodnot ploch píků v relativních jednotkách ($\times 10^5$). Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí statistického softwaru R. Pro zpracování dat byla použita *clr* transformace dat a klasická metoda PCA.

4.4.2 Analýza terpenických látek v destilátech grapa

Vzorky šesti destilátů typu grapa byly získány od výrobců vín a vinných destilátů z jižní Moravy. Extrakce aromatických látek byla provedena metodou mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání (HS-SPME) a metodou přímého ponoření vlákna do roztoku (DI-SPME). Aby bylo možné extrakční postupy porovnat, bylo u obou postupů použito shodné množství vzorku. Pro HS extrakci bylo do 35 ml EPA vialky napipetováno 5 ml vzorku a 5 ml nasyceného roztoku NaCl, vialka byla uzavřena a do volného prostoru nad vzorkem bylo vloženo 50/30 μm - DVB/CAR/PDM extrakční vlákno. Pro DI-SPME analýzu bylo do 25 ml vialky napipetováno 5 ml vzorku a 20 ml destilované vody, vialka byla uzavřena a do roztoku bylo vloženo 50/30 μm - DVB/CAR/PDM extrakční vlákno. Extrakce probíhala 60 min za stálého míchání (HS 600 rpm; DI 300 rpm) při laboratorní teplotě (23 °C). Pro analýzu byl použit plynový chromatograf HP 6890 vybavený kolonou ZB-5MS

a hmotnostním detektorem 5973N. Desorpce SPME vlákna probíhala 5 minut při 250 °C, teplotní program byl následující 50 °C – 3 °C/min – 250 °C (5 min), MS scan 29 – 370 *m/z* (70 eV). Identifikace neznámých aromatických látek byla provedena na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST08, na základě porovnání vypočítaných retenčních indexů neznámých látek s indexy uvedenými v odborné literatuře²⁶⁶ a porovnáním s některými standardy. Kvantifikace látek byla provedena ze záznamu celkových spekter. Zastoupení těkavých látek bylo vyjádřeno formou průměrných hodnot ploch píků v relativních jednotkách ($\times 10^5$).

4.4.3 Analýza aromatických složek chmelů a piv

Vzorky granulovaných chmelů (české chmely Žatecký poloraný červeňák, Premiant, Sládek; německé chmely Hallertau Magnum, Hallertau Taurus; ročník 2008, vakuově balené) byly zakoupeny v místním specializovaném obchodě. Vzorky byly analyzovány ihned po otevření balení, aby nedošlo ke ztrátě aroma nebo případným nežádoucím chemickým přeměnám vlivem vzdušného kyslíku. Pro analýzu aromatických složek chmelové silice v českých a německých chmelech byl do 35 ml EPA vialky navážen 1 g drceného granulovaného chmele, vialka byla uzavřena, vložena do termobloku vyhřátého na 60 °C a do volného prostoru nad vzorkem bylo vloženo 50/30 μm - DVB/CAR/PDMS vlákno. Extrakce probíhala 60 min a poté byly složky chmelové silice analyzovány GC/MS systémem.

Vzorky českých a zahraničních piv byly zakoupeny v místním specializovaném obchodě a supermarketech. Piva domácí výroby byla připravena z mladinových koncentrátů (VÚPS, Mistr Sládek a Coopers) dle instrukcí uvedených výrobcem. Piva byla skladována v uzavřených láhvích v temném a chladném místě (minimálně 3 měsíce).

Pro stanovení terpenických látek v pivech bylo napipetováno 10 ml vzorku, vialka byla uzavřena a do volného prostoru nad vzorkem bylo vloženo 50/30 μm - DVB/CAR/PDMS vlákno. Extrakce probíhala 60 min za stálého míchání (600 rpm) při laboratorní teplotě (23 °C). Pro analýzu byl použit plynový chromatograf HP 7890A vybavený kolonou HP-5MS a hmotnostním detektorem 5975C. Desorpce SPME vlákna probíhala 5 minut při 250 °C, teplotní program byl následující 50 °C – 3 °C/min – 190 °C – 10 °C/min – 250 °C (10 min), MS scan 29 – 370 *m/z* (70 eV). Identifikace látek byla

provedena na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST08 a známých elučních charakteristik. Kvantifikace látek byla provedena ze záznamu celkových spekter. Zastoupení těkavých látek bylo vyjádřeno formou průměrných hodnot ploch píků v relativních jednotkách.

4.4.4 Analýza fenolických kyselin ve vínech

Vzorky českých vín byly zakoupeny v místních obchodech a specializovaných prodejnách. Pro extrakci bylo do 10 ml centrifugační zkumavky napipetováno 5 ml vína okyseleného na pH 2 (100 μ l 2M HCl), 1ml nasyceného roztoku NaCl, 100 μ l methanolického roztoku vnitřního standardu (kyselina 4-cyklohexylbutanová, 50 mg l^{-1} ; výsledná koncentrace ve vzorku 1 mg l^{-1}) a 2 ml ethylacetátu. Vzorek byl extrahován vytřepáváním a vzniklá emulze byla odstraněna pomocí centrifugy (30 sec, 3000 rpm). Organická fáze byla odpipetována do skleněné vialky a extrakt byl odpařen do sucha na vyhřívacím termobloku (35 °C) pod proudem dusíku. Následně bylo ke vzorku přidáno 100 μ l pyridinu a 100 μ l BSTFA. Uzavřená vialka byla zahřívána 30 min v termobloku při 70 °C. Po vychladnutí byly derivatizované vzorky doplněny hexanem do celkového objemu 1 ml a analyzovány GC/MS systémem. Pro analýzu byl použit plynový chromatograf HP 6890 vybavený kolonou ZB-5MS a hmotnostním detektorem 5973N. Teplotní program byl následující 50 °C (2 min) – 10 °C/min – 300 °C (10 min), nástřik 1 μ l (splitless, 140 kPa, 24 s), MS scan 29 – 370 m/z (70 eV). Identifikace fenolických kyselin byla provedena na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST 08 a porovnání se standardy. Ke kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu. Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí statistického softwaru R. Pro zpracování byla použita *clr* a *irl* transformace dat a data byla zpracována PCA metodou v klasickém a robustním uspořádání.

4.4.5 Analýza Olomouckých tvarůžků

Pravé Olomoucké tvarůžky jedné výrobní šarže byly získány od firmy A. W. spol. s r. o., Loštice, Česká republika. Vzorky sýrů byly skladovány v originálním balení při 5 ± 2 °C. Pro SPME-GC/MS analýzu byl vždy použit celý tvarůžek z nově

otevřeného balení, z kterého bylo naváženo 10 g. V případě Ramanovy spektrometrie byly pro analýzu použity kousky o velikosti $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ cm, povrchová a vnitřní část sýru byla měřena samostatně.

Pro výběr vhodného extrakčního SPME vlákna pro analýzu tvarůžků bylo do standardních 40 ml EPA vialek naváženo 10 g rozmělněného vzorku, vzorek byl vložen do termobloku a zahříván po dobu 30 min při teplotě 60 °C. Poté bylo do volného prostoru nad vzorkem umístěno SPME vlákno a byla provedena sorpce po dobu 30 min při téže teplotě. Tento postup byl proveden pro všechna testovaná extrakční vlákna (85 μm - CAR/PDMS, 50/30 μm - DVB/CAR/PDMS, 100 μm - PDMS, 65 μm - CW/DVB, 85 μm - PA), která byla před prvním použitím kondicionována dle instrukcí specifikovaných výrobcem. Při volbě extrakčních podmínek byly testovány různé teploty pro ekvilibraci vzorku (25, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 °C) a doba extrakce (10, 20, 30, 40, 50 a 60 min).

Pro chromatografickou analýzu aromatických složek Olomouckých tvarůžků bylo do standardních 40 ml EPA vialek naváženo 10 g rozmělněného vzorku, vialka byla uzavřena, vzorek byl vložen do termobloku a zahříván 30 min při teplotě 70 °C. Poté bylo do volného prostoru nad vzorkem vloženo 50/30 μm - DVB/CAR/PDMS vlákno, extrakce probíhala 30 min při 70 °C. Desorpce SPME vlákna 5 minut při 250 °C. Pro analýzu byl použit plynový chromatograf HP 6890 vybavený kolonou ZB-5MS a hmotnostním detektorem 5973N. Teplotní program byl následující 50 °C – 5 °C/min – 250 °C (10 min), MS scan 29 – 370 m/z (70 eV). Identifikace neznámých aromatických látek byla provedena na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST98 a známých elučních charakteristik. Kvantifikace látek byla provedena ze záznamu celkových spekter. Zastoupení těkavých látek v sýrech bylo vyjádřeno formou průměrných hodnot ploch píků v relativních jednotkách ($\times 10^5$)

Paralelně byla provedena analýza sýrů na FT-IR spektrometru vybaveným Nd:YAG laserem s excitační vlnovou délkou 1064 nm a dusíkem chlazeným germaniovým detektorem. V předběžném experimentu byla testován výkon laseru v rozsahu 100 až 1000 mW, z tohoto rozsahu byl pro další experimenty zvolen výkon 500 mW, který poskytoval spektra v nejlepší kvalitě. Pro každý experiment bylo provedeno 1024 scanů, každý vzorek byl měřen 5x. Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí vyhodnocovacího softwaru Origin 8.

4.4.6 Analýza aromatických složek kávy

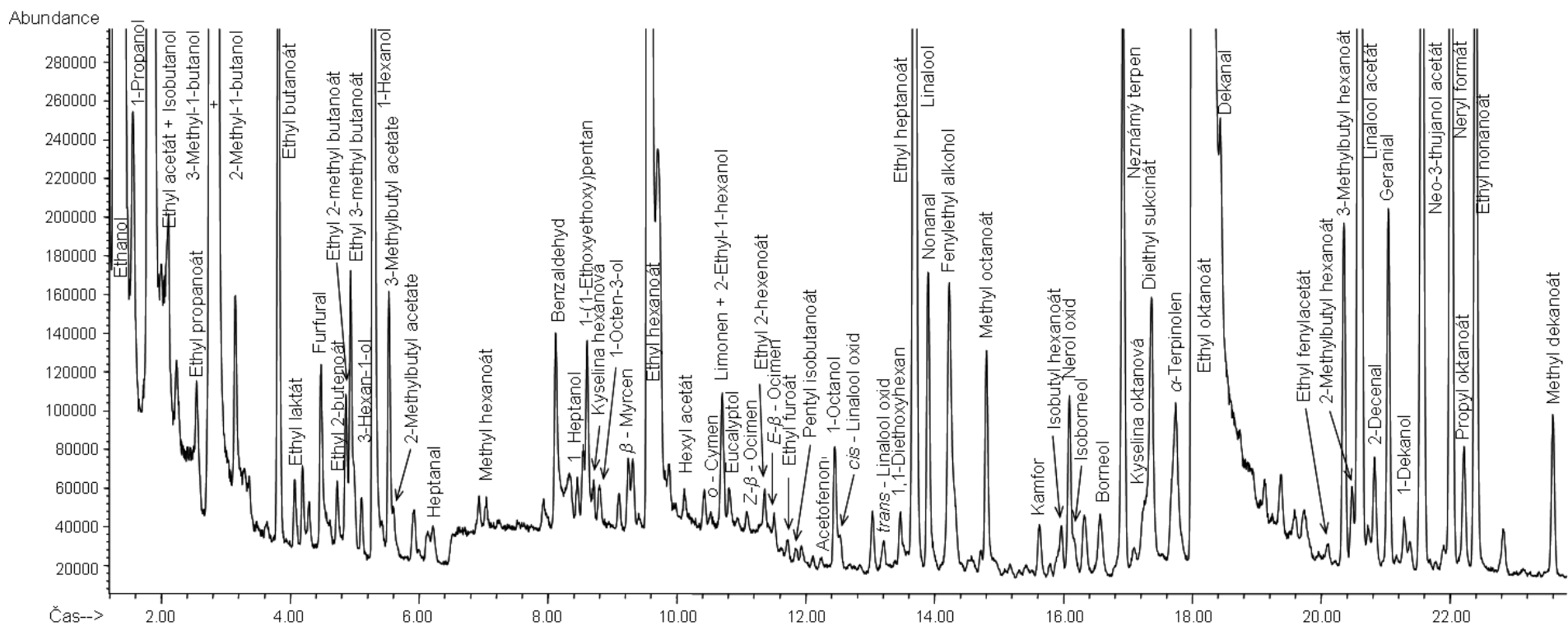
Vzorky káv zahrnovaly pražené kávy druhu Arabika (A; 16 vzorků), druhu Robusta (R; 3 vzorky) a směsi druhů Arabika – Robusta (AR; 11 vzorků). Pro analýzu aromatických složek byly do standardních 40 ml EPA vialek naváženy 2 g vzorku mleté kávy, vialka byla uzavřena a do volného prostoru nad vzorkem bylo vloženo 75 μm – CAR/PDMS vlákno. Extrakce probíhala 60 min při laboratorní teplotě (23 °C). Pro analýzu byl použit plynový chromatograf HP 6890 vybavený kolonou Rtx-5 Sil a hmotnostním detektorem 5973N. Desorpce SPME vlákna probíhala 10 minut při 250 °C, teplotní program byl následující 40 °C (2 min) – 5 °C/min – 200 °C (5 min), MS scan 29 - 370 m/z (70 eV). Identifikace aromatických látek byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST98 a známých elučních charakteristik. Kvantifikace látek byla provedena ze záznamu celkových spekter. Zastoupení těkavých látek v druhových kávách bylo vyjádřeno formou průměrných hodnot ploch píků v relativních jednotkách ($\times 10^4$). Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí statistického softwaru R. Pro zpracování byla použita *clr* transformace dat a klasická metoda PCA.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza aromatických složek odrůdových vinných destilátů

Metodou HS-SPME-GC/MS byla u vzorků 16-ti odrůdových vinných destilátů identifikována skupina aromatických látek. Chromatogram analýzy vinného destilátu odrůdy André je uveden na obr. 6. Z této obsáhlé skupiny látek byl vybrán užší soubor aromatických složek, které mohou být zodpovědné za primární odrůdové aroma studovaných odrůdových destilátů. Typickými představiteli odrůdového aroma jsou terpenické látky, které byly v řadě odborných publikací prezentovány jako významné složky aroma hroznů^{63,267,268}, vín^{56,269,270}, vinných destilátů²⁷¹ a matolinových destilátů^{44,77,272,273}.

Pro určení vzájemného vztahu odrůdových destilátů a primárních aromatických látek byla aplikována statistická metoda PCA. Data získaná chemickou analýzou senzoričky aktivních látek jsou z matematického hlediska vyjádřena formou relativní informace a odpovídají kompozičním datům (tzv. kompozice). V případě, že by byla na tato data aplikována klasická PCA, mohlo by dojít z důvodu odlišné geometrie a vlivem případných obsažených odlehlých hodnot k nesprávnému zpracování dat²⁶³. Takové zpracování dat zobrazených formou biplotu by mohlo vést k nesprávné interpretaci výsledků a nebylo by možné určit vzájemný vztah mezi složkami aroma a odrůdovými destiláty. Z toho důvodu byla v první řadě na data aplikována *clr* transformace²⁶⁴, data byla ošetřena o případné odlehlé hodnoty a získané skóry a zátěže transformovaných dat byly zobrazeny pomocí tzv. kompozičního biplotu⁴⁸. Analýzou datového souboru byla na základě porovnání vzájemných rozptylů transformovaných proměnných vybrána skupina potenciálních markerů: *o*-cymen, limonen, (*Z*)- β -ocimen, (*Z*)-linalool oxid, linalool, isoborneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, (*E*)-sabinyl acetát a (*E*)-kalamenen. Zastoupení vybraných terpenických látek u studovaných odrůdových vinných destilátů jsou uvedeno v tab. 3.



Obr. 6 HS-SPME-GC/MS chromatogram odrůdového vinného destilátu André

Tab. 3 Zastoupení vybraných aromatických látek v odrůdových vinných destilátech

Destilát	Vybrané aromatické látky ^a										
	limonen	<i>o</i> -cymen	linalool	isoborneol	(<i>Z</i>)-linalool oxid	terpinen- 4-ol	<i>Z</i> - β -ocimen	(<i>E</i>)-sabinyl acetát	α -terpineol	(<i>E</i>)-kalamenen	
1 An	4,84	1,87	207,64	6,88	7,34	8,54	3,88	7,75	50,40	2,25	
2 Fr	2,87	1,39	117,91	3,63	4,33	8,93	2,84	5,59	17,86	2,43	
3 Mer	2,89	0,77	90,56	4,80	3,68	5,22	1,90	1,24	11,25	2,84	
4 CM	19,07	8,81	54,98	2,98	2,59	2,29	2,75	3,74	16,00	4,18	
5 Rub	11,72	6,20	72,54	3,38	5,89	8,83	4,19	2,93	27,38	2,08	
6 RM	7,76	3,52	41,62	2,60	1,91	2,21	2,44	3,88	10,84	3,47	
7 Ari	3,98	2,79	56,40	1,45	8,33	8,61	3,49	7,73	51,31	12,30	
8 Ali	5,02	3,72	49,94	2,00	5,95	16,78	2,26	5,49	30,74	2,88	
9 Lau	0,89	1,48	45,41	1,19	18,63	20,88	1,15	5,33	70,56	35,14	
10 Dorn	4,45	2,41	71,87	2,73	2,54	4,44	2,35	4,85	28,89	3,10	
11 MP	5,33	1,80	35,34	1,79	3,19	3,43	1,98	6,36	8,46	2,55	
12 Ag	1,11	1,86	85,32	2,87	8,17	6,18	1,73	7,22	48,05	4,81	
13 Ner	3,22	1,64	33,66	<0,20	4,72	7,14	<0,20	8,68	27,74	3,71	
14 Zw	0,64	1,38	30,93	1,50	13,29	9,89	<0,20	7,95	52,77	4,33	
15 CS	1,10	1,57	15,36	<0,20	5,66	9,68	<0,20	7,32	17,44	3,90	
16 Dom	1,89	1,15	9,46	<0,20	4,27	6,63	1,28	7,03	17,42	7,73	

^a Průměrné hodnoty ploch píků v relativních jednotkách ($\times 10^3$; $n = 3$, $RSD \leq 5\%$); An – André, Fr – Frankovka, Mer – Merlot, CM – Cabernet Moravia, Rub – Rubinet, RM – Rulandské modré, Ari – Ariana, Ali – Alibernet, Lau – Laurot, Dorn – Dornfelder, MP – Modrý Portugal, Ag – Agni, Ner – Neronet, ZW – Zweigeltrebe, CS – Cabernet Sauvignon, Dom – Domina.

Většina odrůd vinné révy, ze kterých byly odrůdové vinné destiláty vyrobeny, vznikly tzv. novošlechtěním tj. křížením mezi odrůdami evropské révy nebo meziodrůdovým křížením (tab. 4). Vzájemné podobnosti a odlišnosti mezi odrůdami vinné révy se odráží v zastoupení primárních aromatických látek obsažených v hroznech. Tyto látky přechází během výrobního procesu do příslušných vín a destilátů a jejich sensorické vlastnosti se odráží v odrůdovém aroma těchto alkoholických nápojů.

Pro identifikaci potenciálních markerů jednotlivých modrých odrůd byla na transformovaná data aplikována analýza hlavních komponent. Výstupy PCA analýzy jsou zobrazeny formou kompozičního biplotu (obr. 7), který je popsán dvěma hlavními komponentami, z nichž PC1 pokrývá 56,69 % a PC2 20,79 % celkového rozptylu dat (celkem 77,48 %).

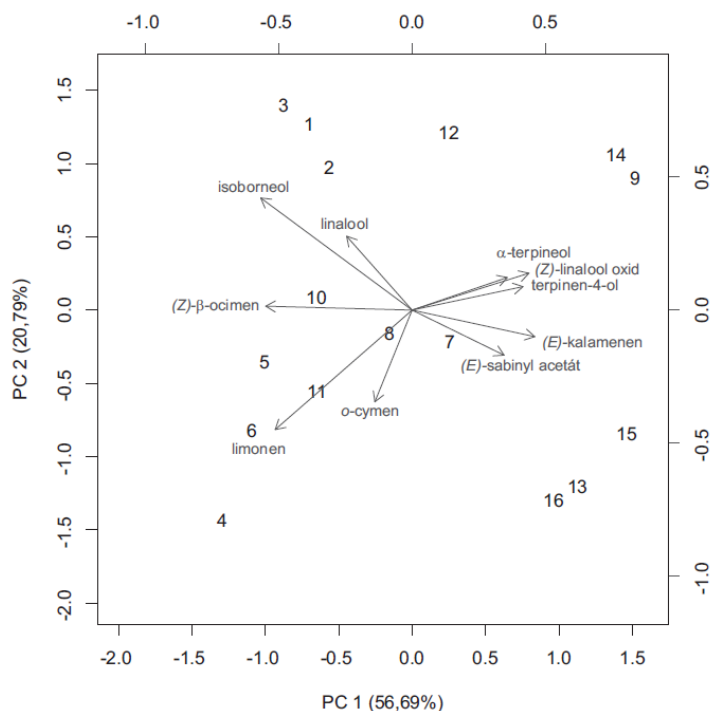
Tab. 4 Přehled odrůd vinné révy a jejich původ

Odrůda	Rodič 1	Rodič 2
1 André	Frankovka	Svatovavřínecké
2 Frankovka		
3 Merlot	geneticky odpovídá odrůdě Cabernet Franc	
4 Cabernet Moravia	Cabernet Franc	Zweigeltrebe
5 Rubinet	Revolta x Alibernet	André
6 Rulandské modré		
7 Ariana	Riesling x Svatoavřínecké	Zweigeltrebe
8 Alibernet	Alicante Bouschet	Cabernet Sauvignon
9 Laurot	Merlot x Seibel 1366	André
10 Dornfelder	Helfensteiner x Heroldrebe	Modrý Portugal x Frankovka
11 Modrý Portugal		
12 Agni	André	Irsai Oliver
13 Neronet	Svatovavřínecké x Modrý Portugal	Alibernet
14 Zweigeltrebe	Svatovavřínecké	Frankovka
15 Cabernet Sauvignon	Cabernet Franc	Sauvignon
16 Domina	Modrý Portugal	Rulandské modré

Kompoziční biplot zobrazuje dobré rozdělení odrůdových vinných destilátů. Na základě PC2 byly vytvořeny dvě hlavní skupiny vinných destilátů. V kladném směru PC2 byly separovány variety kříženců odrůd Frankovka a Svatoavřínecké. Ve směru záporných hodnot PC2 jsou odděleny destiláty ostatních odrůd vinné révy. Na rozdělení kříženců odrůd Frankovka a Svatoavřínecké (kladné hodnoty PC2) je patrný výrazný vliv terpenoidů linalool, isoborneol, (*Z*)-linalool oxid, α -terpineol a terpinen-4-ol, které se projevují převážně sladkou, květinovo-ovocnou vůní (tab. 5). Tato skupina destilátů je dále separována podle PC1 na dvě další skupiny, kde isoborneol a linalool významně korelují s odrůdami André a Frankovka a také s odrůdou Merlot. Druhá část skupiny je silně ovlivněna terpenoidy (*Z*)-linalool oxid, α -terpineol a terpinen-4-ol, které se vyznačují květinovo-ovocným až kořenitým aroma. Z kompozičního biplotu vyplývá, že tyto terpenoidy mají velký vliv na primární aroma odrůd Laurot a Zweigeltrebe.

Ostatní odrůdové vinné destiláty jsou orientovány ve směru záporných hodnot PC2, kde mají na jejich rozdělení v biplotu vliv terpenoidy *o*-cymen, limonen, (*E*)-sabinyl acetát a (*E*)-kalamenen. Můžeme tedy předpokládat, že tyto aromatické složky jsou senzorycky důležité pro jejich primární aroma. Kříženci odrůd Cabernet Moravia, Rulandské modré a Modrý Portugal jsou významně korelovány s terpenoidy limonen a *o*-cymen, které přispívají k citrusové složce primárního aroma. U odrůdových vinných destilátů Neronet, Cabernet Sauvignon a Domina je patrný silný vliv terpenoidů (*E*)-sabinyl acetátu a (*E*)-kalamenenu, kterým je připisováno bylinné až kořenité aroma. Pokud bychom hodnotili vliv jednotlivých

hlavních komponent, je zřejmé, že PC1 určuje rozdělení odrůdových vinných destilátů podle charakteristiky tónů aroma (jemné květinové vs. výrazné kořenité aroma), a PC2 rozděluje soubor destilátů podle vzájemných vztahů mezi kříženci (odrůdy kříženců Svatovavřínecké a Frankovka vs. Cabernet Sauvignon, Rulandské modré a Modrý Portugal).



Obr. 7 Kompoziční biplot odrůdových vinných destilátů (PCA pro clr transformovaná data): čísla představují vzorky vinných destilátů (1 André; 2 Frankovka; 3 Merlot; 4 Cabernet Moravia; 5 Rubinet; 6 Rulandské modré; 7: Ariana; 8 Alibernet; 9 Laurot; 10 Dornfelder; 11 Modrý Portugal; 12 Agni; 13 Neronet; 14 Zweigeltrebe; 15 Cabernet Sauvignon; 16 Domina)

Tab. 5 Charakteristicky aromatických látek

Sloučenina	Charakteristika vůně ^{274,275}
kalamenen	bylinná, kořenitá
o-cymen	rozpuštědlové až benzínové aroma s citrusovou složkou
isoborneol	ztuchlá, kafrová, sladká
limonen	citrusová
linalool	levandulová, sladká
linalool oxid	sladká, květinová, dřevitá
ocimen	bylinná, ovocná, květinová
sabinyl acetát	balzamiková
terpinen-4-ol	zatuchlá vůně s příměsí terpentýnu a muškátového oříšku
α -terpineol	anýzová, broskvová, ovocná

Z předchozích výsledků vyplývá, že převážná část variet odráží vzájemný vliv rodičovských odrůd na aroma dceřinných kultivarů. Metoda PCA aplikovaná na *clr* transformovaná data umožnila nalézt vzájemné podobnosti v aroma odrůdových vinných destilátů na základě 10-ti terpenických látek: *o*-cymenu, limonenu, (*Z*)- β -ocimenu linalool oxidu, linaloolu, isoborneolu, terpinen-4-olu, α -terpineolu, (*E*)-sabinyl acetátu a (*E*)-kalamenenu. Je možné také pozorovat, že PCA odhalila některé odlišnosti mezi odrůdovými destiláty. Jak vystihuje ve své práci Skinkis et. al.²⁶⁷ mohou se dceřinné odrůdy chovat zcela odlišně od svých rodičů. To je patrné u odrůdy Domina, která vznikla křížením mezi odrůdami Modrý Portugal a Rulandské modré. Na aroma tohoto destilátu Domina mají vliv terpenoidy (*E*)-kalamenenu a (*E*)-sabinyl acetát, zatímco rodičovské odrůdy Modrý Portugal a Rulandské modré korelují, jak již bylo uvedeno, s terpenoidy limonen a *o*-cymen.

5.2 Analýza terpenických látek v destilátech grapa

Mikroextrakce tuhou fází dnes již patří mezi rutinní extrakční techniky s využitím v celé oblasti analýzy aromatických látek^{39,46-51}. Předmětem studie bylo určení terpenického profilu moravských destilátů typu grapa s využitím metody SPME. Tato metoda byla aplikována v headspace provedení (HS-SPME) a v provedení přímého ponoření vlákna do roztoku („Direct Immersion“; DI-SPME). Metodou SPME-GC/MS bylo identifikováno celkem 61 terpenických látek, které jsou uvedeny v tab. 6 a kategorizovány do příslušných skupin dle svého izoprenoidního skeletu na monoterpenické, norisoprenoidní a sesquiterpenické látky. Terpenické látky byly kvantifikovány ze záznamu celkových spekter. Jejich zastoupení je vyjádřeno formou relativních jednotek. Opakovatelnost metody byla určena ze tří paralelních stanovení, vypočítané relativní směrodatné odchylky (RSD %) ploch píků nebyly vyšší než 5 %. U jednotlivých látek jsou v tabulce uvedeny hodnoty vypočítaných retenčních indexů a charakteristické ionty pro jejich identifikaci.

Z celkového počtu 61 terpenických látek bylo metodou HS-SPME identifikováno 15 monoterpenických látek. Hlavními identifikovanými monoterpenoidy s nejvyšším relativním zastoupením jsou limonen, linalool, (*Z*)-sabinen hydrát acetát, *neo*-3-thujanyl acetát a citronellyl acetát. Majoritní zastoupení z přítomných látek má limonen, který byl společně s dalšími látkami identifikován jako sensoricky významná látka u odrůdových vinných destilátů (kap. 5.1). DI-SPME se při analýze monoterpenoidů ukázala být také

vhodnou a srovnatelnou technikou, kterou bylo možné identifikovat všechny zastoupené monoterpenoidy. Monoterpenické látky β -cyklocitral, citronellool, (*Z*)-sabinen hydrát acetát, neryl formiát a citronellyl acetát byly dokonce DI-SPME metodou identifikovány ve vyšším zastoupení v porovnání s HS-SPME. U některých vzorků byly identifikovány také eukalyptol, hotrienol, (*Z*)-rose oxid, nerol oxid a neryl acetát. Tyto terpenoidy bylo možné stanovit oběma technikami v přibližně srovnatelném zastoupení, pouze (*Z*)-rose oxid byl HS-SPME metodou identifikován ve vyšším zastoupení. Nejvíce monoterpenických látek bylo identifikováno u vzorku grapy G1, u kterého bylo možné identifikovat také (*E*)-sabinen hydrát acetát a linalool acetát, které se nepodařilo u ostatních destilátů detekovat. Můžeme předpokládat, že destilát G1 byl vyroben z některých aromatických odrůd hroznů. Například aroma destilátů vyrobených z muškátových odrůd je spojováno s terpenoidy linaloolem, α -terpineolem, citronellolem, nerolem, geraniolem a hotrienolem⁷⁷. Poměr a zastoupení terpenických látek v destilátu je dáno složením moštu, které se odvíjí od použitých odrůd hroznů^{57,63,267,268}. Skutečnost, že α -terpineol, nerol a geraniol nebyly ve vzorcích moravských destilátů detekovány, si můžeme vysvětlit tím, že studované vzorky destilátů byly vyrobeny z více odrůd vinné révy a není nám známo ani jejich přesné složení ani zastoupení jednotlivých odrůd hroznů použitých pro výrobu destilátů. Monoterpenické látky eukalyptol, nerol oxid, linalool acetát, *neo*-3-thujanyl acetát a neryl formiát byly, stejně jako limonen, identifikovány u odrůdových vinných destilátů (kap. 5.1).

Norisoprenoidy jsou produkty odbourávání karotenoidů. Metodou SPME se podařilo identifikovat 3 norisoprenoidní látky, dehydro-*ar*-ionon, β -damascenon a dihydro- β -ionon. Jako vhodnější metoda pro analýzu norisoprenoidů se ukázala být DI-SPME, kterou bylo možné stanovit všechny identifikované norisoprenoidy. Pomocí HS-SPME se podařilo identifikovat pouze dehydro-*ar*-ionon. Nejvyšší zastoupení látek vykazuje opět vzorek destilátu G1, u kterého byl DI-SPME metodou identifikován také dihydro- β -ionon. Dihydro- β -ionon nebyl u ostatních destilátů detekován a jeho zastoupení u vzorku G1 je v porovnání s ostatními identifikovanými látkami poměrně velké. Další významné norisoprenoidy jako je α -ionon nebo β -ionon nebyly u vzorků grap detekovány. β -ionon je klíčovou složkou aroma odrůdy Cabernet Sauvignon⁷⁷. Můžeme tedy předpokládat, že tato odrůda nebyla použita pro výrobu studovaných destilátů.

Hlavní skupinou identifikovaných látek metodou SPME jsou sesquiterpenoidy, které mají v porovnání s monoterpenoidy a norisoprenoidy daleko vyšší relativní zastoupení.

Celkem se podařilo pomocí obou extrakčních technik identifikovat 43 sesquiterpenických látek. Na rozdíl od skupiny monoterpenických látek jsou při analýze sesquiterpenických látek mezi použitými technikami patrné rozdíly. Metodou HS-SPME bylo možné identifikovat především látky s nižší retencí. Mezi hlavní látky identifikované pomocí HS-SPME metody patří α -ylangen, β -bourbonen, α -humulen, γ -kadinen a δ -kadinen, které byly prezentovány jako složky aroma hroznů odrůd Tramín, Müller Thurgau aj.^{63,93}. Velké relativní zastoupení mají také α -amorfen, 6,9-guaiadien a u destilátu G1 také α -farnesen a α -muurolen. Hlavní podíl sesquiterpenických látek byl identifikován u vzorků G1 a G6. U vzorku G6 jako jediného byly identifikovány také α -zingiberen a α -selinen. V porovnání s monoterpenickými látkami se ale zastoupení sesquiterpenických látek u jednotlivých studovaných vzorků destilátů příliš neliší. Látkou s nejvyšší retencí, kterou bylo možné HS-SPME metodou spolehlivě identifikovat, byl (*E*)-nerolidol (RI=1559, tab. 6). Látky s vyšší retencí nebylo možné pomocí HS-SPME metody analyzovat, ale jejich analýzu umožnila metoda DI-SPME. Mezi hlavní sesquiterpenoidy identifikované metodou DI-SPME se řadí nerolidol, (*2Z,6E*)-farnesol a α -kadinol, které mají majoritní zastoupení u vzorků G2 a G3. Tyto látky byly společně s identifikovanými terpenoidy γ -eudesmolem a τ -muurololem prezentovány jako složky aroma madeirských vín^{98,99}. Můžeme usuzovat, že uvedené látky patří mezi nejčastěji se vyskytující sesquiterpenické látky v hroznech a příslušných nápojích. Z dalších látek můžeme uvést 1,10-di-*epi*-kubenol, 1-*epi*-kubenol, α -muurolol, 3-dihydrofarnesol, (*2Z,6Z*)-farnesol nebo (*2E,6E*)-farnesyl acetát. U vzorku G6 jako jediného byly identifikovány také α -zingiberen a α -selinen. Mezi látky s „nižší“ retencí, které umožnila DI-SPME u vzorků destilátů identifikovat, se řadí sesquiterpen α -barbaten, který nebyl metodou HS-SPME detekován, nebo (*Z*)- β -farnesen, který bylo možné metodou DI-SPME identifikovat u více vzorků.

Metoda SPME se ukázala jako vhodná technika pro identifikaci terpenických látek v destilátech grapa, která je dostatečně citlivá pro analýzu aromatických látek a jednoduchá ve svém provedení. Metodu DI-SPME je možné použít jako doplňkovou techniku, která umožňuje širší screening (nejen) terpenických látek při analýze markerů a rozšiřuje možnosti klasického HS provedení. Naproti tomu se však při přímém ponoření vlákna do roztoku sorbují i další netěkavé látky, jako jsou např. obsažené kyseliny, což vede ke snížení životnosti SPME vlákna.

Tab. 6 Zastoupení terpenických látek v šesti destilátech typu grapa

	RI ^a	m/z ^b	HS-SPME ^c						DI-SPME ^c					
			G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Monoterpenoidy														
limonen	1031	68,93	94,79	17,79	31,33	38,91	11,20	27,69	71,92	12,28	14,29	9,80	3,79	11,23
eukalyptol	1034	43,81,108				8,13	2,74					3,89	1,18	
linalool	1100	55,71,93,121	76,89	5,02	4,68	8,55	18,87	4,14	124,30	6,09	4,26	7,76	10,84	2,99
hotrienol	1104	43,71,82	21,13			2,63		2,17	25,56			2,84		2,15
rose oxid (Z)	1111	40, 69,83,139	4,64		1,87	0,85	1,11	1,63	4,16					
nerol oxid	1153	67,68,83	24,01			3,46			33,32			4,92		
β -cyklocitral	1216	67,81,109,137	0,74	1,71	1,98	1,49	2,31	1,74		7,06	6,27	3,98	3,86	5,75
citronellol	1226	41,55,69, 95	16,47	4,34	4,84	2,11	4,30	2,31	154,07	16,79	5,25	10,85	10,90	12,08
sabinen hydrát acetát (Z)	1253	93,121,136	43,55	3,73	2,23	7,76	6,15	1,63	79,97	4,78	4,15	8,13	7,05	7,27
sabinen hydrát acetát (E)	1257	93,121,136	5,60						18,35					
linalool acetát	1260	69,80,93,121	12,77						33,68					
neo-3-thujanol acetát	1277	79,93,121,136	14,15	5,09	10,52	28,65	21,53	24,49	27,17	10,99	11,81	19,98	14,17	22,81
neryl formiát	1282	41,69, 93,121	38,31	0,93	2,85	8,23	7,69	1,09	99,26	4,69	4,08	8,13	9,72	3,17
citronellyl acetát	1349	43,81, 95,138	16,73	6,83	11,40	4,67	2,27	8,93	98,16	17,83	10,94	7,18	3,39	26,79
neryl acetát	1358	41,69, 93,121	2,89						22,22			3,07		1,68
Norisoprenoidy														
dehydro-ar-ionon	1350	142,157,172	15,73	1,68	25,15	30,10	8,06	10,51	33,83	6,57	10,85	8,92	3,75	6,19
β -damascenon	1376	41,69,121							64,71	27,60	37,51			17,05
dihydro- β -ionon	1422	43,121,161,194							35,00					
Sesquiterpenoidy														
α -ylangen	1365	93,105,119,161	88,45	80,86	52,01	25,22	14,60	181,47						3,27
α -kopaen	1372	93,105,119,161	13,56	6,69	5,48	4,66	2,52	14,48						3,05
β -bourbonen	1379	81,123,161	95,36	22,27	53,06	14,31	8,21	47,94						
α -barbaten	1411	93,95,108,123								19,74	15,41	2,42	3,65	6,14
β -karyofyllen	1411	69,79,93,133	22,90	11,83	15,95	9,18	3,06	7,65						
β -kopaene	1421	91,105,119,204	8,84	3,72										3,90
α -bergamoten	1424	69,93,119	3,26	7,51	6,00									5,24
α -guaien	1432	91,105,133,147	4,92	4,02	5,17									6,91

Tab. 6 Zastoupení terpenických látek v šesti destilátech typu grapa - pokračování tabulky

	RI ^a	m/z ^b	HS-SPME ^c						DI-SPME ^c					
			G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5	G6
6,9-guaiadien	1439	91,105,119,161	35,45	19,24	18,16	11,42	6,37	38,84						
<i>β</i> -farnesen (<i>Z</i>)	1452	69,93,133	42,53						5,75	6,12	8,73	6,35	6,90	
<i>α</i> -humulen	1452	80,93,121,147		23,20	30,41	10,46	2,38	8,97		7,15				
<i>β</i> -chamigren	1470	93,133,189,204	7,43	5,59			7,47	3,67						
<i>γ</i> -muurolen	1472	93,105,161	27,64		13,56	8,60	14,37	13,52						
<i>α</i> -amorfen	1476	94,105,161,204	33,72	16,87	16,74	12,46		26,92						
<i>γ</i> -himachalen	1481	91,93,105,133	5,38					2,44						
aristolochen	1485	105,189	12,24		6,20		4,46	5,52						
<i>β</i> -selinen	1485	93,105,189,204	11,39					5,15						
<i>δ</i> -selinen	1489	91,105,161,189	37,52			3,71	4,16	19,50						
<i>α</i> -zingiberen	1490	69,77,93,119						2,48						
<i>α</i> -selinen	1492	93,107,189,204						12,00						
valencen	1493	91,105,161,175	22,78											
<i>α</i> -muurolen	1495	105,161,189,204	33,24	12,78		9,48								
<i>α</i> -farnesen	1503	41,69,93,107	58,50		4,09	8,39	1,61		6,66					
<i>γ</i> -kadinen	1510	105,119,161,204	44,92	41,83	65,39	35,49	14,35	67,34	6,26		3,64			2,75
<i>δ</i> -kadinen	1516	119,134,161,204	39,64	14,88	19,76	8,31	3,60	25,26	5,10					1,99
kalamenen (<i>E</i>)	1517	159	11,94	9,66	16,38	7,53	6,10	12,34	6,18	9,58	6,11	3,38	2,58	3,22
<i>γ</i> -dehydro-ar-himachalen	1530	143,157,185,200	4,34	4,55	6,05	3,65	2,74	6,50	7,12	8,64	4,54	2,87	3,02	4,98
<i>α</i> -kadinen	1534	105,161,204	13,23	8,15	10,46	4,52	2,29	9,99						
<i>α</i> -kalakoren	1538	142,157,200	18,07	9,96	12,31	7,99	3,00	10,89	8,21	9,25	6,26	3,62	6,78	4,87
nerolidol (<i>E</i>)	1559	41,69,93,107		1,71	3,45	2,19	1,77	1,53	52,82	337,97	151,26	62,00	82,58	70,41
1,10-di- <i>epi</i> -kubenol	1610	119,161,179,204							12,25	38,68	18,87	12,14	11,02	14,05
1- <i>epi</i> -kubenol	1624	119,161,204							18,69	17,02	10,93	7,70	9,92	5,97
<i>γ</i> -eudesmol	1630	161,189,204							3,60	12,22	9,34	10,57	6,42	8,23
<i>epi-α</i> -kadinol	1642	81,161,204							14,42	6,66				
<i>τ</i> -muurolol	1644	95,121,161,204							23,32	14,73	16,27	5,96	11,68	
<i>α</i> -muurolol	1648	95,105,119,161							11,22	15,12	19,82	3,00	12,65	5,38
<i>α</i> -kadinol	1657	95,121,161,204							29,68	38,09	20,40	21,65	15,48	21,47
kadalen	1676	168,183,198							9,02	19,61	9,15	4,50	11,08	6,84

Tab. 6 Zastoupení terpenických látek v šesti destilátech typu grapa - pokračování tabulky

	RI ^a	m/z ^b	HS-SPME ^c						DI-SPME ^c					
			G1	G2	G3	G4	G5	G6	G1	G2	G3	G4	G5	G6
2,3-dihydrofarnesol	1695	69,81,95,123							54,45	96,65	53,14	47,38	54,11	33,80
farnesol (2Z,6Z)	1701	69,81,93,107							9,99	29,08	18,47	6,04	6,49	
farnesol (2Z,6E)	1724	41,69,81							156,81	691,31	377,20	136,76	142,43	163,80
farnesal (2E,6E)	1744	41,69,84							4,20	12,00	6,81	3,48	7,93	3,54
farnesyl acetát (2E,6E)	1835	69,81,93,107							3,53	25,22	22,34	7,93	4,24	16,57

^a Retenční indexy vypočítané podle $RI_x = 100z + 100 (RT_x - RT_z) / (RT_{z+1} - RT_z)$

RI_x – retenční index neznámé látky

RT_x – retenční čas neznámé látky, n-alkanu se z uhlíky a z+1 uhlíky v molekule

RT_z – retenční čas n-alkanu se z uhlíky

RT_{z+1} – retenční čas n-alkanu se z+1 uhlíky v molekule

^b Série charakteristických iontů látky

^c Zastoupení identifikovaných látek v relativních jednotkách ($\times 10^5$) odečtené z TIC modu (n = 3, RSD \leq 5%)

5.3 Analýza aromatických složek chmelů a piv

Analýza českých (Premiant, Sládek, Žatecký poloraný Červeňákⁱⁱⁱ) a zahraniční chmelů (Hallertau Magnum, Hallertau Taurus) byla provedena metodou HS-SPME-GC/MS. Identifikace látek byla provedena na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST 08, spektry uvedenými v odborné literatuře²⁶⁶, na základě známých elučních charakteristik látek a některých standardů. Identifikované látky a jejich zastoupení u jednotlivých odrůd chmele je uvedeno v tab. 7, vyjádřené jako průměrné hodnoty ploch píků v relativních jednotkách. Mezi identifikovanými látkami jsou zejména monoterpenické a sesquiterpenické látky, ze skupiny norizoprenoidů byl identifikován také α -ionol.

Majoritní zastoupení mezi monoterpenickými látkami identifikovanými v chmelové silici má β -myrcen. Nejvyšší relativní zastoupení β -myrcenu obsahují německé chmely Hallertau Magnum a Hallertau Taurus, u kterých bylo identifikováno až dvojnásobné množství β -myrcenu v porovnání s českými odrůdami chmelů. Nejnižší relativní zastoupení bylo identifikováno u Červeňáku. Tento chmel je tradiční českou odrůdou, která se používá pro výrobu mnoha piv ležáckého typu u nás i po celém světě. Žatecký chmel vyniká především svým jemným aroma, které je dáno vzájemným poměrem všech složek obsažených v chmelové silici. Mezi monoterpenoidy, které se podílí na aroma chmelů, byly identifikovány také β -pinen, limonen, linalool, methyl geranát a (*E*)- β -ocimen. Uvedené látky jsou zastoupeny ve vyšším množství především u české odrůdy Premiant a německých odrůd Hallertau Magnum a Hallertau Taurus. Významný rozdíl je patrný v zastoupení limonenu, který byl u Červeňáku identifikován v řádově nižším množství než u ostatních chmelů, β -(*E*)-ocimen, *allo*-ocimen a rosefuran epoxid nebyly u Červeňáku detekovány. Absence či nižší relativní zastoupení některých složek aroma může do jisté míry přispívat k jemnému aroma žatecké odrůdy.

Patrné rozdíly u studovaných chmelů můžeme pozorovat také u sesquiterpenických látek. Majoritní podíl v chmelové silici mají sesquiterpenické látky (*E*)-karyofyllen a α -humulen, u Červeňáku byl identifikován jako hlavní složka také β -farnesen. U německé odrůdy Hallertau Taurus byl β -farnesen také identifikován, ale v porovnání s českou odrůdou pouze v relativně malém množství (řádově asi 200× nižší zastoupení). Přestože některé

ⁱⁱⁱ Označením Žatecký chmel může být označen pouze jemný aromatický chmel Žatecký poloraný červeňák (všechny jeho registrované klony) vypěstovaný v Žatecké chmelařské oblasti¹⁴⁸.

odborné publikace¹⁴⁹ prezentují přítomnost β -farnesenu i u dalších českých odrůd chmelů, u studovaných odrůd nebyl β -farnesen detekován. Obsah β -farnesenu je velmi závislý na klimatických podmínkách a jeho obsah každoročně kolísá. Velký vliv na obsah β -farnesenu v chmelu mají i podmínky skladování. Hlavní složky chmelové silice, (*E*)-karyofyllen a α -humulen, byly identifikovány u všech studovaných chmelů. Nejvyšší zastoupení má, obdobně jako v případě monoterpenu β -myrcenu, německá odrůda Hallertau Magnum, mezi českými chmely odrůda Premiant. Nejnižší zastoupení (*E*)-karyofyllenu a α -humulenu bylo identifikováno u Červeňáku. Také ostatní identifikované sesquiterpenické látky jako je např. α -ylangen, α -kopaen, β -kopaen, γ -muurolen, valencen, γ -kadinen nebo δ -kadinen vykazují nižší zastoupení u této české odrůdy. Naproti tomu byly u Červeňáku identifikovány 7-*epi*-sesquithujen, (*Z*)- α -bergamoten, α -kurkumen, které nebyly u ostatních odrůd detekovány, ve vyšším zastoupení byl identifikován také (*E*)- α -bergamoten. V případě, že by tyto sesquiterpenické látky byly identifikovány v pivech, mohly by společně s β -farnesenem sloužit jako potenciální markery Žateckého chmele. Německá odrůda Hallertau Taurus se vyznačovala vyšším podílem β -selinenu, β -chamigrenu a selina-3,7(11)-dienu, a jako marker této německé odrůdy by mohl být označen α -selinen, který u ostatních chmelů nebyl detekován.

Tab. 7 Zastoupení terpenických látek v chmelech

Sloučenina	m/z	Chmel				
		Červeňák	Sládek	Premiant	Hallertau Magnum	Hallertau Taurus
Monoterpenoidy						
α -pinen	41,79,93	12,38	24,13	31,98	42,41	45,95
kamfen	41,79,93,121	4,08	7,48	9,51	6,56	13,76
β -pinen	41,69,79,93	41,63	58,37	107,48	190,12	129,13
β-myrcen	41,69,79,93	2642,95	3132,63	4730,04	7251,24	6765,74
β -felandren	77,91,93	4,41			3,56	4,87
limonen	68,79,93	2,08	92,72	103,38	157,59	147,50
β -ocimen (<i>Z</i>)	41,79,93,121	12,52			5,90	5,53
β -ocimen (<i>E</i>)	41,79,93,121		63,38	96,00	98,60	69,53
γ -terpinen	77,93,121,136	2,76			6,40	5,84
linalool	71,93,55,121	70,03	44,25	118,11	56,66	128,01
<i>allo</i> -ocimen	79,91,105,121		1,81	4,11	2,28	2,04
<i>neo-allo</i> -ocimen	79,91,105,121			5,18	6,31	5,87
borneol	95,110,139	1,60	1,70	1,68	1,25	1,37
lavandulol	41,69,111	2,08	1,36	6,72	1,69	3,07
rosefuran epoxid	79,95,166		3,33	3,86	2,74	3,70
nerol	41,69,93,121	2,07	1,42	3,80	2,66	5,58
geraniol	41,69,93,123	13,45	8,89	19,34	36,44	10,01
citronellyl formiát	41,69,95,123	7,49	2,37	12,58	5,04	15,85
methyl geranát	41,69,114,123	45,10	63,71	87,40	102,95	103,74

Tab. 7 Zastoupení terpenických látek v chmelech - pokračování tabulky

Sloučenina	m/z ^a	Chmel ^b				
		Červeňák	Sládek	Premiant	Hallertau Magnum	Hallertau Taurus
limonen aldehyd	67,79,93,148	2,39	3,07	0,31	4,03	2,70
geranyl acetát	69,93,121,136	0,43	1,08	1,61	2,89	1,33
neryl aceton	43,69,107,136	0,69		6,95	0,92	4,23
Noirisoprenoidy						
<i>α</i> -ionol (<i>E</i>)	95,138,194	1,39	1,19	1,72	7,75	2,02
Sesquiterpenoidy						
<i>α</i> -kubeben	91,105,119,161	1,78	2,77	5,91	9,79	3,61
<i>α</i> -ylangen	93,105,119,161	20,22	40,92	44,96	44,61	34,46
<i>α</i> -kopaen	93,105,119,161	67,60	142,35	134,82	132,11	111,59
<i>β</i> -bourbonen	81,123,161	1,32	7,07	0,36	0,55	0,23
sativen	93,108,133,161	1,87	2,43	4,92		
7- <i>epi</i> -sesquithujen	69,93,119	1,74				
<i>β</i> -elemen	67,81,93,107					4,33
karyofyllen (<i>Z</i>)	79,93,105,133	5,09	6,72	15,79	7,53	7,55
<i>α</i> -bergamoten (<i>Z</i>)	69,93,107,119	8,26				
karyofyllen (<i>E</i>)	79,93,105,133	1027,42	1879,02	1946,15	2193,44	1464,48
<i>β</i> -kopaen	91,105,161,189	27,00	44,75	78,51	108,35	41,93
<i>α</i> -bergamoten (<i>E</i>)	69,93,107,119	242,84	19,30	27,30	4,42	2,88
<i>α</i> -himachalen	93,105,119,189	4,30	2,75	1,71	1,64	4,39
<i>α</i>-humulen	80,93,121,147	3608,06	5792,23	6347,52	6654,99	4400,33
farnesen	69,93,133	3198,91				6,24
<i>allo</i> -aromadendren	91,105,133,161	3,30	8,64	7,02	7,23	11,09
kadina-1(6),4-dien (<i>E</i>)	105,161,204	31,94	52,89	41,55	51,90	39,45
<i>β</i> -chamigren	93,133,189,204					182,44
<i>γ</i>-muurolen	93,105,161	141,39	291,31	243,11	258,72	157,69
<i>α</i> -amorfen	105,161,204	23,86	34,06	28,11	32,81	18,45
<i>α</i> -kurkumen	105,119,132,145	12,03				
<i>β</i> -selinen	93,105,189,204	36,99	82,43	78,88	99,26	1166,59
valencen	91,105,161,175	100,34	164,84	167,48	189,93	39,77
<i>α</i> -selinen	93,107,133,189					1428,27
epizonaren	81,105,161	38,71	48,26	33,86	46,91	36,28
<i>α</i> -muurolen	105,161,204	46,62	97,64	85,93	86,03	65,55
<i>α</i> -farnesen (<i>E,E</i>)	69,93,107,119	82,67	18,33	65,01		
<i>γ</i> -kadinen	105,119,161,204	140,83	298,55	280,90	334,80	247,12
kalamenen (<i>E</i>)	129,159,202	35,62	51,27	131,32	158,32	71,53
<i>δ</i>-kadinen	119,134,161,204	226,06	460,16	363,98	327,75	278,72
zonaren	81,105,161,204	17,94	24,22	17,42	17,17	15,92
kadina-1,4-dien	105,119,161,204	28,64	58,00	49,37	53,48	36,69
<i>α</i>-kadinen	105,161,204	28,17	60,69	56,42	53,41	40,61
selina-3,7(11)-dien	107,122,161,189					19,37
<i>α</i>-kalakoren	142,157,200	23,24	34,72	52,08	25,66	21,03
<i>β</i> -kalakoren	142,157,200	6,80	3,50	23,60	5,50	10,89
karyofyllen oxid	69,79,93,109	27,96	24,97	57,73	13,73	19,09
humulen epoxid II	67,96,109,138	68,32	66,26	256,19	91,44	69,17
1,10-di- <i>epi</i> -kubenol	119,161,179,204	3,75	5,69	3,81	5,43	2,45
<i>α</i> - <i>epi</i> -kadinol	161,204,81	15,43	25,96	25,84	15,75	18,21
<i>α</i> -kadinol	95,43,121,161	5,53	12,66	12,03	10,86	40,95
farnesol (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)	69,41,81	0,36	0,65	8,90	2,31	2,53

Tučně označeny terpenické látky identifikované v českých a zahraničních pivech, viz tab. 8

^a Série charakteristických iontů

^b Průměrné hodnoty ploch pík v relativních jednotkách ($\times 10^6$; $n = 3$, RSD $\leq 5\%$)

Analýza piv české i zahraniční výroby metodou HS-SPME-GC/MS byla zaměřena na identifikaci složek chmelové silice, především β -farnesenu, jako kvalitativního markeru Žateckého chmele. Identifikace látek byla provedena na základě porovnání spekter s knihovnou spekter a na základě známých elučních charakteristik látek. Identifikované látky u příslušných vzorků piv jsou shrnuty v tab. 8, vyjádřené formou relativních jednotek jako průměrné plochy píků. Vzorky piv jsou kategorizovány dle stupňovitosti a podle dalších kategorií na piva nealkoholická, polotmavá, tmavá, zahraniční a piva domácí výroby.

Celkem se podařilo ve vzorcích piv identifikovat 15 terpenických látek. Ze skupiny monoterpenických látek byl identifikován β -myrcen, limonen, linalool, methyl geranát a citronellyl acetát. S výjimkou citronellyl acetátu byly tyto látky identifikovány jako složky chmelové silice (tučně značené v tab. 7). Přítomnost citronellyl acetátu v pivech zřejmě souvisí s esterifikační reakcí citronellolu nebo redukcí geranyl acetátu²⁷⁶ během fermentace. Z provedené analýzy chmelů i známých poznatků uvedených v literatuře^{143,146,147} bychom mohli předpokládat, že majoritní zastoupení mezi monoterpenoidy v pivech bude mít β -myrcen, který má v chmelové silici hlavní podíl. Jeho obsah je dán množstvím a druhem použitého chmele a technologií výroby piva. Vyšší relativní zastoupení β -myrcenu bylo identifikováno u piva Opat extra chmelené, Pilsner Urquell a polotmavého piva Forman nealko, u ostatních piv je jeho obsah srovnatelný s dalšími terpenickými látkami. Určitým markerem pro hodnocení použité odrůdy chmele by mohl být limonen, který je u odrůdy Červeňák v nižším relativním zastoupení. Jeho zastoupení v pivech je ale do určité míry konstantní, vyšší zastoupení limonenu bylo identifikováno pouze u piva Staropramen - Měšťan, Rychtář - Standard 11, Černá Hora - Forman nealko, Hoegaarden a pivo domácí výroby značky Coopers. Je pravděpodobné, že u uvedených piv byla při výrobě použita i jiná odrůda chmele. Pro posouzení je ale nutné vzít v úvahu i vzájemné podíly mezi ostatními složkami chmelové silice. Vyšší zastoupení látky nemusí jednoznačně poukazovat na užití jiné odrůdy chmele při přípravě chmelovaru. Vliv na zastoupení složek chmelové silice může mít i jiný technologický způsob výroby piva, např. pivo Hoegaarden a Coopers jsou svrchně kvašená piva. Pivo Hoegaarden je navíc ochucené pivo a tak zastoupení limonenu může být ovlivněno nejen odrůdou chmele ale také dalšími přidanými ingrediencemi. Linalool, jako další složka chmelové silice obsažená v pivech, byl identifikován v relativně vyšším zastoupení u odrůd Červeňák a Premiant. Vyšší obsah v pivech byl identifikován u piva Rohozec - Skalák 11 a Opat kvasnicový 12, jejichž výrobci uvádějí, že při výrobě

používají výhradně Žatecký chmel.

Jako složka aroma pív byl identifikován také β -damascenon, který nebyl u studovaných chmelů detekován. Jeho přítomnost v pivech je zřejmě důsledkem degradace karotenoidů obsažených v chmelech během výroby piva. Jeho obsah je u průmyslově vyráběných pív velice variabilní. Poněkud nižší zastoupení je možné pozorovat u pív nealkoholických, zahraničních, u pív domácí výroby a u piva Moritz. Je pravděpodobné, že zastoupení β -damascenonu souvisí s technologií výroby piva.

Hlavní sesquiterpenické složky chmelové silice (*E*)-karyofyllen a α -humulen, u odrůdy Červeňák také β -farnesen, byly identifikovány téměř u všech vzorků pív. (*E*)-karyofyllen se nepodařilo detekovat u některých zahraničních pív a nealkoholických pív, s výjimkou polotmavého nealkoholického piva Černá Hora - Forman nealko. Toto pivo se celkově vyznačuje vyšším zastoupením terpenických látek, které pravděpodobně souvisí s použitým chmelem ale i technologií výroby. Také pivo Pilsner Urquell a pivo Protivín - Merlin černý 13 vykazují vyšší relativní zastoupení (*E*)-karyofyllen a také α -humulenu. Oba sesquiterpeny, (*E*)-karyofyllen a α -humulen, nebyly detekovány pouze u piva Coopers. Je zajímavé, že u tohoto piva byl identifikován i β -farnesen, v zastoupení srovnatelném s ostatními běžně dostupnými českými pivy. Zastoupení β -farnesenu u piva Coopers je s velkou pravděpodobností důsledkem použití některé zahraniční odrůdy chmele, která nebyla ve studii hodnocena. Marker Žateckého chmele, β -farnesen, byl identifikován téměř u všech analyzovaných pív. Řada českých výrobců při výrobě pív používá výlučně Žatecký chmel, nebo jej používají alespoň při dochmelování. Jediným pivem, u kterého nebyl β -farnesen detekován, je pivo Stella Artois. Za jistý „standard“ v obsahu β -farnesenu můžeme pokládat pivo vyráběné v restauračním minipivovaru Moritz Olomouc. Na výrobu piva Moritz se používá pouze Žatecký chmel, pivo je nefiltrované a nepasterizované. Podíl β -farnesenu v pivu tedy není ovlivněn jinými faktory kromě použité technologie při vaření piva. U obou analyzovaných vzorků můžeme vidět srovnatelné zastoupení složek chmelové silice. Vyšší relativní zastoupení β -farnesenu v porovnání s pivem Moritz bylo identifikováno pouze u pív Černá Hora - Forman polotmavý a Protivín - Merlin černý 13. Srovnatelné zastoupení β -farnesenu bylo identifikováno u piva Pilsner Urquell a piva domácí výroby označeného jako „Pivo 1“, u kterého víme, že při výrobě byl použit výhradně Žatecký chmel. Vliv technologického zpracování je patrný také u pív domácí výroby. Přestože byla většina studovaných „domácích“ pív chmelena či dochmelována Žateckým chmelem, je poměr

a zastoupení složek chmelové silice u jednotlivých výrobků odlišné. Pro studium a hodnocení obsahu β -farnesenu a ostatních složek chmelové silice v pivech české a zahraniční výroby se také nabízí aplikace vícerozměrných statistických metod. Tyto metody by pravděpodobně umožnily odhalit vnitřní souvislosti mezi použitými surovinami a studovanými složkami. Jejich případné použití je předmětem dalšího výzkumu.

Z méně zastoupených sesquiterpenických látek chmelové silice byly v pivech také identifikovány γ -muurolen, δ -kadinen, α -kadinen a α -kalakoren. Zajímavé souvislosti vyplývají ze zastoupení α -kadinenu, který byl identifikován pouze u tmavých a polotmavých piv. Jeho zastoupení zřejmě souvisí s technologií výroby tmavých a polotmavých piv. Také zastoupení α -kalakorenu může částečně poukazovat na odrůdu použitého chmele. U piv, o kterých víme, že byla chmelena pouze Žateckým chmelem (např. i pivo Moritz), nebyl α -kalakoren detekován a jak je možné vidět z tab. 9, relativní zastoupení α -kalakorenu u odrůdy Červeňák je nejnižší mezi studovanými českými odrůdami chmelů.

Tab. 8 Zastoupení terpenických látek v pivech

Pivo	Identifikované terpenické látky ^a														
	β -myrcen	limonen	linalool	methylgeranát	citronellylacetát	β -damascenon	(E)-karyofyllen	α -humulen	β -farnesen	γ -muurolen	valencen	kalamenen (Z)	δ -kadinen	α -kadinen	α -kalakoren
Česká piva															
Braník 10	6,15	3,47	19,40	2,60	88,89	9,40	3,45	14,02	0,32		5,62	2,25	2,49		
Černá Hora - Sklepní 10	10,07	15,67	11,30	3,71	49,73	8,77	3,62	31,65	2,59		14,74				
Gambrinus 10	63,90	8,28	42,82	28,70	29,68	10,87	2,48	22,87	1,01		4,87				2,08
Holba klasik 10	2,24	3,93	7,03		7,70	6,60		3,62	0,15		2,11				1,94
Staropramen - Měšťan	9,42	42,48	15,95	8,55	19,55	3,82	4,19	13,05	0,38		4,00		1,16		
Políčka - Hradební 10	43,70	21,10		33,95	22,67	10,85	12,48	132,16	2,97		15,13	2,11	5,40		3,00
Primus Vévoda brabantský	3,93	3,22	5,43	2,98	22,94	3,80	1,44	16,39	0,79						
Břežňák 11	38,21	21,83	10,68	33,76	59,84	19,85	3,36	15,15	1,80		9,46	6,17			6,96
Chodovar-Prezident premium	14,26	13,77	33,55	9,98	45,41	8,43	7,15	33,53	3,41		10,05	0,85	0,57		
Kryštof - novopacká 11	26,89	17,83	48,84	32,44	11,39	2,52	1,85	17,06	0,82		4,68		0,48		
Litovel - Moravan 11	24,66		63,90	74,45	37,53	15,20		15,77	1,35		6,92	3,48			1,50
Opat Bitter extra chmelené 11	173,53	10,21	61,09	61,79	60,95	12,76	9,37	63,99	3,51		6,05	4,13	1,07		0,71
Primátor Ležák 11%	15,90	12,15	35,89	32,91	18,86	4,93	1,62	9,94	2,18		1,78	0,89			0,55
Rychtář - Standard 11	14,17	54,61	34,18	13,20	31,08	19,53	3,33	10,76	4,14		20,01	3,22			6,31
Rohozec - Skalák 11	13,65		259,14	259,87	77,02	24,79	12,38	8,93	2,38		14,58	3,90			4,72
Svijanský Máz 11	16,32	11,73	20,82	10,74	20,91	9,99	2,10	26,16	1,41		22,83	2,82			
Zlatopramen 11	32,85	7,12	28,07	11,00	39,35	13,68	4,91	36,05	2,65			2,70	2,87		1,85
Krakonoš 12	1,30	10,62	15,18	4,36	10,95	5,74	3,02	12,04	0,59		22,05				1,15
Lobkowicz 12			27,87	10,21	21,22	15,66	1,21	20,33	2,87		6,74	4,28			3,59
Opat kvasnicový 12	71,14	13,48	118,47	39,23	42,90	7,77	6,67	33,02	2,52	5,40	0,79	0,79	2,11		
Pilsner Urquell 12	344,35	14,27	47,65	11,96	48,49	10,67	39,82	408,67	7,92		12,91		12,90		2,51
Rohozec - Skalák 12	31,49	7,01	65,45	87,73	33,19	7,30	1,03	10,81	0,64		4,46	1,50	0,98		
Valášek kvasnicový 12	23,11	2,54	24,23	7,35	12,03	5,20	11,42	85,94	2,98		9,03	2,23	2,23		
Litovel 13 sváteční ležák	19,94	8,37	83,19	74,92	14,50	9,05	1,22	13,86	0,84		2,34	2,00			1,05
Svijanský Kniže 13	29,76		19,88	12,21	9,90	6,44	19,10	116,44	3,84		16,69	4,05	7,27		4,36
Černá Hora - Kvasar 14	19,49	11,74	24,46	60,09	123,33	16,95	8,04	71,28	3,60		32,79	2,20	1,93		
Restaurační minipivovar^b															
Moritz 11	39,82	4,84	7,63	2,15	10,27	3,19	12,61	71,10	9,62		3,95		2,01		
Moritz 12	45,06	5,85	13,15	2,36	12,04	4,10	12,55	78,97	11,01		4,67		3,48		
Nealkoholická piva															
Litovel Free	17,16	11,09	51,43	14,89	2,43	5,46		1,97	0,34						
Svijanský Vozka nealko	19,54	53,99	27,66	26,63	8,05	9,95		23,56	0,34		4,60				
Bernard s čistou hlavou	97,24	9,86	11,21	1,57	3,28	2,47		16,68	5,24						

Tab. 8 Zastoupení terpenických látek v pivech – pokračování tabulky

Pivo	Identifikované terpenické látky ^a														
	β -myrcen	limonen	linalool	methylgeranát	citronellylacetát	β -damascenon	karyofyllen	α -humulen	β -farnesen	γ -muurolen	valencen	kalamenen (Z)	δ -kadinen	α -kadinen	α -kalakoren
Polotmavé pivo															
Černá Hora - Forman nealko	296,88	81,03	15,91	40,83	2,97	12,34	206,05	828,24	12,81	12,93	22,44	79,81	4,27	10,73	12,94
Chodovar - Skalní 12	6,93	9,67	15,08	3,27	22,86	5,29	4,31	32,75	1,68		8,26	1,16			
Tmavé pivo															
Černá Hora - Granát 12		8,28	7,45		7,21	12,46	35,75	95,37	4,40		2,42	4,64	5,20	2,18	
Pardubický Porter 19		2,45	8,75				8,12	31,94	3,12		2,45	1,45	1,48	1,09	
Protivín - Merlin černý 13	49,16	9,16	39,32	8,25	19,54	9,82	169,61	701,27	74,37	5,80	11,51	17,40	24,59	3,70	3,21
Zahraníční															
Hoegaarden	17,06	182,11	999,60	6,02	39,05	7,06		12,14	1,17						
Guinness original	1,53	6,30	22,67	3,66	7,51	7,79		8,93	0,40		4,13	1,56	2,24		
Stella Artois	22,07	5,80	11,74	1,08	3,63	2,31	3,88	23,64			2,61	2,36			0,97
Domácí výroba^c															
Pivo 1 - VUPS ^d	7,25	8,55	24,24		21,56	5,38	42,01	203,55	9,18	2,68	21,73	6,07	5,25		
Pivo 2 – VUPS ^d		27,79	91,03	57,70	6,17	7,09	3,89	19,42	1,87		18,07	3,11			5,91
Pivo 3 – VUPS ^d	3,93	9,71	19,44	7,69		1,00	4,86	35,91	1,52	2,56	3,03	1,77			
Pivo 4 – VUPS ^e	3,99	19,33	42,22	5,29		2,89		22,48	0,95						0,81
Pivo 5 – Mistr Sládek ^f		3,82	14,68	3,19		3,10	1,98	7,14	4,25						
Coopers ^g		303,94			21,73	6,96			2,20		40,14				

^a Průměrné plochy píků v relativních jednotkách ($\times 10^4$; n = 3, RSD \leq 5%)

^b Olomoucký restaurační minipivovar, chmelí pouze Žateckým chmelem.

^c Piva vyrobená v domácích podmínkách ze zakoupených surovin.

^d Pro výrobu použit mladinový koncentrát VÚPS. Pro výrobu byl použit Žatecký chmel, u vzorku Piva 3 pouze pro dochmelení.

^e VÚPS mladinový koncentrát, dochmelený odrůdou Premiant.

^f Pro výrobu použit mladinový koncentrát zn. Mistr Sládek zakoupený v místním specializovaném obchodě, pivo nebylo dochmelováno.

^g Pro výrobu použit mladinový koncentrát zn. Coopers zakoupený v místním specializovaném obchodě, pivo svrčně kvašené, nebylo dochmelováno.

5.4 Analýza fenolických kyselin ve vínech

Metodou GC/MS byly u 28 vzorků českých vín kvantifikovány vybrané fenolické kyseliny (tab. 9). Skupina hydroxybenzoových kyselin zahrnovala kyselinu vanilovou (1), gentisovou (2), protokatechovou (3), syringovou (4) a gallovou (5), skupina hydroxyskořicových kyselin zahrnovala kyselinu kumarovou (6), ferulovou (7) a kávovou (8).

Tab. 9 Obsah fenolických kyselin v českých vínech

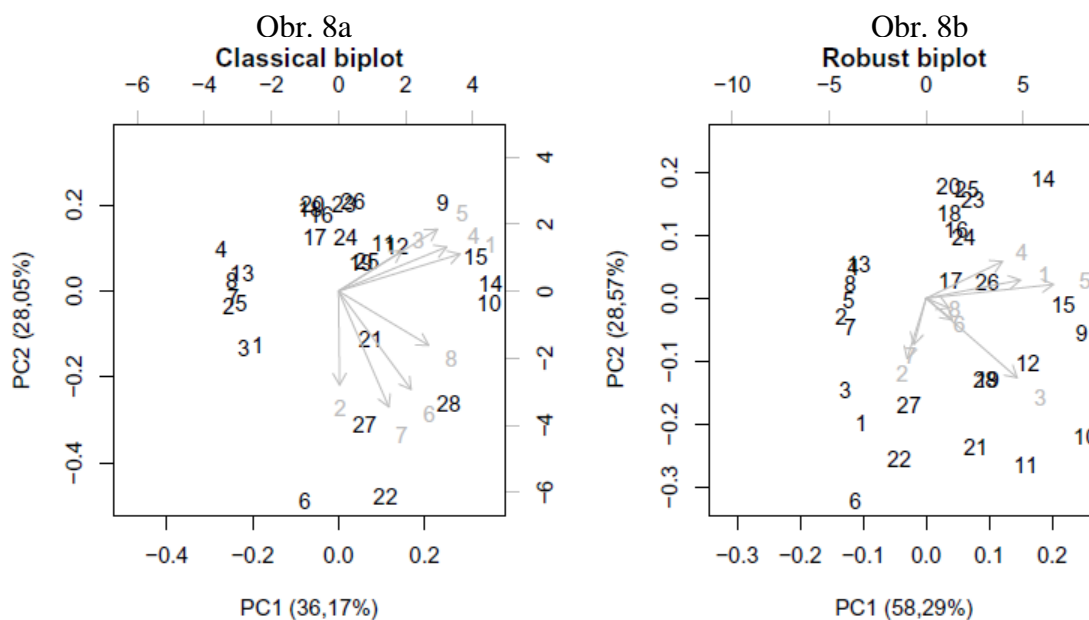
Vzorky vín	č.	Fenolické kyseliny ^a							
		vanilová (1)	gentisová (2)	protokatechová (3)	syringová (4)	gallová (5)	kumarová (6)	ferulová (7)	kávová (8)
Bílá vína	1	0,853	6,409	12,499	0,575	6,234	3,578	0,933	5,740
	2	0,524	4,401	5,427	0,296	1,803	2,902	0,563	4,573
	3	0,099	6,565	8,099	0,352	3,693	4,875	0,727	6,965
	4	0,535	2,111	8,151	0,225	2,314	1,053	0,259	4,434
	5	0,413	2,125	5,603	0,189	8,039	2,473	0,905	6,662
	6	0,281	7,992	6,613	0,141	2,272	27,905	1,330	2,861
	7	0,412	3,589	8,403	0,230	4,445	2,810	0,671	2,015
Růžové víno	8	0,972	2,970	5,628	0,832	4,654	1,904	0,558	3,220
Červená vína	9	10,734	4,192	23,347	9,900	109,666	6,019	0,544	13,337
	10	11,217	5,991	25,484	10,240	95,896	14,304	1,001	26,742
	11	4,608	2,915	35,097	3,473	72,259	7,496	0,757	14,032
	12	6,869	4,832	20,662	7,049	92,833	7,529	0,579	13,268
	13	2,156	3,975	4,313	2,954	1,657	1,965	0,301	6,043
	14	17,364	2,985	4,110	23,845	16,562	16,011	1,001	12,275
	15	8,510	1,537	18,977	12,033	88,096	6,685	0,933	52,378
	16	6,163	2,051	9,362	6,114	53,155	4,892	0,350	1,552
	17	4,614	3,978	10,778	4,590	60,919	5,139	0,286	4,605
	18	3,831	2,043	7,219	5,792	68,390	2,281	0,305	7,045
	19	4,528	4,264	22,749	5,992	51,992	10,880	0,328	14,758
	20	3,836	1,325	5,457	6,654	66,746	2,929	0,292	8,180
	21	5,486	10,034	15,856	5,526	69,166	10,669	0,505	16,980
	22	4,746	8,429	3,053	5,199	14,415	16,843	1,658	43,295
	23	6,044	1,863	8,508	9,940	57,440	4,028	0,310	9,235
	24	6,731	2,972	7,047	8,316	61,711	1,807	0,700	9,511
	25	8,040	2,950	1,555	12,440	47,864	10,472	0,563	5,430
	26	7,625	1,708	19,518	8,413	38,448	3,607	0,409	7,617
	27	5,484	4,965	5,666	4,293	22,586	11,780	1,806	25,474
	28	5,187	1,822	10,123	4,434	68,869	15,590	1,649	63,768

^a Koncentrace fenolických kyselin ve vínech (mg l⁻¹).

Pro statistické hodnocení vzájemného vztahu jednotlivých fenolických kyselin a vzorků vín byla na vstupní matici dat (28 pozorování o 8-mi proměnných) aplikována statistická metoda PCA, v klasickém i robustním uspořádání. Na obr. 8 jsou zobrazeny biploty pro klasickou PCA (obr. 8a) a PCA v robustní provedení (obr. 8b). V případě standardního

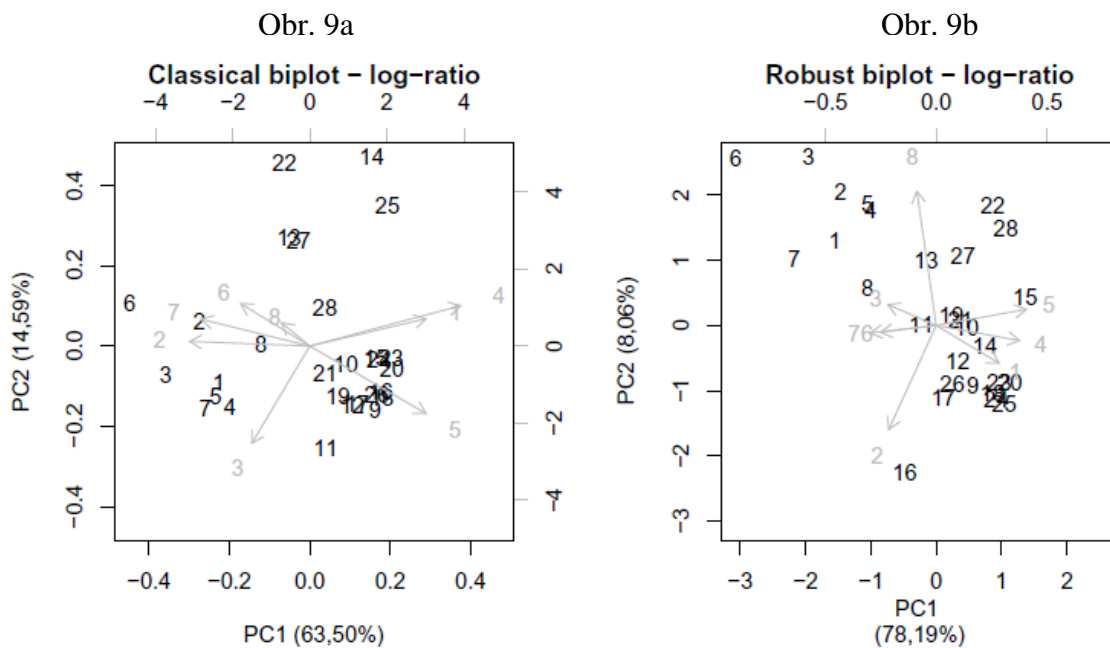
(nekompozičního) přístupu pro zpracování datové matice (standardizace proměnných) nebylo možné dostatečně rozlišit soubor vín. Výsledky ukazují částečné oddělení vzorků bílých vín (č. 1 – 7) od červených vín na základě PC1, ale do skupiny je zahrnut i vzorek růžového vína (č. 8). V biplotu je možné také vidět významný vliv odlehlých hodnot (vína č. 6 a 22) na datovou matici. Metoda dokázala popsat pouze 64,22 % z celkové variance. Rozdělení studovaných fenolických kyselin zobrazené formou šipek je viditelně zatíženo chybou obsaženou již ve vstupní matici dat. Data jsou zpracována tak jako by obsahovala absolutní a nikoli relativní informaci. Důsledkem je deformace zobrazované datové struktury, šipky reprezentující fenolické kyseliny neposkytují dostatečné pokrytí vzorků vín v celém biplotu a jsou pouze jednostranně orientovány ve směru kladných hodnot PC1.

Pro eliminaci vlivu odlehlých hodnot a lepší interpretaci dat byla na data aplikována robustní metoda PCA. V tomto případě došlo do jisté míry ke zlepšení a podařilo se popsat 86,86 % variance dat. Avšak vzájemné rozdělení proměnných a pozorování v biplotu zůstalo zachováno a není možné data lépe interpretovat. Opět jako v předchozím případě jsou vzorky bílých vín (č. 1 – 7) částečně odděleny od červených vín, ale do skupin vín je zahrnut i vzorek růžového vína (č. 8).



Obr. 8 PCA analýza ve standardním (obr. 11a) a robustním (obr. 11b) provedení pro netransformovaná data (kyselina vanilová (1), gentisová (2), protokatechová (3), syringová (4), gallová (5), kumarová (6), ferulová (7), kávová (8); čísla 1 – 28 označují vzorky vín).

Data byla zpracována pomocí transformace a na matici *clr* transformovaných kompozičních dat byla aplikována PCA v klasickém a robustním uspořádání. Na první pohled ukazují výsledky analýzy (obr. 9a,b) velmi dobré rozdělení jak proměnných (fenolické kyseliny), tak jednotlivých pozorování (vzorky). V případě klasického kompozičního biplotu (Obr. 9a) tvoří vzorky bílých vín jasně ohraničenou skupinu. Vzorek růžového vína (č. 8) je umístěn mezi obě hlavní skupiny vín. Také vzájemné vztahy mezi proměnnými jsou zřejmé. V biplotu došlo k oddělení dvou hlavních skupin fenolických kyselin (2, 6, 7, 8 a 1, 4), které mají konstantní podíl. Zbylé dvě proměnné (3, 5) ukazují odlišný vliv na rozdělení vzorků. Datový soubor ale obsahuje i některé odlehlé hodnoty, které mohou mít vliv na výsledné zpracování metodou PCA. Pro eliminaci odlehlých výsledků byla na transformovaná kompoziční data aplikována robustní PCA. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 9b formou kompozičního robustního biplotu. Po aplikaci robustní metody byla základní struktura dat zachována. Vzorky vín jsou i nadále separovány do odpovídajících skupin na bílá a červená vína, včetně růžového vína umístěného mezi těmito skupinami. Podstatná změna oproti klasickému biplotu nastala ve vzájemném vztahu mezi proměnnými. Nyní jsou vytvořeny dvě hlavní skupiny látek (1, 4, 5 a 3, 6, 7), které jsou primárně zodpovědné za rozdělení podle PC1, a dvě další proměnné (2 a 8), které jsou na předchozí skupiny orientovány v kolmém směru a zodpovědné za rozdělení podle PC2.



Obr. 9 PCA analýza kompozičních dat v klasickém (obr. 12a) a robustním (obr. 12b) provedení: kyselina vanilová (1), gentisová (2), protokatechová (3), syringová (4), gallová (5), kumarová (6), ferulová (7), kávová (8); čísla 1 – 28 označují vzorky vín.

Kombinace *clr* transformace a robustní PCA dovoluje zřejmé a logické zobrazení experimentálních dat. Dvě zřetelně oddělené skupiny fenolických kyselin (1, 4, 5 a 3, 6, 7) jsou zřejmě zodpovědné za rozdělení vzorků v horizontální směru, který převážně odpovídá rozdělení na bílá a červená vína. Fenolické kyseliny z obou skupin, tj. kyselina vanilová (1), syringová (4) a gallová (5) stejně jako kyselina protokatechová (3), kumarová (6) a ferulová (7), jsou často detekovány v bílých i červených vínech. Kyseliny z první skupiny jsou ovšem obvykle v červených vínech přítomny ve výrazně vyšších koncentracích než v bílých, zatímco koncentrace kyselin z druhé skupiny jsou v červených a bílých vínech přibližně srovnatelné (tab. 9). V tomto smyslu mohou být kyseliny vanilová, syringová a galová považovány za skutečné markery červených vín, jak naznačují i jiné studie²⁷⁷ věnované stanovení fenolických látek ve vínech.

Dvě další fenolické kyseliny, gentisová (2) a kávová (8) jsou orientovány ve směru kolmém k hlavní skupině kyselin. Jistý druh ortogonálního chování kyseliny gentisové a galové byl pozorován například ve studii zaměřené na výzkum fenolických kyselin během fermentace různých typů vín¹⁷³. Ve vzorcích, kde koncentrace kyseliny gentisové během fermentace rostla, byl pozorován pokles koncentrace kyseliny galové a naopak. Obdobně bylo pozorováno komplementární chování kyseliny kávové a ferulové. Tato zjištění je možné do jisté míry interpretovat v souladu s hlavními cestami biosyntézy fenolických kyselin. Kyselina gentisová a galová jsou produkty dvou různých biosyntetických cest vycházejících ze stejného prekurzoru, z kyseliny 3-dehydroshikimové. Komplementární chování může být výsledkem preference jedné z obou možných biochemických cest podle konkrétních podmínek během fermentace, případně zrání vína. Kyseliny kávová a ferulová naproti tomu představují prekurzor a produkt v jedné z řady následných biochemických reakcí a preference, vedoucí k hromadění jedné nebo druhé substance, může souviset s aktivitou enzymů v následných biochemických krocích^{278,279}. V obou případech tak hraje roli jistý druh konkurence a lze předpokládat, že v obou případech závisí vzájemný poměr fenolických kyselin na konkrétních podmínkách během fermentace. Kyseliny gentisová a kávová tak mohou být považovány za jistý druh technologických markerů, charakterizujících nejen danou odrůdu révy, ale do určité míry i technologický postup a podmínky použité při výrobě vína.

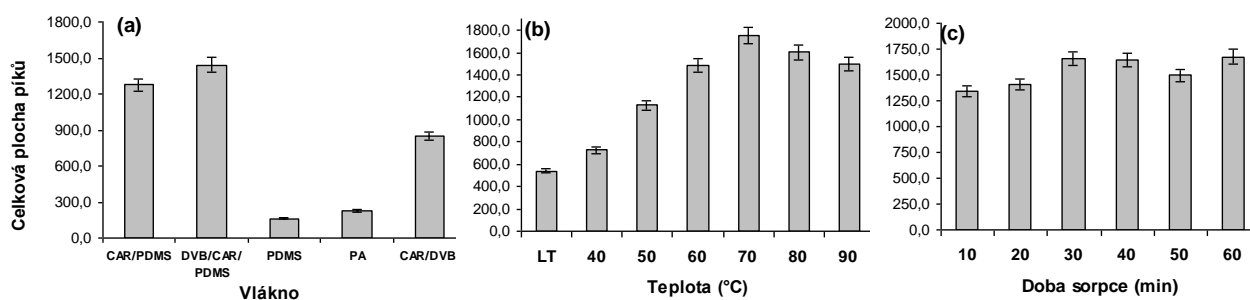
Ze všech použitých statistických metod poskytuje kombinace *clr* transformace a robustní PCA nejlepší rozdělení červených a bílých vín, dobře eliminuje vliv odlehlých

hodnot, zohledňuje přirozenou strukturu dat a dovoluje logickou interpretaci výsledků v souladu s dříve publikovanými údaji.

5.5 Analýza Olomouckých tvarůžků

Studium zrání tvarůžků bylo realizováno dvěma nezávislými metodami. Pro studium změn v aromatickém profilu tvarůžků byla aplikována mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, pro studium chemického složení povrchové a vnitřní části sýra byla použita Ramanova spektrometrie.

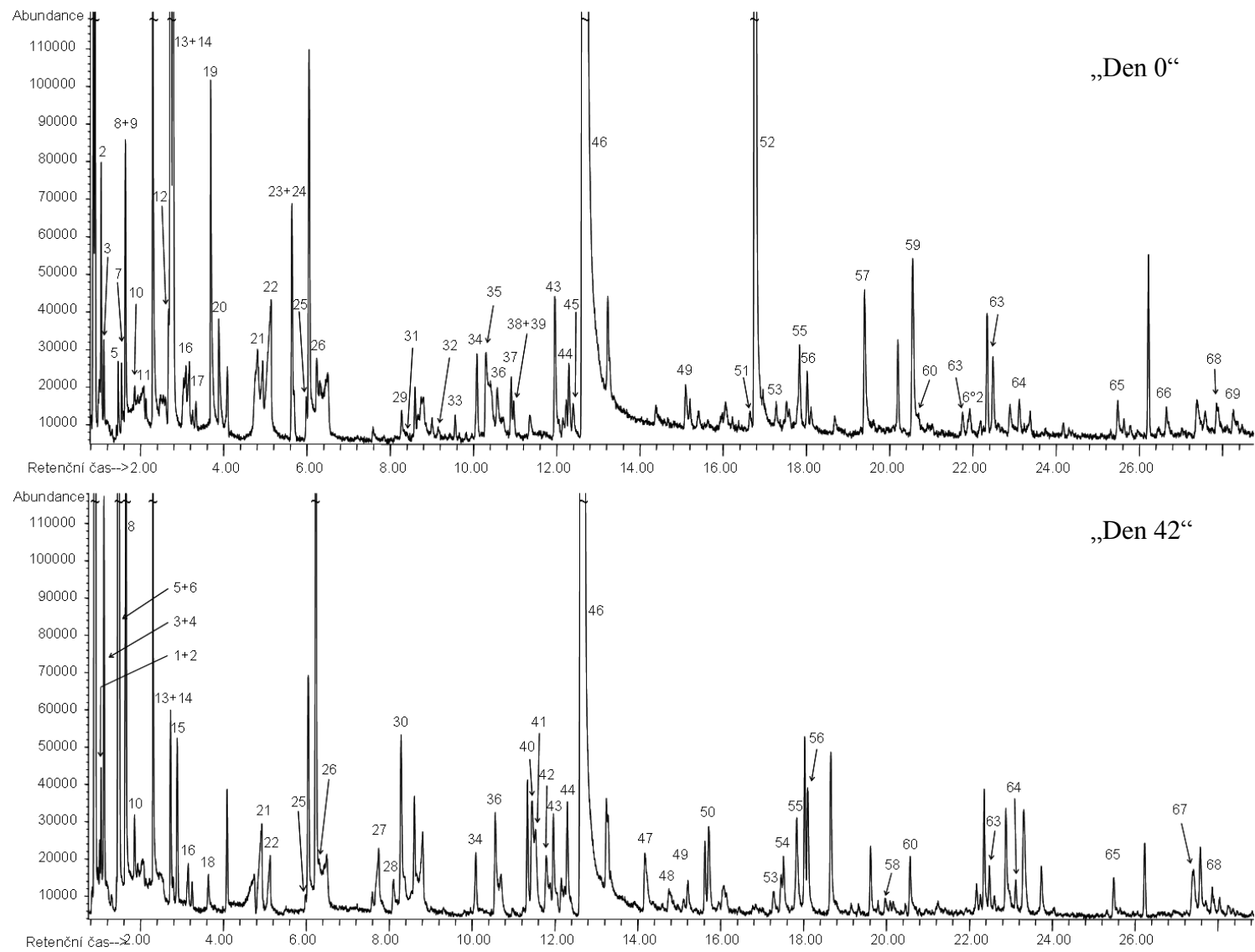
Pro analýzu aromatických látek v Olomouckých tvarůžcích bylo testováno pět extrakčních vláken (85 μm - CAR/PDMS, 50/30 μm - DVB/CAR/PDMS, 100 μm - PDMS, 85 μm - PA, 65 μm - CW/DVB). V obr. 10a jsou zaznamenány a porovnány sumy ploch píků všech analyzovaných látek extrahovaných technikou SPME v headspace uspořádání. V souladu s dříve publikovanými výsledky²⁸⁰⁻²⁸² se jako vhodnější ukázala být vlákna využívající kombinaci dvou komponent – kapalné fáze (PDMS, CW) a pevného sorbentu (CAR, DVB). Tato vlákna umožnila stanovit několikanásobně vyšší množství látek než PDMS a PA vlákna. Pro následující experimenty bylo vybráno DVB/CAR/PDMS vlákno, které dosáhlo nejvyššího celkového množství extrahovaných organických látek v celém rozsahu sledovaných analytů. V experimentu byla testována také vhodná teplota pro extrakci látek (obr. 10b). V případě zvýšení extrakční teploty docházelo ke zvýšení difuze analytu z matrice a bylo možné stanovit vyšší celkové množství extrahovaných látek. Pro další experimenty byla vybrána ekvilibrační a sorpční teplota 70 °C, při které bylo stanoveno největší množství extrahovaných látek a nebyly pozorovány žádné rozkladné produkty, které by mohly vznikat vlivem termální degradace obsažených látek. Posledním testovaným parametrem byl vliv doby sorpce na množství extrahovaných látek (obr. 10c). Pro analýzu aromatických látek v sýrech bylo zvoleno 30 min, kdy bylo dosaženo dostatečné citlivosti pro všechny studované analyty a relativně krátké extrakční doby. Současně nedocházelo k výrazným změnám v rovnováze extrahovaných látek na vlákně.



Obr. 10 Porovnání extrakčních parametrů pro HS-SPME-GC/MS analýzu (průměrné hodnoty ploch píků v relativních jednotkách, n=3):

- různá extrakční vlákna (60 °C, 30 min ekvilibrace + 30 min sorpce)
- vliv teploty sorpce (DVB/CAR/PDMS vlákno, 30 min ekvilibrace + 30 min sorpce)
- vliv doby sorpce (DVB/CAR/PDMS vlákno, 30 min ekvilibrace, 70 °C)

Analýza Olomouckých tvarůžků metodou HS-SPME-GC/MS byla zaměřena na studium aromatického profilu v závislosti na stupni zralosti sýru. Pro analýzu byly použity tvarůžky jedné šarže. Hlavní experiment byl realizován v intervalu 49 dní. „Dnem 0“ je označen sýr, který byl zformován a připraven k dozrávání. Tento sýr již prošel první fází zrání tzv. fází sušení, kdy se na jeho povrchu vytvoří podmínky pro rozmnožení aerobní proteolytické mikroflóry, jejíž enzymatickou činností získají tvarůžky typickou vůni, chuť a zlatožlutý až oranžový maz²¹⁴. „Den 42“ odpovídá době expirace tvarůžků. Experiment byl také doplněn o analýzu aromatického profilu přezrálého sýra v době tří měsíců po expiraci („den 42 + 90“). Identifikace byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter s knihovnou spekter a známých elučních charakteristik látek. Kvantifikace látek byla provedena na základě dominantního iontu z rekonstruovaného chromatogramu. Celkem bylo identifikováno 69 látek, které se podílí na aroma tvarůžků. Aromatický profil sýru v „den 0“ a „den 42“ je prezentován na příslušných chromatogramech na obr. 11. Mezi identifikované skupiny látek se řadí alkoholy, kyseliny, aldehydy, estery, ketony, fenoly, sirné látky, terpenoidy a také lakton (tab. 10).



Obr. 11 HS-SPME-GC/MS analýza tvarůžků v „den 0“ a „den 42“ (identifikované látky jsou uvedeny v tab. 10)

Tab. 10 Aromatické složky Olomouckých tvarůžků

č.	sloučeniny	Rt	plocha píku ^a „Den 0“	plocha píku ^a „Den 42“	plocha píku ^b „Den 42 + 90“	m/z ^c
Alkoholy						
2	ethanol	1,052	22,48	11,41	16,29	31/45
4	propan-2-ol	1,125	0,94	38,29	24,18	45/59
6	butan-2-ol	1,486	0,60	97,29	41,50	31/ 45/59
9	2-methylpropan-1-ol	1,635	17,34	9,55	nd	41/ 43/59/74
12	pentan-1-ol	2,675	6,86	nd	nd	42/ 55/70
13	3-methylbutan-1-ol	2,723	316,41	17,05	60,69	41/42/ 55/70
14	2-methylbutan-1-ol	2,779	85,42	3,20	13,47	41/56/ 57/70
19	butan-2,3-diol	3,683	132,10	3,42	nd	45/57
20	butan-1,3-diol	3,878	61,79	2,04	nd	45/57
26	heptan-2-ol	6,308	5,47	3,46	nd	45/55/83
35	benzyl alkohol	10,307	39,04	nd	nd	77/ 79/107/108
44	nonan-2-ol	12,289	16,15	30,64	10,68	45/55/69
46	2-fenylethyl alkohol	12,705	5073,10	3643,63	3135,38	91/92/122
56	undekan-2-ol	18,111	3,52	21,14	11,05	45/55/69/83
Kyseliny						
8	octová	1,625	14,88	53,78	64,90	43/45/60
16	2-methylpropanová	3,088	47,48	10,53	12,35	41/ 43/73/88
18	butanová	3,645	3,48	7,47	80,12	43/ 60/73
21	3-methylbutanová	4,810	78,43	50,47	104,93	41/ 60/87
22	2-methylbutanová	5,134	63,71	17,72	60,77	41/57/ 74/87
27	4-methylpentanová	7,748	nd	12,69	63,66	43/ 57/74/83
Aldehydy						
10	3-methylbutan-1-al	1,863	1,20	3,90	9,15	44/58/71/86
28	benzaldehyd	8,100	6,18	20,65	48,81	51/77/ 105/106
36	2-fenylacetaldehyd	10,573	29,92	69,57	36,68	65/ 91/120
45	nonan-1-al	12,319	3,25	0,67	nd	41, 57,70,98
Estery						
7	ethyl acetát	1,543	11,88	nd	nd	43/61/70/88
17	2-methylpropyl acetát	3,330	6,77	nd	nd	43/56/73
23	3-methylbutyl acetát	5,637	42,36	nd	nd	43/55/70/87
24	2-methylbutyl acetát	5,687	9,21	nd	nd	43/55/70/73
29	3-methylbutyl propionát	8,277	3,62	nd	nd	43/ 57/70/87
31	2-methylbutyl propionát	8,325	1,33	nd	nd	43/ 57/70/87
32	ethyl hexanoát	9,158	0,95	nd	nd	43/ 88/99
33	3-methylbutyl 2-methylpropionát	9,562	3,70	nd	nd	43/55/70/89
37	pentyl 2-methylpropionát	10,910	8,44	nd	nd	43/55/ 71/89
38	3-methylbutyl butanoát	10,959	3,26	nd	nd	43/55/ 71/90
49	ethyl oktanoát	15,095	6,25	1,78	nd	57/ 88/101/127
52	2-fenylethyl acetát	16,767	726,98	3,24	3,73	43/91/ 104
57	2-fenylethyl propionát	19,399	65,73	nd	nd	57/91/ 104
59	2-fenylethyl 2-methylpropionát	20,545	50,49	nd	nd	43/71/91/ 104
60	ethyl dekanóat	20,567	17,05	9,81	0,62	88/101/200
61	2-fenylethyl butanoát	21,756	6,96	nd	nd	43/71/ 104
63	undec-10-enyl acetát	22,486	6,28	3,16	nd	43/55/82/152
65	ethyl dodekanoát	25,483	6,27	5,58	0,67	88/101/228
66	3-methylbutyl dodekanoát	26,653	5,85	nd	nd	43/ 70/155/173

Tab. 10 Aromatické složky Olomouckých tvarůžků – pokračování tabulky

č.	sloučeniny	Rt	plocha píku ^a „Den 0“	plocha píku ^a „Den 42“	plocha píku ^{a,b} „Den 42 + 90“	m/z ^c
Ketony						
3	aceton	1,117	14,76	58,11	85,49	43/58
5	butan-2-on	1,462	13,96	238,68	397,87	43/57/72
11	pentan-2-on	2,130	5,55	2,12	4,23	43/58/71/86
25	heptan-2-on	5,983	3,68	8,89	11,84	43/58/71
43	nonan-2-on	11,954	32,47	24,57	65,08	43/58/71
53	undekan-4-on	17,274	2,01	1,73	2,50	43/57/86/127
55	undekan-2-on	17,832	14,50	15,21	38,84	43/58/71
64	tridekan-2-on	23,118	5,31	4,79	11,35	43/58/71
68	pentadekan-2-on	27,854	3,40	3,17	7,79	43/58/71/226
Fenoly						
40	<i>p</i> -kresol	11,452	nd	37,64	39,09	77/90/107/108
41	<i>m</i> -kresol	11,532	nd	27,08	29,61	77/90/107/108
42	<i>o</i> -guaiakol	11,789	nd	23,53	6,62	53/81/109/124
47	4-ethylfenol	14,177	nd	42,02	37,55	107/122
48	4-methylguaiakol	14,755	nd	6,55	4,99	95/123/138
54	4-ethylguaiakol	17,465	nd	8,71	6,23	137/152
58	dihydroeugenol	19,976	nd	8,25	3,54	122/137/166
Organické sloučeniny síry						
1	methanethiol	1,017	0,49	4,12	4,70	45/47/48
15	dimethyl disulfid	2,888	nd	8,22	213,05	45/61/79/94
30	dimethyl trisulfid	8,289	nd	65,96	101,91	45/79/111/126
50	dimethyl tetrasulfid	15,714	nd	14,18	28,52	64/79/94/158
Terpenoidy						
34	limonen	10,085	7,62	5,18	nd	67/68/79/93
39	γ -terpinen	10,972	2,61	0,39	nd	77/93/121/136
51	geraniol	16,644	2,82	0,31	nd	41/69/123
62	geranyl aceton	21,925	5,03	0,68	nd	43/69/136/151
69	farnesol (<i>Z,Z</i>)	28,264	5,09	0,51	nd	41/69/81/137
Laktony						
67	γ -undekalakton	27,417	1,37	8,69	7,04	41/85/128

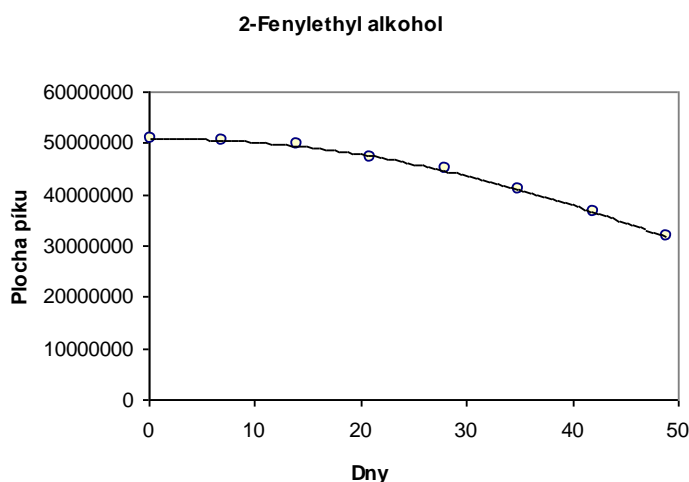
^a Průměrné plochy píků v relativních jednotkách ($\times 10^4$, $n = 3$, $RSD \leq 5\%$) odečtené na základě dominantního iontu (značený tučně) z celkového iontového proudu

^b Vzorek 3 měsíce po expiraci

^c Série charakteristických iontů látky, tučně označen kvantifikační m/z ion

Hlavní složku aroma tvarůžků s nejvyšším relativním zastoupením reprezentuje 2-fenylethyl alkohol, který vzniká z aminokyseliny fenylalaninu. Jeho nejvyšší zastoupení bylo zjištěno u čerstvého sýra a postupným zráním se jeho odezva snižovala (obr. 12). Také zastoupení dalších alkoholů pocházejících z degradace aminokyselin (2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol) se během zrání sýra snížilo. U 3-methylbutan-1-olu a 2-methylbutan-1-olu byl po expiraci sýru pozorován nárůst jejich zastoupení, což může

souviset postupnou degradací aminokyselin. Tyto alkoholy se mohou podílet na nepříjemné vůni i chuti přezrálých sýrů²⁸³. U ostatních alkoholů bylo pozorováno také snížení jejich zastoupení s blížící se dobou expirace sýrů. Výjimkou byly sekundární alkoholy propan-2-ol, butan-2-ol, nonan-2-ol a undekan-2-ol, jejichž obsah s dobou zrání narůstal. V době expirace dosahoval jejich obsah jistého maxima a následně klesal. Významný nárůst byl zaznamenán u propan-2-olu a butan-2-olu, v době expirace bylo jejich množství několikanásobně vyšší než v „den 0“, kdy byly identifikovány na hranici limitu kvantifikace.



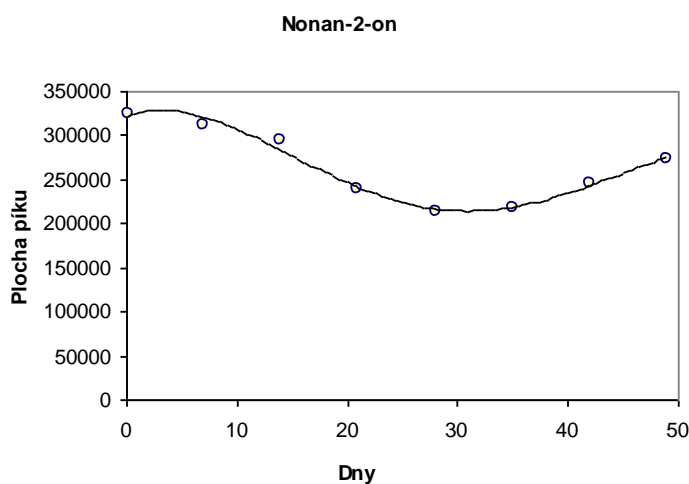
Obr. 12 Zastoupení 2-fenylethyl alkoholu v závislosti na době zrání tvarůžků

Pikantní a ostřejší vůně tvarůžků do jisté míry souvisí se zastoupením mastných kyselin. U tvarůžků byly identifikovány kyselina octová, kyselina butanová a 4-methylpentanová. Jejich obsah se zvyšoval se stupněm zralosti sýru. Naproti tomu došlo s blížící se dobou expirace ke snížení obsahu kyseliny 2-methylpropanové, 3-methylbutanové, 2-methylbutanové. Jejich obsah se ovšem po expiraci sýrů opět zvyšoval.

Zastoupení kyseliny 3-methylbutanové a 3-methylbutan-1-olu a snížení jejich obsahu zřejmě souvisí s vyšší produkcí 3-methylbutan-1-alu během dozrávání sýra. Také u dalších identifikovaných aldehydů jako je benzaldehyd a 2-fenylacetaldehyd došlo k nárůstu jejich obsahu, zatímco obsah odpovídajících alkoholů (benzylalkohol a 2-fenylethyl alkohol) se během zrání snížil.

Ketony vesměs patří mezi složky aroma sýrů zrajících na povrchu a plísňových sýrů. U tvarůžků bylo identifikováno 9 ketonů. Jejich obsah se obecně po celou dobu zrání tvarůžků

zvyšoval. Rapidní nárůst byl pozorován u butan-2-onu, který měl v době expirace sýru majoritní relativní zastoupení z identifikovaných ketonů. U pentan-2-onu, nonan-2-onu (obr. 13), undekan-4-onu, undekan-2-onu a tridekan-2-onu byl pozorován určitý pokles před dobou expirace, ale následně došlo k nárůstu jejich zastoupení.

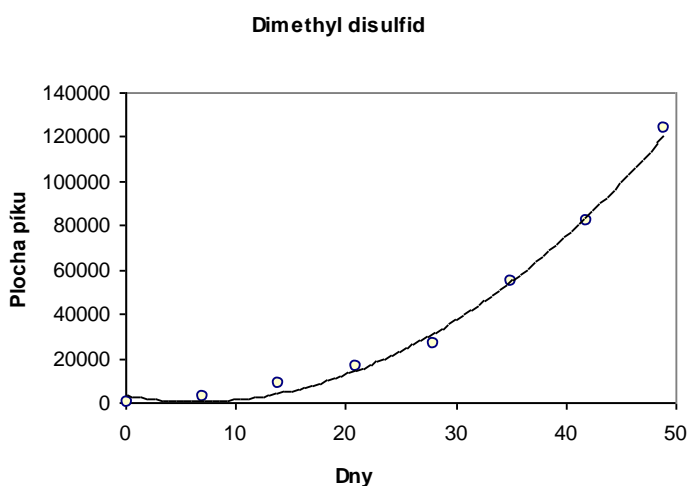


Obr. 13 Zastoupení nonan-2-onu v závislosti na době zrání tvarůžků

Čerstvé tvarůžky se vyznačovaly přítomností obsáhlé skupiny esterů, které mohou přispívat ke květinovo-ovocnému projevu tvarůžků. Mezi hlavní identifikované estery patřily 2-fenylethyl acetát, a dále ethyl acetát, 3-methylbutyl acetát, 2-fenylethyl propionát, 2-fenylethyl 2-methylpropionát a ethyl dekanoát. V době expirace sýrů byly detekovány pouze 2-fenylethyl acetát, ethyl dekanoát, ethyl dodekanoát, ethyl oktanoát a 10-undecen-1-yl acetát. Přítomnost esterů můžeme pokládat za ukazatel čerstvosti sýrů.

Se zvyšujícím se stupněm zralosti tvarůžků docházelo k tvorbě dalších senzory významných látek, jako jsou fenoly, organické sírné látky a laktony. Fenolické látky jsou vedlejší produkty mléčného kvašení a patří mezi běžné složky aroma zralých sýrů. U Olomouckých tvarůžků byly identifikovány *p*-kresol, *m*-kresol, *o*-guaiakol, 4-ethylfenol, 4-methylguaiakol, 4-ethylguaiakol a dihydroeugenol. Z uvedených fenolických látek je např. *p*-kresol složkou aroma sýru Čedar²²⁰. Organické sírné látky také představují složky aroma zralých sýrů. Za produkci sírných sloučenin je u tvarůžků zodpovědná zrací kultura *B. linens*. Na počátku zrání tvarůžků byl detekován pouze methanthiol, který vzniká při proteolýze bílkovin degradací z aminokyseliny methioninu. U zralých tvarůžků byly

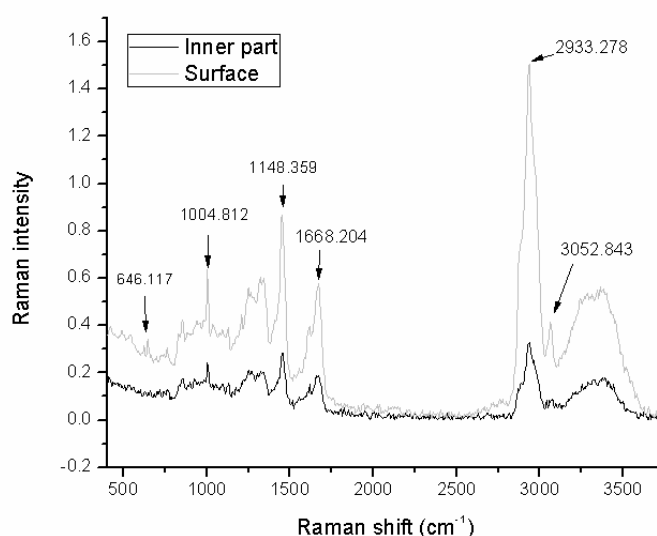
identifikovány také dimethyldisulfid, dimethyltrisulfid a dimethyltetrasulfid, jejichž prekurzorem je výše uvedený methanthiol. Tyto látky se projevují česnekovým aroma^{216,217} a spoluvytvářejí pikantní vůni a chuť tvarůžků. Jejich přítomnost je u zrajících sýrů důkazem rozkladných procesů bílkovin. Přezrálé tvarůžky se projevovaly velmi výrazným aroma s hnilobnými tóny a pachy začínajícího rozkladu, které můžeme přisuzovat zvýšenému obsahu dimethyldisulfidu a dimethyltrisulfidu. Zastoupení dimethyldisulfidu (obr. 14) a dimethyltrisulfidu rapidně narůstá s blížící se dobou expirace produktu a je zřejmé, že množství dimethyldisulfidu může sloužit jako marker vhodné konzumní doby tvarůžků. Sledování obsahu dimethyldisulfidu by mohlo nalézt uplatnění při kontrole kvality tvarůžků a podobných sýrů v potravinářské praxi a pro ochranu spotřebitele.



Obr. 14 Zastoupení dimethyl disulfidu v závislosti na době zrání tvarůžků

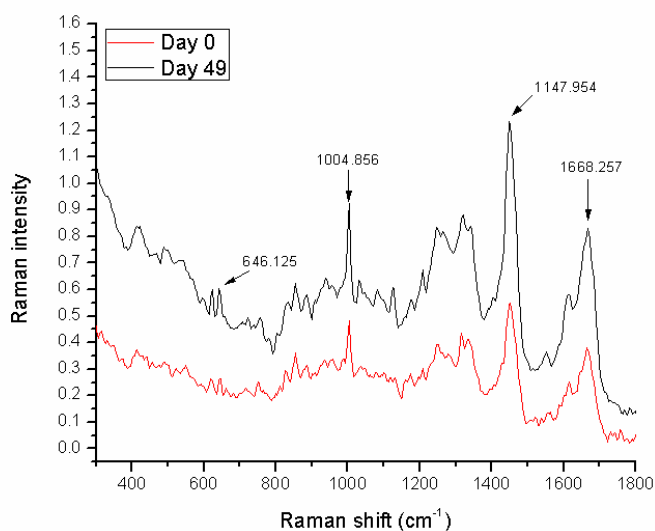
Z dalších identifikovaných látek můžeme uvést laktony, jejichž přítomnost v sýrech obecně souvisí s degradací lipidů. V aroma tvarůžků byl identifikován pouze γ -undekalakton, který se projevuje broskvovou vůní²⁰¹. Zajímavou složku aroma tvarůžků představují terpenoidy, které byly identifikovány zejména na počátku zrání (Den 0) a jejich obsah se v průběhu zrání produktu snižuje. U přezrálých tvarůžků nebyly terpenoidy detekovány. Jejich zastoupení v čerstvých sýrech může sloužit jako určitý ukazatel kvality použitých surovin.

Analýza Olomouckých tvarůžků metodou Ramanovy spektrometrie byla zaměřena na studium chemického složení povrchové a vnitřní části sýra. Nezralé tvarůžky (Den 0) se vyznačovaly tvarohovitou vnitřní částí, zatímco tvarůžky v době expirace (Den 42) byly plně prozřálé. Obr. 15 znázorňuje srovnání spekter vnitřní (inner part) a povrchové (surface) části nezralého sýra, s vyznačenými pásy jednotlivých funkčních skupin. Z analýzy vyplývá, že během zrání docházelo na povrchu k tvorbě siřných a dusíkatých sloučenin, jejichž zastoupení je ve středové části sýra relativně nízké. V intervalu $630 - 790 \text{ cm}^{-1}$ jsou ve spektrech povrchu patrné slabé pásy vibrací C-S alifatických skupin (646 cm^{-1}). Dochází také ke zvýšení intenzity vibrací vazeb aromatických siřných sloučenin (1004 cm^{-1}) a vazeb C=S (1148 cm^{-1}). Je zřejmé, že se mění i profil pásů vibrací alifatických uhlovodíkových řetězců (zejména vazby C-H) v okolí 3000 cm^{-1} , kde dochází ke zvýšení intenzit pásů vazeb nenasycených uhlovodíků (3052 cm^{-1}). Zvyšují se také pásy vazeb C-H (2933 cm^{-1}). Analogická situace nastává v průběhu zrání i u dusíkatých sloučenin, ve spektru povrchu tvarůžku bylo zaznamenáno zvýšení intenzit pásu C=N vazeb (1668 cm^{-1}).



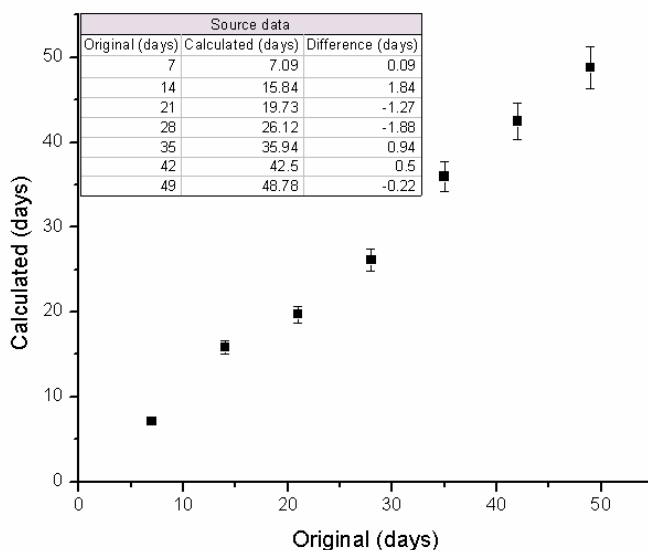
Obr. 15 Spektrum vnitřní a povrchové analýzy tvarůžků měřené u nezralého sýra

Rozdíly ve zralosti sýra jsou patrné také na Obr. 16, kde jsou porovnána spektra povrchu vzorku ze „dne 0“ s povrchem vzorku v „den 49“. Charakteristické pásy C-S vazeb (646 cm^{-1} a 635 cm^{-1}), pásy vazeb aromát-S a C-N, respektive C=N jsou ve spektru nezralého sýra mnohem méně výrazné a v průběhu zrání produktu se intenzity uvedených pásů zvyšují. Tyto změny značí, že během zrání tvarůžků docházelo k postupné degradaci aminokyselin. Toto zjištění koresponduje s výsledky HS-SPME-GC/MS analýzy, při které byly identifikovány sírné sloučeniny methanethiol, dimethyl disulfid, dimethyl trisulfid a dimethyl tetrasulfid, jakožto produkty rozkladu sírných aminokyselin.



Obr. 16 Spektrum povrchové analýzy tvarůžků, porovnání „Dne 0“ a „Dne 49“

Na základě výše uvedených zjištění byla navržena metoda pro studium zrání tvarůžků. Tato metoda je založena na studiu závislosti intenzity pásů C-S vazeb ve spektrální oblasti $620\text{--}646\text{ cm}^{-1}$ (charakteristické pro zrání) na stáří produktu. Studium bylo provedeno pro různě zralé sýry v intervalu 0 až 49 dnů. K evaluaci naměřených dat byla použita metoda částečných nejmenších čtverců (PLS), která umožňuje nalézt vztah mezi spektrální informací a složením vzorků. V tomto případě jsou navzájem korelovány čas zrání a vybraná část spektra. Z výsledku provedené analýzy (obr. 17) je patrné, že závislost predikovaného stáří produktu souhlasí s reálným stářím produktu. Chyba predikce stáří tvarůžků na základě PLS metody je menší než 1,88 dne.



Obr. 17 Závislosti intenzity pásů C-S vazeb na stáří produktu

Navržená metoda poskytuje cenné výsledky a lze ji využít pro budoucí studium zrání tvarůžků nebo sýrů s podobnou charakteristikou. Pro zpřesnění výsledků je nutné i nadále usilovat o optimalizaci parametrů PLS metody i její následné využití u většího počtu vzorků tak, aby mohla být metoda plně validována a mohla být potenciálně využita v potravinářské praxi.

5.6 Analýza aromatických složek kávy

Metodou HS-SPME-GC/MS byly u vzorků mletých káv (16 vzorků kávy druhu Arabika – A; 3 vzorky kávy druhu Robusta – R; 11 vzorků směsné kávy druhů Arabika/Robusta – AR) analyzovány složky aroma a bylo identifikováno 15 hlavních sensoricky významných látek: kyselina octová, 1-hydroxypropan-2-on, pyrazin, pyridin, 2-methylpyrazin, furfural, furfuryl alkohol, ethan-1,2-diol diacetát, 2,6-dimethylpyrazin, 2-ethylpyrazin, 5-methylfurfural, furfuryl acetát, 2-ethyl-6-methylpyrazin, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazin a 1-furfurylpyrol. Relativní zastoupení aromatických látek v jednotlivých vzorcích káv je uvedeno v tab. 11.

Tab. 11 Obsah vybraných aromatických látek v druhových kávách

Káva ^a	Vybrané aromatické látky ^b														
	kyselina octová (1)	1-hydroxypropan-2-on	pyrazin	pyridin	2-methylpyrazin (2)	furfural (3)	furfuryl alcohol (4)	ethan-1,2-diol diacetát	2,6-dimethylpyrazin (5)	2-ethylpyrazin	5-methylfurfural (6)	furfuryl acetát	2-ethyl-6-methylpyrazin	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazin	1-furfurylpyrol
R1	4,8	172,4	121,7	598,8	973,4	335,3	1530,6	121,4	707,8	229,3	320,2	367,9	244,6	15,6	49,4
R2	6,4	177,9	157,1	853,8	801,1	259,6	1520,1	113,6	533,2	173,8	170,2	290,4	174,4	98,8	52,6
R3	8,2	207,1	147,6	535,9	975,5	412,8	1273,3	156,7	685,8	213,5	449,6	285,1	236,5	180,0	52,6
A1	832,4	174,9	72,4	496,6	910,3	451,7	1770,0	313,5	579,9	173,5	620,0	481,8	201,6	104,5	36,9
A2	1155,1	256,6	24,3	94,5	358,4	1195,7	1699,2	152,9	396,1	137,5	792,9	206,4	124,1	73,1	26,0
A3	1783,5	203,8	10,8	73,6	135,5	722,2	1682,6	107,2	41,6	22,6	378,2	97,3	4,5	3,2	12,6
A4	862,7	213,0	72,0	533,9	603,7	1011,1	1757,1	192,3	434,8	115,7	589,8	353,3	119,5	86,7	22,9
A5	1341,0	328,2	74,7	307,5	660,2	1634,5	1226,7	178,5	484,8	122,3	1193,8	231,1	115,4	58,9	27,5
A6	1455,1	353,5	59,5	242,7	603,4	1641,9	1365,5	nd	478,5	159,6	955,0	219,6	124,6	61,5	28,0
A7	1142,2	195,8	33,3	297,1	382,7	897,9	1300,0	194,7	355,3	153,5	793,7	367,4	85,1	20,8	24,6
A8	1325,3	334,0	14,6	136,1	327,9	858,1	1229,2	194,4	275,7	44,6	624,1	176,9	55,8	22,2	14,9
A9	762,7	178,6	50,0	425,7	584,5	554,1	1003,2	198,9	497,3	163,4	672,4	369,0	98,6	44,1	31,5
A10	1305,0	279,2	44,3	361,9	479,6	1295,8	1875,6	196,4	414,2	90,4	804,7	344,3	95,0	58,8	22,8
A11	1442,1	300,9	27,4	114,6	420,8	1911,6	1258,4	156,7	396,2	121,8	1156,2	185,5	89,5	47,3	12,2
A12	1208,7	226,7	39,0	211,5	107,8	1517,3	2236,9	213,0	422,4	11,0	991,8	327,0	107,1	63,9	12,8
A13	1237,9	252,9	35,3	297,5	390,3	1295,4	2038,3	213,2	310,9	103,6	1027,0	279,8	107,5	36,8	27,2
A14	1496,7	289,8	32,0	208,0	302,1	1733,5	1925,6	207,8	310,9	103,6	1027,0	279,8	82,2	27,0	30,9
A15	1352,0	250,7	21,2	236,8	320,1	1365,5	1876,6	216,8	349,4	36,0	940,4	300,7	91,0	42,3	29,7
A16	343,5	66,9	15,3	118,5	190,9	558,2	573,3	8,5	168,1	38,1	388,1	102,4	23,7	11,9	nd
AR1	1106,4	375,6	127,4	218,0	886,8	1140,3	1414,0	163,7	560,9	2,0	853,7	178,9	135,4	72,8	30,6
AR2	1103,6	370,8	201,3	244,1	1197,4	1364,7	1642,1	204,2	526,2	191,4	747,5	171,8	157,1	125,1	44,2
AR3	1124,9	217,9	66,2	322,1	489,9	464,1	1294,9	172,3	359,9	148,2	385,6	267,9	112,2	55,1	28,8
AR4	601,7	170,7	107,1	423,7	691,1	240,0	769,5	12,9	488,9	204,7	263,3	236,5	170,6	71,1	29,9
AR5	1301,7	270,2	7,4	190,0	516,3	1522,1	896,0	163,0	456,9	187,5	939,3	191,1	135,6	43,9	23,9
AR6	975,9	282,2	109,1	158,2	859,0	669,3	985,5	153,5	588,9	240,0	520,2	128,7	149,2	66,0	22,2
AR7	1083,1	269,0	95,5	188,3	722,6	901,2	1025,4	147,6	519,2	192,8	804,1	151,0	135,1	68,9	26,9
AR8	389,6	167,0	73,5	374,2	644,5	393,4	865,9	118,5	489,8	191,7	362,8	232,0	133,7	73,3	14,6
AR9	1266,1	312,1	31,4	162,8	447,0	1554,2	874,1	93,4	409,0	137,3	872,4	174,4	93,7	34,2	9,4
AR10	1099,2	236,9	76,8	267,7	612,3	463,7	1649,9	183,9	471,9	82,2	558,0	299,1	123,3	71,1	50,0
AR11	322,9	67,2	6,5	149,5	215,2	463,5	543,3	17,4	200,2	57,9	357,9	116,4	7,4	11,1	8,8

^a Kávy druhu Robusta (R), Arabika (A), směsi Arabika/Robusta (AR)

^b Plochy píků vybraných aromatických látek v relativních jednotkách ($\times 10^4$)

nd - nedetekováno

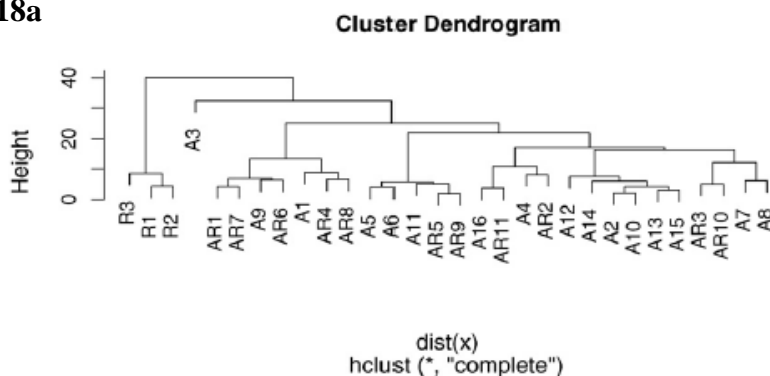
Získaná matice dat byla podrobena statistickému zkoumání metodou PCA. Analýzou datového souboru byl sledován vliv jednotlivých proměnných na vysvětlení celkové variability datového souboru. Postupně byl zužován soubor proměnných. Ze skupiny potenciálních markerů byly postupně vyřazeny látky, které neměly výrazný vliv na celkovou variabilitu a rozlišení objektů v biplotu. Postupné zužování datového souboru vedlo k identifikaci šesti sensoricky významných látek, které byly vybrány pro následné statistické hodnocení jako potenciální markery: kyselina octová (1), 2-methylpyrazin (2), furfural (3), 2-furfuryl alkohol (4), 2,6-dimethylpyrazin (5), 5-methylfurfural (6). Vybrané aromatické látky tvoří majoritní podíl (přes 80 %) z celkového zastoupení identifikovaných látek u vzorků káv. Ve vědeckých publikacích, které jsou věnovány problematice aromatického profilu káv, byly tyto látky již prezentovány v širší skupině látek jako sensoricky významné markery charakterizující odrůdy káv a jejich geografický původ^{284,283}. Je tedy pravděpodobné, že právě tyto látky jsou klíčovými sensorickými složkami aroma kávy.

Pro statistické zpracování a interpretaci dat byla použita shluková analýza a analýza hlavních komponent v jejich klasickém provedení. Metody byly aplikovány na původní (tj. netransformovaná) vstupní data a data zpracovaná pomocí *clr* transformace. Výsledky metody shlukové analýzy (hierarchické shlukování s využitím tzv. aglomerativní metody nejbližšího souseda) jsou znázorněny formou dendrogramu (obr. 18a,b). Na obr. 18a jsou uvedeny výsledky pro netransformovaná data a na obr. 18b data upravená pomocí *clr* transformace. Aplikace standardní shlukové analýzy umožnila oddělení skupiny vzorků káv druhu Robusta od ostatních vzorků, ale nepodařilo se vzájemně uspořádat skupiny vzorků káv A a AR do odpovídajících skupin a není tedy možné tyto kávy dostatečně rozlišit. Použití standardní statistické metody je do jisté míry zatíženo chybou v datech (vlivem malých nebo odlehlých hodnot), proto byla na data aplikována *clr* transformace. Po aplikaci *clr* transformace na matici dat došlo ke zlepšení vizualizace výsledků shlukové analýzy. Vzorky káv jsou klasifikovány do tří hlavních skupin podle jejich původu (Arabika, Robusta a směsné kávy). Pouze několik vzorků se nepodařilo rozřadit do příslušných skupin. Jedná se o vzorky A1, A4 a A9, které zasahují do skupiny směsných káv AR, a vzorky AR5, AR9 a AR11, které nejsou odlišeny od káv Arabika. Toto nedostatečné rozdělení skupin káv je možné přisuzovat neznámému složení směsných káv (poměru kávy Arabika a Robusta), různému původu kávy a její kvalitě. Významný vliv na sensorické vlastnosti a chemické složení má také proces zpracování kávy^{224,240-243}. Vzorky kávy A16 a AR11, které pochází od

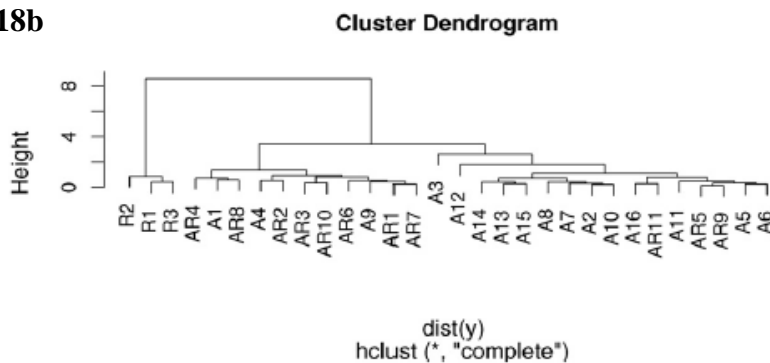
stejného výrobce, jsou v dendrogramu seskupeny. Shluková analýza tedy dokázala odhalit vzájemně podobné znaky káv. To potvrzuje skutečnost, že aromatický profil kávy je do velké míry ovlivněn nejen původem kávy, ale také technologií její výroby.

Metoda analýzy hlavních komponent byla aplikována pro odhalení vzájemných podobností či rozdílností v aromatického profilu káv a pro určení vzájemného vztahu mezi uvedenými aromatickými látkami a jednotlivými vzorky káv. Výsledky PCA jsou prezentovány formou biplotu²⁶⁰ na obr. 18. Standardní PCA se podařilo vstupní matici dat o šesti analytických proměnných a 30-ti pozorováních popsat dvěma hlavními komponentami, kde první komponenta (PC1) popisuje 61,43 % a druhá komponenta (PC2) 22,85 % celkového rozptylu (celkem 84,28 %). Tyto výsledky analýzy netransformovaných dat neposkytují dostatečné rozlišení datového souboru. Stejně jako u shlukové analýzy jsou vzorky káv Robusta odděleny od káv A a AR, ale tyto skupiny vzorků se již nepodařilo pomocí standardní PCA vzájemně rozdělit.

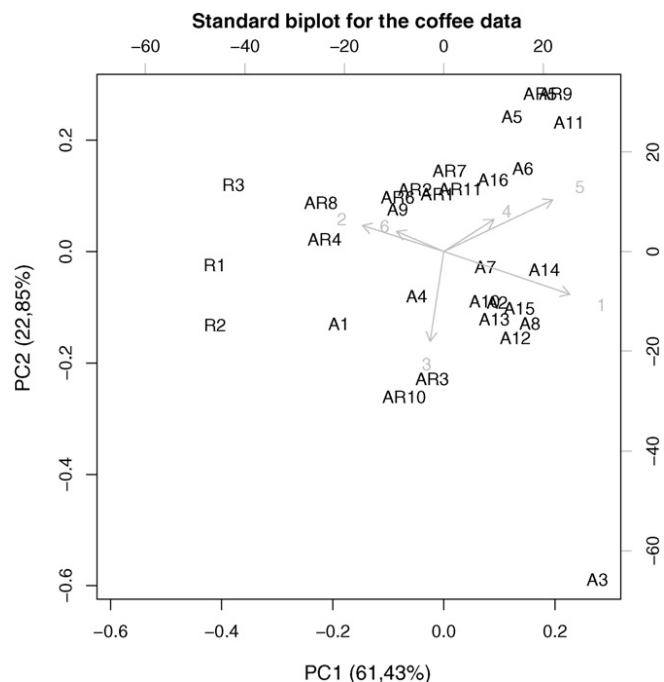
Obr. 18a



Obr. 18b



Obr. 6a,b Shluková analýza pro netransformovaná data (obr. 6a) a pro transformovaná data (obr. 6b) vzorků káv (A – Arabika, R – Robusta, AR – směsná káva Arabika/Robusta)

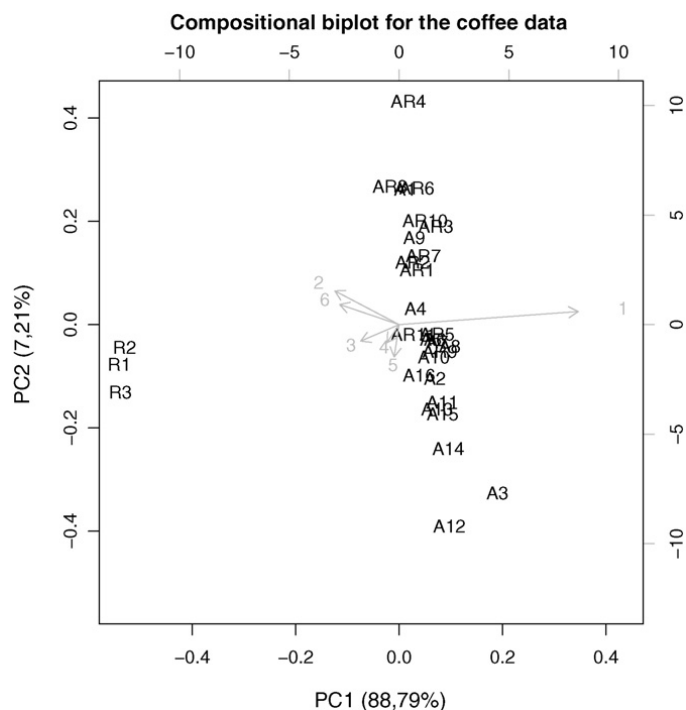


Obr. 19 PCA analýza pro netransformovaná data vzorků káv. Kyselina octová (1), 2-methylpyrazin (2), furfural (3), 2-furfuryl alkohol (4), 2,6-dimethylpyrazin (5), 5-methylfurfural (6); A-Arabika, R-Robusta, AR-směsná káva Arabika/Robusta.

V případě transformovaných dat jsou výsledky PCA prezentovány formou kompozičního biplotu²⁶³ (obr. 20), který je popsán dvěma hlavními komponentami. Tyto hlavní komponenty zaujímají dokonce 96,01 % z celkové variability, kde PC1 popisuje 88,79 % variance v transformovaných datech a PC2 7,21 % variance. Kompoziční biplot zobrazuje velmi dobré rozdělení skupin káv s patrným vlivem kyseliny octové, která s velkou mírou určuje oddělení káv Robusta od ostatních vzorků podle PC1. Ostatní zátěže ukazují navzájem do jisté míry konstantní podíl, tj. vzdálenosti mezi konci šipek (studované proměnné) jsou konstantní.

K významné změně u *clr* transformovaných dat došlo při rozdělení skupiny káv Arabika od směsí káv AR. Tyto dvě skupiny káv jsou rozděleny podle PC2 jako ohraničené skupiny s částečně se překrývajícími vzorky, které vzájemně zasahují do druhé skupiny. Jedná se opět o vzorky káv A1, A4, A9 a AR5, AR9, AR11, které nebyly dostatečně odděleny metodou shlukové analýzy aplikovanou na *clr* transformovaná data (obr. 18b). Vzhledem k dosaženému rozlišení obou souborů dat podle PC2 je možné tuto hlavní komponentu označit jako „ukazatel kvality kávy“. Relevantnost výsledků použité metody je podpořena

vysokou hodnotou popsané variability souboru dat (96 %) s použitím již prvních dvou hlavních komponent.



Obr. 20 PCA analýza pro transformovaná data vzorků káv. Kyselina octová (1), 2-methylpyrazin (2), furfural (3), 2-furfuryl alkohol (4), 2,6-dimethylpyrazin (5), 5-methylfurfural (6); A-Arabika, R-Robusta, AR-směsná káva Arabika/Robusta.

Metoda hlavních komponent aplikovaná na *clr* transformovaná data umožnila rozlišit soubor 30-ti káv na základě šesti identifikovaných aromaticky aktivních látek (kyselina octová, 2-methylpyrazin, furfural, 2-furfurylalkohol, 2,6-dimethylpyrazin, 5-methylfurfural). Tyto látky lze považovat za určité markery studovaných odrůdových káv. Navržená metoda také odhalila vzájemné podobnosti u káv pocházejících od stejného výrobce.

6 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce je věnována analýze markerů v potravinách a využití vícerozměrných statistických technik pro jejich identifikaci. Pro statistické hodnocení dat byly aplikovány tzv. logratio transformace a použita analýza hlavních komponent (PCA).

Pro studium a charakterizaci aromatických látek odrůdových vinných destilátů byla na datovou matici aplikována *clr* transformace a metoda hlavních komponent. Bylo identifikováno 10 hlavních terpenických aromatických látek, které přispívají k odrůdovému aroma destilátů. Pomocí PCA byly nalezeny vzájemné podobnosti v odrůdovém aroma vinných destilátů a bylo zjištěno, že odrůdové aroma destilátů Merlot, Frankovka a jejich příbuzných odrůd ovlivňují terpenoidy (*Z*)-linalool oxid, linalool, isoborneol, terpinen-4-ol a α -terpineol, zatímco na aroma destilátů Rulandské modré, Modrý Portugal a Cabernet Sauvignon mají vliv spíše *o*-cymen, limonen, (*E*)-sabinyl acetát a (*E*)-kalamenen.

Studium terpenického složení moravských destilátů typu grapa bylo provedeno metodou mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání (HS-SPME) a v provedení přímého ponoření vlákna do roztoku (DI-SPME). Metodou SPME-GC/MS bylo identifikováno celkem 61 terpenických látek. Hlavní identifikované terpenické látky jsou limonen, linalool, α -ylangen, β -bourbonen, γ -kadinen, (*E*)-nerolidol, 2,3-dihydrofarnesol a (*2Z,6E*)-farnesol. DI-SPME se ukázala být vhodnou a srovnatelnou metodou pro analýzu monoterpenických a norizoprenoidních látek a umožnila také identifikovat některé sesquiterpenické látky, které nebylo možné stanovit pomocí HS-SPME (např. α -barbaten a další sesquiterpenické látky s vyšší retencí). Metodou SPME byly zjištěny prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými druhy destilátů. Zatímco u vinných destilátů byly identifikovány převážně monoterpenické látky, u destilátů typu grapa byla identifikována také obsáhlá skupina sesquiterpenických látek.

Aromatické složky českých a zahraničních chmelů byly analyzovány metodou HS-SPME. Jako určité kvalitativní markery chmelů byly identifikovány β -farnesen (pro Žatecký poloraný červeňák) a α -selinen (pro německou odrůdu Hallertau Taurus). Studium složek chmelové silice v pivech české a zahraniční výroby za účelem charakterizace použitých surovin bylo realizováno také HS-SPME metodou. Celkem bylo identifikováno 15 terpenických látek: β -myrcen, limonen, linalool, methyl geranát, citronellyl acetát, β -damascenon, (*E*)-karyofyllen, α -humulen, β -farnesen, γ -muurolen, valence, (*Z*)-kalamenen,

δ -selinen, α -kadinen a α -kalakoren. Bylo zjištěno, že jejich obsah v pivech do jisté míry souvisí s použitým chmelem i technologií výroby, např. α -kadinen byl identifikován pouze u tmavých a polotmavých piv, β -farnesen jako kvalitativní marker Žateckého poloraného Červeňáku byl identifikován u všech českých piv v poměrně velké variabilitě.

Pro studium fenolických kyselin v českých vínech byla aplikována *clr* a *ilr* transformace dat a porovnána klasická PCA s robustní variantou PCA. Po aplikaci robustní metody bylo dosaženo nejlépe interpretovatelných výsledků a podařilo se rozlišit vzorky vín podle příslušných kategorií. Kyselina vanilová, syringová a gallová byly identifikovány jako významné markery červených vín. Kyselina gentisová a kávová byly navrženy jako perspektivní markery, které do jisté míry odrážejí technologický způsob zpracování vína.

Studium aromatického profilu Olomouckých tvarůžků bylo realizováno metodou HS-SPME-GC/MS. U nezralých tvarůžky byla identifikována skupina esterů, které můžeme považovat za markery čerstvosti sýra, a skupina terpenických látek, které do jisté míry poukazují na kvalitu použitých surovin. Při zrání sýra docházelo ke vzniku dalších sensoricky významných látek (propan-2-ol, butan-2-ol, dimethyldisulfid), které můžeme pokládat za markery vhodné konzumní doby tvarůžků. Pro studium zrání tvarůžků byla aplikována také Ramanova spektrometrie a byly identifikovány charakteristické pásy vibrací, jejichž intenzita narůstala se stupněm zralosti sýra. Tyto vibrační pásy odpovídají charakteristickým vitracím C-S, C=S a C=N vazeb.

Pro studium aromatického profilu druhových káv byla aplikována *clr* transformace a analýza hlavních komponent. Bylo identifikováno šest aromaticky aktivních látek (kyselina octová, 2-methylpyrazin, furfural, 2-furfurylalkohol, 2,6-dimethylpyrazin, 5-methylfurfural), na jejichž základě bylo možné rozdělit soubor 30-ti káv podle převládajícího druhu kávy. Použitím *clr* transformace se podařilo dosáhnout lépe interpretovatelných výsledků a již za pomoci prvních dvou hlavních komponent popsat 96% celkové variability souboru dat. Navržená metoda odhalila také vzájemné podobnosti u káv pocházejících od stejného výrobce.

7 LITERATURA

1. Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr. A* 891, 1 (2000).
2. Sorensen H., Sorensen S., Bjerregaard C., Michaelsen S.: *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry, Norwich, 1998.
3. Aparicio R., Aparicio-Ruiz R.: *J. Chromatogr. A* 881, 93 (2000).
4. Hajslova J., Cajka T.: Gas chromatography in food analysis. V knize: Ötles S. (ed.): *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008.
5. Dickes G. J.: *Talanta* 26, 1065 (1979).
6. Holley K., Pennington M., Phillips P.: *Nutr. Food Sci.* 95, 10 (1995).
7. Van De Weerdhof T., Wiersum M. L., Reissenweber H.: *J. Chromatogr. A* 83, 455 (1973).
8. Nollet L. M. L.: *Food analysis by HPLC*. Marcel Dekker Inc., New York, 2000.
9. Dong Y.: *Trends Food Sci. Tech.* 10, 87 (1999).
10. Kvasnička F.: *Electrophoresis* 21, 2780 (2000).
11. Simó C., Barbes C., Cifuentes A.: *Electrophoresis* 26, 1306 (2005).
12. Careri M., Bianchi F., Corradini C.: *J. Chromatogr. A* 970, 3 (2002).
13. Cajka T., Hajslova J., Mastovska K.: Mass spectrometry and hyphenated instruments in food analysis. V knize: Ötles S. (ed.): *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008.
14. Reid L. M., O'Donnell C. P., Downey G.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 344 (2006).
15. Grosch W.: *Chem. Senses* 26, 533 (2001).
16. Careri M., Mangia A.: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Flavor and Fragrances. V knize: Niessen W. M. A. (ed.): *Current Practice in Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker, New York, 2001.
17. Pais P., Knize M. G.: *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 747, 139 (2000).
18. Wilkes J. G., Conte E. D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J. B., Miller D. W.: *J. Chromatogr. A* 880, 3 (2000).
19. Halket J. M., Zaikin V. G.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 1 (2003).
20. Zaikin V. G., Halket J. M.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 421 (2003).
21. Halket J. M., Zaikin V. G.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 10, 1 (2004).

22. Mawhinney T. P., Robinett R. S., Atalay A., Madson M. A.: *J. Chromatogr.* 358, 231 (1986).
23. Yang Y. J., Choi M. H., Paik M. J., Yoon H. R., Chung B. Ch.: *J. Chromatogr. B* 742, 37 (2000).
24. Marriott R. J., Shellie R., Cornwell C.: *J. Chromatogr. A* 936, 1 (2001).
25. Lercker G., Rodriguez-Estrada M. T.: *J. Chromatogr. A* 881, 105 (2000).
26. Cajka T., Vaclavik L., Riddellova K., Hajslova J.: *LC GC Europe* 21, 250 (2008).
27. Guillén D. A., Merello F., Barroso C. G., Pérez-Bustamante J. A.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 403 (1997).
28. Naczek M., Shahidi F.: *J. Chromatogr. A* 1054, 95 (2004).
29. Lazarus S. A., Adamson G. E., Hammerstone J. F., Schmitz H. H.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 3693 (1999).
30. Shui G. H., Leong L. P.: *J. Chromatogr. A* 977, 89 (2002).
31. Rittinghaus K., Franzen K.-H.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 301, 144 (1980).
32. Gübitz G., Schmid M. G.: *Electrophoresis* 21, 4112 (2000).
33. Kraly J., Fazal M. A., Schoenherr R. M., Bonn R., M. Harwood M., Turner E., Jones M., Dovichi N. J.: *Anal. Chem.* 78, 4097 (2006).
34. Frazier R. A., Inns E. L., Dossi N., Ames J. M., Nursten H. E.: *J. Chromatogr. A* 876, 213 (2000).
35. Hjalmarsson S.-G., Everaerts F. M.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 11, 261 (1981).
36. Blatný P., Kvasnička F.: *J. Chromatogr. A* 834, 419 (1999).
37. Pillonel L., Bosset J. O., Tabacchi R.: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 35, 1 (2002).
38. Turner C.: *Modern extraction techniques: food and agricultural samples*. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, 2006.
39. Buldini P. L., Ricci L., Sharma J. L.: *J. Chromatogr. A* 975, 47 (2002).
40. Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G., Rakesh D. D.: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, Trieste, 2008.
41. Tešević V., Nikicevic N., Jovanovic A., Djokovic D., Vujisic L., Vuckovic I., Bonic M.: *Food Technol. Biotechnol.* 43, 367 (2005).
42. Castro R., Natera R., Durán E., García-Barroso C.: *Eur. Food Res. Technol.* 228, 1 (2008).

43. López R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V.: *J. Chromatogr. A* 966, 167 (2002).
44. Dominico A. Guillén, Merello F., Barroso C. G., Pérez-Bustamante J. A.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 403 (1997).
45. Lukić I., Banović M., Peršurić D., Radeka S., Sladonja B.: *J. Chromatogr. A* 1101, 238 (2006).
46. Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J.: *J. Chromatogr. A* 880, 35 (2000).
47. Korhoňová M., Hejdová R., Čáp L., Barták P.: *Chem. Listy* 101, 217 (2007).
48. Korhoňová M., Hron K., Klimčíková D., Müller L., Bednář P., Barták P.: *Talanta* 80, 710 (2009).
49. Balasubramanian S., Panigrahi S.: *Food Bioprocess. Technol.* 4, 1 (2011).
50. Cuevas-Glory L. F., Pino J. A., Santiago L. S., Sauri-Duch E.: *Food Chem.* 103, 1032 (2007).
51. Silva G. A. d., Augusto F., Poppi R. J.: *Food Chem.* 111, 1057 (2008).
52. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89, kterým se stanoví obecná pravidla pro definici, označování a obchodní úpravu lihovin.
53. Rodrigues F., Caldeira M., Câmara J. S.: *Anal. Chim. Acta* 609, 82 (2008).
54. Arrhenius S. P., McCloskey L., Sylvan M.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 1085 (1996).
55. Ferreira V., Lopez R., Cacho J.F.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1659 (2000).
56. Rapp A.: *Nahrung* 42, 351 (1998).
57. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C.: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York, 2008.
58. Baumes R., Aubert C., Günata Z., De Moor W., Bayonove C.: *J. Essent. Oil. Res.* 6, 587 (1994).
59. Cox A., Skouroumounis G. K., Elsey G. M., Perkins M. V., Sefton M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 6777 (2005).
60. Günata Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R.: *J. Sci. Food Agric.* 36, 857 (1985).
61. Günata Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R.: *J. Chromatogr.* 9, 83 (1985).
62. Coelho E., Rocha S. M., Delgadillo I., Coimbra M. A.: *Anal. Chim. Acta* 563, 204 (2006).
63. Schreier P., Drawert F., Junker A.: *J. Agric. Food Chem.* 24, 331 (1976).

64. Nasi A, Ferranti P., Amato S., Chianese L.: *Food Chem.* 110, 762 (2008).
65. Flamini R.: *J. Mass Spectrom.* 40, 705 (2005).
66. Sánchez-Palomo E., Díaz-Maroto M. C., Pérez-Coello M. S.: *Talanta* 66, 1152 (2005).
67. Mathieu S., Terrier N., Procureur J., Bigey F., Günata Z.: *J. Exp. Bot.* 56, 2721 (2005).
68. Baumes R., Wirth J., Bureau S., Günata Z., Razungles A.: *Anal. Chim. Acta* 458, 3 (2002).
69. Enzell C.: *Pure Appl. Chem.* 57, 693 (1985).
70. Kotseridis Y., Baumes R., Skouroumounis G. K.: *J. Chromatogr. A* 824, 71 (1998).
71. Silva Ferreira A., Guedes de Pinho P.: *Anal. Chim. Acta* 513, 169 (2004).
72. Kanasawud P., Crouzet J. C.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 237 (1990).
73. Bonnländer B., Baderschneider B., Messerer M., Winterhalter P.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 1474 (1998).
74. Janusz A., Capone D. L., Puglisi C. J., Perkins M. V., Elsey G. M., Sefton M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 7759 (2003).
75. Kotseridis Y., Baumes R., Skouroumounis G. K.: *J. Chromatogr. A* 849, 245 (1999).
76. Winterhalter P., Skouroumounis G. K.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55, 73 (1997).
77. Lukić I., Milicević B., Banović M., Tomas S., Radeka S., Persurić D.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 7351 (2010).
78. Lopez R., Ferreira V., Hernandez P., Cacho J. F.: *J. Sci. Food Agric.* 79, 1461 (1999).
79. Kotseridis Y., Baumes R.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 400 (2000).
80. Roufet M., Bayonove C., Cordonnier R.: *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 59 (1986).
81. Chatonnet P., Dubourdiou D., Boidron J. N., Lavigne V.: *J. Sci. Food Agric.* 62, 191 (1993).
82. Dugelay I., Günata Z., Sapis J. C., Baumes R., Bayonove C.: *J. Agric. Food Chem.* 41, 2092 (1993).
83. Voirin S. G., Baumes R., Sapis J. C., Bayonove C. L.: *J. Chromatogr.* 595, 269 (1992).
84. Günata Y. Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier C.: *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 112 (1986).
85. Maicas S., Mateo J. J.: *Appl. Microbiol. Biot.* 67, 322 (2005).
86. Ugliano M., Moio L.: *Anal. Chim. Acta* 621, 79 (2008).
87. Voirin S., Baumes R., Bitteur S., Günata Z., Bayonove C. L.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 1373 (1990).

88. Farina L., Boido E., Carrau F., Versini G., Dellacassa E.: *J. Agric. Food Chem.* *53*, 1633 (2005).
89. Francis I. L., Sefton M. A., Williams P. J.: *J. Sci. Food Agric.* *59*, 511 (1992).
90. Guth H.: *J. Agric. Food Chem.* *45*, 3027 (1997).
91. Marais S.: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* *4*, 49 (1983).
92. Herrmann A.: *The chemistry and biology of volatiles*. Wiley & Sons, New York, 2010.
93. Schreier P., Drawert F., Junker A.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* *160*, 271 (1976).
94. Salinas M., Zalacain A., Pardo F., Alonso G. L.: *J. Agric. Food Chem.* *52*, 4821 (2004).
95. López R., Ezpeleta E., Sánchez I., Cacho J., Ferreira V.: *Food Chem.* *88*, 95 (2004).
96. Parker M., Pollnitz A. P., Cozzolino D., Francis I. L., Herderich M. J.: *J. Agric. Food Chem.* *55*, 5948 (2007).
97. Wood C., Siebert T. E., Parker M., Capone D. L., Elsey G. M., Pollnitz A. P., Eggers M., Meier M., Vossing T., Widder S., Krammer G., Sefton M. A., Herderich M. J.: *J. Agric. Food Chem.* *56*, 3738 (2008).
98. Câmara J. S., Herbert P., Marques J. C., Alves M. A.: *Anal. Chim. Acta* *513*, 203 (2004).
99. Alves R. F., Nascimento A. M. D., Nogueira J. M. F., *Anal. Chim. Acta* *546*, 11 (2005).
100. Versini G., Rapp A., Serra A. D., Pichler U., Ramponi M.: *Vitis* *33*, 139 (1994).
101. Buescher W. A., Siler C. E., Morris J. R., Threlfall R. T., Main G. L., Cone G. C.: *Am. J. Enol. Vitic.* *52*, 345 (2001).
102. Guidici P., Zambonelli C., Kunkee R. E.: *Am. J. Enol. Vitic.* *44*, 123 (1993).
103. Guidici P., Romano P., Zambonelli C.: *Can. J. Microbiol.* *36*, 61 (1990).
104. Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E.: *Principles and practice of winemaking*. Chapman Hall, New York, 1995.
105. Rapp A., Mandery H.: *Experientia* *42*, 873 (1986).
106. Nykänen L., Nykänen I.: *J. Inst. Brew.* *83*, 30 (1977).
107. Fleet G. H.: *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, 1993.
108. Gallender J. F., Peng A. C.: *Am. J. Enol. Vitic.* *31*, 24 (1980).
109. Lambrechts M. G., Pretorius I. S.: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* *21*, 97 (2000).
110. Engan S.: *Brew. Dig.* *49*, 40 (1974).
111. Peddie H. A. B.: *J. Inst. Brew.* *96*, 327 (1990).

112. Fujii T., Nagasawa N., Iwamatsu A., Bogaki T., Tamai Y., Hamachi M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 2796 (1994).
113. Solo P.: *J. Food Sci.* 35, 95 (1970).
114. Solo P.: *J. Sci. Food Agric.* 21, 597 (1970).
115. Simpson R. F., Miller G. C.: *Vitis* 23, 143 (1984).
116. Thurston P. A., Tailor R., Ahvenainen J.: *J. Inst. Brew.* 87, 92 (1981).
117. Marais J.: *Food Rev.* 17, 18 (1990).
118. Nykänen L. L., Nykänen I., Suomalainen H.: *J. Inst. Brew.* 83, 32 (1977).
119. Madrera R. R., Gomis D. B., Alonso J. J. M.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 7969 (2003).
120. González-Viñas M. A., Pérez-Coello M. S., Salvador M. D., Cabezudo M. D., Martín-Álvarez P. J.: *Food Chem.* 56, 399 (1996).
121. Singleton V. L.: *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 98 (1995).
122. Pérez Prieto L. J., López Roca J. M., Martínez Cutillas A., Pardo Mínguez F., Gómez Plaza E.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 3272 (2002).
123. Sefton M. A., Francis I. L., Pocock K. F., Williams P. J.: *Sci. Aliments* 13, 629 (1993).
124. Doussot F., de Jeso B., Quideau S., Pardon P.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5955 (2002).
125. Mosedale J. R., Ford A.: *J. Scic. Food Agric.* 70, 273 (1996).
126. Chatonnet P., Dubourdieu D.: *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 79 (1998).
127. Pérez-Coello M. S., Sanz J., Cabezudo M. D.: *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 162 (1999).
128. Fernández de Simón B., Cadahía E., Jalocha J.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 7671 (2003).
129. Mosedale J. R., Puech J.-L.: *Trends Food Sci. Tech.* 9, 95 (1998).
130. Lehtonen M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66, 62 (1983).
131. Berger R. G.: *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability.* Springer, Hannover, 2007.
132. Spillman P. J., Pollnitz A. P., Liacopoulos D., Pardon K. H., Sefton M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 657 (1998).
133. Alexandre J. L., Padilla A. I., Navarro L. L., Saira A., García M. J., Álvarez I.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1889 (2003).
134. Herjavec S., Jeromel A., Da Silva A., Orlic S., Redzepovic S.: *Food Chem.* 100, 124 (2007).
135. Pérez Prieto L. J., López Roca J. M., Martínez Cutillas A., Pardo Mínguez F., Gómez Plaza E.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 5444 (2003).

136. Gómez-Plaza E., Pérez-Prieto L. J., Fernández-Fernández J. I., López-Roca J. M.: *Int. J. Food Sci. Technol.* *39*, 1069 (2004).
137. Garde Cerdán T., Ancín-Azpilicueta C.: *Lebens. Wissen. Technol.* *39*, 199 (2006).
138. Ramírez Ramírez G., Lubbers S., Charpentier C., Feuillat M., Voilley A., Chassagne D.: *J. Agric. Food Chem.* *49*, 3893 (2001).
139. Jiménez Moreno N., Ancín Azpilicueta C.: *Lebens. Wissen. Technol.* *40*, 619 (2007).
140. Meilgaard M. C.: *J. Agric. Food Chem.* *30*, 1009 (1982).
141. Vera L., Aceña L., Guasch J., Boqué R., Mestres M., Busto O.: *Anal. Bioanal. Chem.* *399*, 2073 (2011).
142. Sharpe F. R., Laws D. R. J.: *J. Inst. Brew.* *87*, 96 (1981).
143. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin II.*, 3.vydání. Osis, Tábor 2009.
144. Cortacero-Ramírez S., Hernáinz-Bermúdez de Castro M., Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Fernández-Gutiérrez A.: *Trends Anal. Chem.* *22*, 440 (2003).
145. Mozny M., Tolasz R., Nekovar J., Sparks T., Trnka M., Zalud Z.: *Agr. Forest Meteorol.* *149*, 913 (2009).
146. Steinaus M., Schieberle P.: *J. Agric. Food Chem.* *48*, 1776 (2000).
147. Field J. A., Nickerson G., James D. D., Heider C.: *J. Agric. Food Chem.* *44*, 1768 (1996).
148. http://www.zateckychmel.eu/index_cz.html (6. 7. 2011).
149. Jelínek L., Šneberger M., Karabín M., Dostálek P.: *Czech J. Food Sci.* *28*, 309 (2010).
150. Briggs D. E., Boulton C. A, Brookes P. A., Stevens R.: *Brewing Science and Practice*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge, 2005.
151. Lermisieu G., Collin S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* *59*, 39 (2001).
152. Nance M. R., Setzer W. N.: *J. Brew. Distilling* *2*, 16 (2011).
153. Olaniran A. O., Maharaj Y. R., Pillay B.: *Electron. J. Biotechnol.* *14*, 1 (2011).
154. Romano P., Suzzi G., Comi G., Zironi R.: *J. Appl. Bacteriol.* *73*, 126 (1992).
155. Willaert R., Nedovic V. A.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *81*, 1353 (2006).
156. Meilgaard M. C.: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* *12*, 107 (1975).
157. Jeleń H. H., Wlazły K., Waüsowicz E., Kamiński E.: *J. Agric. Food Chem.* *46*, 1469 (1998).
158. Vanderhaegen B., Neven H., Verachtert H., Derdelinckx G.: *Food Chem.* *95*, 357 (2006).

159. Gijs L., Collin S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* *60*, 68 (2002).
160. Williams R. S., Wagner H. P.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* *36*, 27 (1978).
161. Neven H., Delvaux F., Derdelinckx G.: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* *34*, 115 (1997).
162. Vesely P., Lusk L., Basarova G., Seabrooks J., Ryder D.: *J. Agric. Food Chem.* *51*, 6941 (2003).
163. Vanderhaegen B., Neven H., Coghe S., Verstrepen K. J., Verachtert H., Derdelinckx G.: *J. Agric. Food Chem.* *51*, 6782 (2003).
164. Hofmann T., Schieberle P.: *J. Agric. Food Chem.* *45*, 898 (1997).
165. Umamo K., Hagi Y., Nakahara K., Shyoji A., Shibamoto T.: *J. Agric. Food Chem.* *43*, 2212 (1995).
166. Varmuza K., Steiner I., Glinsner T., Klein H.: *Eur. Food Res. Technol.* *215*, 235 (2002).
167. Vanderhaegen B., Neven H., Daenen L., Verstrepen K. J., Verachtert H., Derdelinckx G.: *J. Agric. Food Chem.* *52*, 1661 (2004).
168. Goupy P., Hugues M., Boivin P., Amiot M. J.: *J. Sci. Food Agric.* *79*, 1625 (1999).
169. Kobayashi N., Kaneda H., Kuroda H., Watari J., Kurihara T., Shinotsuka K.: *J. Biosci. Bioeng.* *90*, 69 (2000).
170. Chappell J.: *Plant Physiol.* *107*, 1 (1995).
171. Chen F., Tholl D., Bohlmann J., Pichersky E.: *Plant J.* *66*, 212 (2011).
172. Velišek J., Cejpek K.: *Biosynthesis of Food Components*. Osis, Tábor 2008.
173. Tian R. R., Pan Q. H., Zhan J. C., Li J. M., Wan S. B., Zhang Q. H., Huang W. D.: *Molecules* *14*, 827 (2009).
174. Robbins R. J.: *J. Agric. Food Chem.* *51*, 2866 (2003).
175. Ryan D., Robards K., Prenzler P., Antolovich M.: *Trac-Trends Anal. Chem.* *18*, 362 (1999).
176. Dey P. M., Harborne J. B.: *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, UK, 1997.
177. Drawert F., Schreier P., Scherer W.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* *155*, 342 (1974).
178. Fernández de Simon B., Pérez-Ilzarbe J., Hernández T., Gómez-Cordovés C., Estrella I.: *J. Agric. Food Chem.* *40*, 1531 (1992).
179. Garcia-Viguera C., Bridle P.: *Food Chem.* *54*, 349 (1995).
180. Schuster B, Herrmann K.: *Phytochem.* *24*, 2761 (1985).
181. Weber B., Hoesch L., Rast D. M.: *Phytochemistry* *40*, 433 (1995).

182. Haslam E.: Fortschr. Chem. Org. Natur. *41*, 1 (1982).
183. Kennedy J.A.: Cien. Inv. Agr. *35*, 107 (2008).
184. Baderschneider B., Winterhalter P.: J. Agric. Food Chem. *49*, 2788 (2001).
185. Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse, A.L.: Phytochemistry *55*, 77 (2000).
186. Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse, A.L.: Am. J. Enol. Viticult. *53*, 268 (2002).
187. Fernández de Simon B., Hernández T., Estrella I., Pérez-Ilzarbe J., Gómez-Cordovés C.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. *194*, 351 (1992).
188. Budic-Leto I., Lovric T.: Food Technol. Biotechnol. *40*, 221 (2002).
189. Bezhushvili M. G., Nutsubidze R. K., Pataraya M. S.: Appl. Biochem. Microbiol. *36*, 142 (2000).
190. Häkkinen S.: Doctoral dissertation. Kuopio University, Kuopio 2000.
191. Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L., Cogan T. M.: Int. Dairy J. *11*, 259 (2001).
192. Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P.: *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology (3rd Edition)*. Elsevier, 2004.
193. Jollivet N., Bézenger M. C., Vayssier Y., Belin J. M.: Appl. Microbiol. Biot. *36*, 790 (1992).
194. Pachlová V., Buňka F., Buňková L., Weiserová E., Budinský P., Žaludek M., Kráčmar S.: Int. J. Food Sci. Technol. *46*, 101 (2011).
195. Buňka F., Štětina J., Hrabě J.: Eur. Food Res. Technol. *228*, 223 (2008).
196. Deetae P., Bonnarme P., Spinnler H. E., Helinck S.: Appl. Microbiol. Biotechnol. *76*, 1161 (2007).
197. Marilley L., Casey M. G.: Int. J. Food Microbiol. *90*, 139 (2004).
198. Ardö Y.: Biotechnol. Adv. *24*, 238 (2006).
199. Urbach G.: Int. Dairy J. *3*, 389 (1993).
200. Molimard P., Spinnler, H. E.: J. Dairy Sci. *79*, 169 (1996).
201. Curioni P. M. G., Bosset J. O.: Int. Dairy J. *12*, 959 (2002).
202. Brennand C. P., Ha J. K., Lindsay R. C.: J. Sensory Stud. *4*, 105 (1989).
203. Preininger M., Warmke R., Grosch W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. *202*, 30 (1996).
204. Urbach G.: Int. J. Dairy Technol. *50*, 79 (1997).
205. Karahadian C., Josephson D. B., Lindsay R. C.: J. Agric. Food Chem. *33*, 339 (1985).
206. Karahadian C., Josephson D. B., Lindsay R. C.: J. Dairy Sci. *68*, 1865 (1985).

207. Welsh F. W., Murray W. D., Williams R. E.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 105 (1989).
208. Moio L., Dekimpe J., Etiévant P. X., Addeo F.: *Ital. J. Food Sci.* 5, 57 (1993).
209. Griffith R., Hammond E. G.: *J. Dairy Sci.* 72, 604 (1989).
210. Keeney M., Day E. A.: *J. Dairy Sci.* 40, 874 (1957).
211. Rychlik M., Bosset J. O.: *Int. Dairy J.* 11, 895 (2001).
212. Moio L., Langlois D., Etiévant P. X., Addeo F.: *Ital. J. Food Sci.* 3, 227 (1993).
213. Lee C. W., Richard J.: *J. Dairy Res.* 51, 461 (1984).
214. Chromečková M.: Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2010.
215. Kubíčková J., Grosch W.: *Int. Dairy J.* 7, 65 (1997).
216. McSweeney P. L. H., Sousa M. J.: *Le Lait* 80, 293 (2000).
217. Yvon M., Rijnen L.: *Int. Dairy J.* 11, 185 (2001).
218. Rychlik M., Bosset J. O.: *Int. Dairy J.* 11, 903 (2001).
219. Jollivet N., Chataud J., Vayssier Y., Bensoussan M., Belin J. M.: *J. Dairy Res.* 61, 241 (1994).
220. Suriyaphan O., Drake M., Chen X. Q., Cadwallader K. R.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 1382 (2001).
221. Parliment T. H., Kolor M. G., Rizzo D. J.: *J. Agric. Food Chem.* 30, 1006 (1982).
222. Jolly R. C., Kosikowski F. V.: *J. Agric. Food Chem.* 23, 1175 (1975).
223. Mariaca R. G., Berger T. F. H., Gauch R., Imhof M. I., Jeangros B., Bosset J. O.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 4423 (1997).
224. Stoffelsma J., Sipma G., Kettenes D. K., Pypkerz J.: *J. Agric. Food Chem.* 16, 1000 (1968).
225. Semmelroch P., Grosch W.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 537 (1996).
226. Costa Freitas A. M., Mosca A. I.: *Food Res. Int.* 32, 565 (1999).
227. Lee K.-G., Shibamoto T.: *Flavour Fragr. J.* 17, 349 (2002).
228. Anderson K. A., Smith B. W.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 2068 (2002).
229. Clarke R. J., Trugo L. C.: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition (2nd Edition)*. Academic Press, London, (2003).
230. Czerny M., Grosch J.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 868 (2000).
231. Nebesny E., Budryn G., Kula J., Majda T.: *Eur. Food Res. Technol.* 225, 9 (2007).
232. Buffo R. A., Cardelli-Freire C.: *Flavour Fragr. J.* 19, 99 (2004).

233. Frederick J.: *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology (2nd Edition)*. Wiley & Sons, New York, 1999.
234. Feldman J. R., Ryder W. S., Kung J. T.: *J. Agric. Food Chem.* 17, 733 (1969).
235. Scheidig C., Czerny M., Schieberle P.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 5768 (2007).
236. Spadone J.C., Takeoka G., Liardon R.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 226 (1990).
237. Mathieu F., Malosse C., Cain A.-H., Frérot B.: *J. High Res. Chromatogr. Commun.* 19, 298 (1996).
238. Mathieu F., Malosse C., Frérot B.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 1106 (1998).
239. Wajda P., Walczyk D.: *J. Sci. Food Agric.* 29, 377 (1978).
240. Moon J.-K., Shobamoto T.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 5823 (2009).
241. Sanz C., Ansorena D., Bello J., Cid C.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 1364 (2001).
242. Vitzthum O. G., Werkhoff P.: *J. Agric. Food Chem.* 23, 510 (1975).
243. Bondarovich H. A., Friedel P., Kramp V., Renner J. A., Shephard F. W., Gianturco M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 15, 1093 (1967).
244. Yeretian C., Jordan A., Badoud R., Lindinger W.: *Eur. Food Res. Technol.* 214, 92 (2002).
245. Flament I.: *Coffee flavor chemistry*. Wiley & Sons, New York, 2002.
246. Roberts D. D., Pollien P., Milo C.: *Food Chem.* 48, 2430 (2000).
247. Ky C.-L., Louarn J., Dussert S., Guyot B., Hamon S., Noirot M.: *Food Chem.* 75, 223 (2001).
248. Viani R., Horman I.: *J. Food Sci.* 39, 1216 (1974).
249. Sârbua C., Pop H. F.: *Talanta* 65, 1215 (2005).
250. Berrueta L. A., Alonso-Salces R. M., Héberger K.: *J. Chromatogr. A* 1158, 196 (2007).
251. Câmara J. S., Alves M. A., Marques J. C.: *Talanta* 68, 1512 (2006).
252. Filzmoser P., Hron K., Reimann C.: *Sci. Total Environ.* 408, 4230 (2010).
253. Filzmoser P., Hron K., Reimann C.: *Environmetrics* 20, 621 (2009).
254. Bucciatti A., Pawlowsky-Glahn V.: *Math. Geol.* 37, 703 (2005).
255. Zambonin C. G., Balest L., De Benedetto G. E., Palmisano F.: *Talanta* 66, 261 (2005).
256. Meloun M., Militký J., Hill M.: *Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech*. Academia, Praha, 2005.
257. Massart D. L., Heyden Y. V.: *LC GC Europe* 17, 586 (2004).
258. Massart D. L., Heyden Y. V.: *LC GC Europe* 18, 84 (2005).

259. Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování dat*. Academia, Praha, 2002.
260. Gabriel K. R.: *Biometrika* 58, 453 (1971).
261. Aitchison J.: *The Statistical Analysis of Compositional Data*. Chapman & Hall, London, 1986.
262. Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J. J., Tolosana-Delgado J.: *Lecture Notes on Compositional Data Analysis*, 2008. <http://hdl.handle.net/10256/297> (15. 2. 2009).
263. Aitchison J., Greenacre M.: *Appl. Stat.* 51, 375 (2002).
264. Egozcue J. J., Pawlowsky-Glahn V., Mateu-Figueras G., Barcel'ó Vidal C.: *Math. Geol.* 35, 279 (2003).
265. R development core team, Vienna, 2011, <http://www.r-project.org/>.
266. Adams R.P.: *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 2nd Ed.* Allured, Illinois, USA, 2004.
267. Skinkis P. A., Bordelon B. P., Wood K. V.: *Am. J. Enol. Viticult.* 59, 440 (2008).
268. Williams P. J., Straše C. R., Wilson B.: *J. Agric. Food Chem.* 28, 766 (1980).
269. Zalacain A., Marín J., Alonso G. L., Salinas M. R.: *Talanta* 71, 1610 (2007).
270. Rapp A., Guntert M.: *Vitis* 24, 139 (1985).
271. Lillo M. P. Y., Agosin E., Belancic A., Latrille E.: *J. Food Sci.* 70, 432 (2005).
272. López-Vázquez C., Bollaín M. H., Moser S., Orriols I.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 9657 (2010).
273. Diéguez S. C., Peñam L. G., Gómez E. F.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 7385 (2003).
274. <http://www.leffingwell.com/> (4. 3. 2011).
275. <http://www.flavornet.org/flavornet.html> (9. 2. 2011) .
276. King A. J., Dickinson J. R.: *FEMS Yeast Res.* 3, 53 (2003).
277. Pozo-Bayón M. Á., Hernández M. T., Martín-Álvarez P. J., Polo M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2089 (2003).
278. Mustafa N. R., Verpoorte R.: *Planta* 222, 1 (2005).
279. Douglas C. J.: *Trends Plant Sci.* 1, 171 (1996).
280. Bicchi C., Drigo S., Rubiolo P.: *J. Chromatogr. A* 892, 469 (2000).
281. Ho C. W., Wan Aida W. M., Maskat M. Y., Osman H.: *J. Food Compos. Anal.* 19, 822 (2006).

282. Čajka T., Hajšlová J., Cochran J., Holadová K., Klimánková E.: *J. Sep. Sci.* *30*, 534 (2007).
283. Ayad E. H. E., Awad S., El Attar A., De Jong C., El-Soda M.: *Food Chem.* *86*, 553 (2004).
284. Risticevic A. S., Carasej E., Pawliszyn J.: *Anal. Chim. Acta* *617*, 72 (2008).
285. Bicchi C. P., Panero O. M., Pellegrino G. M., Vanni A. C.: *J. Agric. Food Chem.* *45*, 4680 (1997).

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFID	plamenově-ionizační detektor se solí alkalického kovu
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid
CA	kanonická korelační analýza
CA4H	cinamát-4-hydroxylasa
CAR	carboxen
clr	centred logratio (transformace)
CLU	shluková analýza
CW	carbowax
DA	diskriminační analýza
DI-SPME	mikroextrakce tuhou fází v provedení přímého ponoření vlákna
DMAPP	3,3-dimethylallyl difosfát
DMDS	dimethyldisulfid
DMTS	dimethyltrisulfid
ECD	detektor elektronového záchytu
EPA	Environmental Protection Agency
FA	faktorová analýza
FID	plamenově-ionizační detektor
FLD	fluorescenční detektor
FPP	farnesyl difosfát
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GGPP	geranylgeranyl difosfát
GPP	geranyl difosfát
HS-SPME	mikroextrakce tuhou fází v headspace provedení
ilr	isometric logratio (transformace)
IPP	isopentenyl difosfát
IR	infračervená oblast
LLE	extrakce kapalina - kapalina
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie

MSD	hmotnostně-spektrometrický detektor
NMR	nukleární magnetické rezonance
NPP	neryl difosfát
PA	polyacrylate
PAL	fenylalanin-amoniak lyasa
PC	hlavní komponenta
PCA	analýza hlavních komponent
PDSM	polydimethylsiloxane
PLS	metoda částečných nejmenších čtverců
RI	retenční index
RID	refraktometrický detektor
RSD	relativní směrodatná odchylka
SLE	extrakce tuhá fáze - kapalina
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TDN	1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen
TIC	celkový iontový proud
TMCS	trimethylchlorosilan
TPB	(<i>E</i>)-1-(2,3,6-trimethylfenyl)-buta-1,3-dien
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast
VÚPS	Výzkumny ústav pivovarský a sladařský