

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Variabilita pивního metabolomu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Denisa Balatková**
Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.**
Rok: 2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Nejdříve bych ráda poděkovala mému školiteli Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D za jeho odborné vedení, podporu, trpělivost a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Slobodianové za její veškerou výpomoc během práce v laboratoři. Děkuji také Mgr. Martinovi Vavrušovi za jeho rady při statistickém vyhodnocování a zpracování výsledků. Tato diplomová práce byla podpořena interním grantem IGA_PrF_2023_012.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Denisa Balatková
Název práce:	Variabilita pivního metabolomu
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra experimentální biologie
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

Abstrakt:

Pivo je jedním z nejtradičnějších a nejstarších alkoholických nápojů na světě. Vyrábí se z vody, sladu, chmele a kvasinek. Tyto suroviny společně přispívají k vytvoření jeho charakteristické chuti, vůně a dalším sensorickým vlastnostem. Během samotného výrobního procesu piva dochází k různým chemickým reakcím a interakcím mezi surovinami a mikroorganismy, což vede k vytváření dalších chemických sloučenin. Existuje mnoho různých typů piv, lišící se procesem výroby, dobou fermentace či skladováním. Tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu vztahů mezi pivním metabolomem, typem piva, způsobem výroby a vstupními surovinami. Za tímto účelem byly sbírány vzorky různých typů piv, včetně surovin a meziproduktů. Byla provedena necílená metabolomická analýza pomocí LC-MS v negativním ionizačním módu (ESI⁻). Získaná metabolomická data byla následně statisticky a bioinformaticky vyhodnocena. Výsledky ukázaly, že pomocí metabolomické analýzy je možné rozlišit jednotlivé druhy piva a identifikovat specifické metabolity, které se podílejí na jejich charakteru. Celkem bylo úplně identifikováno šest takových metabolitů a byla naměřena jejich MS/MS spektra. Bylo také zjištěno, že obalový materiál a proces stáčení a skladování mohou ovlivnit stabilitu piva. Využití necílené metabolomiky a LC-MS analýzy se ukázalo jako mocný nástroj pro studium pivního metabolomu.

Klíčová slova:	Pivo, pivní metabolom, necílená metabolomická analýza, LC-MS analýza
Počet stran:	66
Počet příloh:	5
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Bc. Denisa Balatková
Title: Variability of beer metabolome
Type of thesis: Diploma
Department: Department of Experimental Biology
Supervisor: Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation: 2023

Abstract:

Beer is one of the most traditional and oldest alcoholic beverages in the world. It is made from water, malt, hops and yeast. Together, these ingredients contribute to the creation of its characteristic taste, aroma and other sensory properties. During the beer production process itself, various chemical reactions and interactions occur between raw materials and microorganisms, which lead to the creation of other chemical compounds. There are many different types of beer, differing in the production process, fermentation time and storage. This diploma thesis focuses on the analysis of the relationships between the beer metabolome, the type of beer, the production method and the input raw materials. For this purpose, samples of different types of beer, including raw materials and intermediate products, were collected. Untargeted metabolomic analysis was performed using LC-MS in negative ionization mode (ESI-). The obtained metabolomic data were subsequently statistically and bioinformatically evaluated. The results showed that with the help of metabolomic analysis it is possible to distinguish between individual types of beer and to identify specific metabolites that contribute to their character. A total of six such metabolites were fully identified and their MS/MS spectra were measured. It has also been found that packaging material and the bottling and storage process can affect beer stability. The use of untargeted metabolomics and LC-MS analysis has proven to be a powerful tool for studying the beer metabolome.

Keywords: Beer, beer metabolome, untargeted metabolomic analysis, LC-MS analysis
Number of pages: 66
Number of appendices: 5
Language: Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Charakteristika piva	2
2.2 Historie piva	2
2.2.1 Reinheitsgebot – Zákon o čistotě piva	3
2.2.2 Pivo v Čechách	3
2.3 Rozdělení pivovarů	4
2.4 Suroviny pro výrobu piva	5
2.4.1 Voda	5
2.4.1.1 Úprava vody	6
2.4.2 Slad	7
2.4.2.1 Struktura ječmenného zrna	8
2.4.2.2 Výroba sladu (sladování)	8
2.4.3 Chmel	11
2.4.3.2 Chmelové výrobky	13
2.4.4 Pivovarské kvasinky	13
2.4.4.1 Svrchně kvašené vs. spodně kvašené pivo	13
2.4.5 Pomocné suroviny	14
2.5 Výroba piva	14
2.5.1 Šrotování (mletí) a vystírání sladu	14
2.5.2 Rmutování a scezování	15
2.5.3 Chmelovar	15
2.5.4 Kvašení a zrání piva	16
2.5.5 Filtrace a pasterizace piva	16
2.6 Metabolomika	17
2.7 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	18

2.8 Hmotnostní spektrometrie (MS)	20
2.8.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Materiál.....	22
3.2 Chemikálie.....	22
3.3 Přístroje.....	22
3.4 Navážení a extrakce pevného materiálu.....	23
3.5 Prekoncentrace vzorků pív, sladiny, mladín a kvasnic.....	23
3.6 Necílená LC-MS analýza	24
3.7 Statistické a bioinformatické vyhodnocení dat.....	25
3.7.1 Úprava surových dat	25
3.7.2 Formulace a statistické vyhodnocení hypotéz.....	25
3.7.3 Identifikace metabolitů	26
4 VÝSLEDKY	27
4.1 LC-MS analýza	27
4.2 Shluková analýza	28
4.3 Průměrné množství extrahovaných látek u různých druhů pív	29
4.4 Množství rozpuštěných látek v různých fázích přípravy piva	29
4.5 Metabolom piva a vstupních surovin.....	31
4.6 Metabolity rozlišující od sebe různé druhy pív	32
4.6.1 Filtrovaná vs nefiltrovaná piva	34
4.6.2 Spodně kvašená vs svrchně kvašená piva.....	35
4.6.3 Zahraniční vs. česká piva.....	37
4.6.4 Piva s přidaným cukrem vs. piva bez přidaného cukru	38
4.6.5 Nízkoprocentní vs vysokoprocentní piva	39
4.5 Vliv obalového materiálu na metabolom piva	40
5 DISKUZE.....	41

5.1 Shluková analýza	41
5.2 Průměrné množství extrahovaných látek u různých druhů pív	41
5.3 Množství rozpuštěných látek v různých fázích přípravy piva	42
5.4 Metabolom piva a vstupních surovin	43
5.5 Metabolity rozlišující od sebe různé druhy pív	44
5.5.1 Kyselina ferulová	44
5.5.2 Kyselina trihydroxy-oktadecenová (TriHOME)	44
5.5.3 Kyselina fenylmléčná	45
5.5.4 Kyselina azelaová	45
5.5.5 Kyselina kumarová	45
5.5.6 Kyselina trihydroxy-oktadekadienová (TriHODE)	46
5.6 Vliv obalového materiálu na metabolom piva	46
6 ZÁVĚR	47
7 LITERATURA	48
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	53
9. PŘÍLOHY	55
9.1 Příloha 1	55
9.2 Příloha 2	56
9.3 Příloha 3	56
9.4 Příloha 4	57
9.5 Příloha 5	57

Cíle práce

1. Literární rešerše
2. Sběr vzorků piva různých typů včetně výrobních surovin a meziproductů
3. Příprava vzorků a necílená LC-MS analýza
4. Statistické a bioinformatické vyhodnocení metabolomických dat
5. Analýza vztahů mezi pivním metabolomem, typem piva, způsobem výroby a vstupními surovinami

1 ÚVOD

Pivo je jedním z nejstarších a nejvíce konzumovaných alkoholických nápojů na světě. Obsahuje širokou škálu chemických sloučenin, které přispívají k jeho chuti, vůni a dalším senzorickým vlastnostem. Většina metabolitů v pivu pochází přímo ze vstupních surovin, zejména sladu, chmele a kvasinek. Nicméně, další sloučeniny vznikají během různých fází výrobního procesu, jako je sladování, vaření, fermentace a zrání (Spevacek *et al.*, 2016; Martinez-Gomez *et al.*, 2020).

Rozvoj analytických technik z hlediska jejich sofistikovanosti a citlivosti umožňuje provádět podrobné analýzy malých molekul přítomných v pivu. Jedním z těchto přístupů je metabolomika, která umožňuje identifikovat i nízké koncentrace metabolitů a sledovat změny ve složení piva během výrobního procesu (Spevacek *et al.*, 2016; Cavallini *et al.*, 2021).

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu chemického složení piva a vztahů mezi jeho metabolomem, typem piva, způsobem výroby a vstupními surovinami. Hlavními cíli práce jsou sběr vzorků piva různých typů včetně výrobních surovin a meziproductů, jejich příprava pro necílenou LC-MS analýzu a následné statistické a bioinformatické vyhodnocení získaných metabolomických dat.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Charakteristika piva

Pivo je nejčastěji charakterizováno jako slabě alkoholický, fermentovaný nápoj vyrobený ze škrobnatých surovin, ochucený chmelem či chmelovým výrobkem a kvašený za pomoci pivovarských kvasinek. Cukr potřebný pro kvašení se získává ze sladovaných obilnin, a to nejčastěji z ječmene, jako je tomu v České republice. Obilniny použité pro výrobu piva se však v různých částech světa mohou lišit. Například Německo je známé svými pšeničnými pivy, zatímco v USA, Maďarsku a jiných zemích je zvykem do piva přidávat kukuřici či rýži (Baxter *et al.*, 2001; Chládek *et al.*, 2007).

Vaření piva patří mezi nejstarší biotechnologické procesy a podle definice se jedná o „kombinovaný proces zahrnující extrakci z naklíčených zrn a následnou fermentaci cukerného roztoku za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého (CO₂) produkovaného kvasinkami“. Obecně vaření piva spočívá v přeměně přírodních potravinových materiálů na čistý, lahodný nápoj (Hornsey, 1999; Kubo, 2003).

2.2 Historie piva

Fermentace má velké praktické a ekonomické využití již po tisíce let, a to zejména při výrobě piva, vína a chleba. První písemný dokument popisující techniku vaření piva pochází z oblasti Mezopotámie od Sumerů z doby asi před 6000 lety (Bud, 1993). Ve starověké Mezopotámii a Egyptě byla výroba piva a vína ekonomicky tak důležitá, že se stala hlavním zdrojem daňových příjmů (Buchholz a Collins, 2013). Podle posledních názorů jsou počátky výroby piva řazeny do období 10 000 až 15 000 let před naším letopočtem, kdy naši předkové přestali vést kočovný způsob života, začali se usazovat a cíleně pěstovat obilí pro svoje živobytí (Chládek *et al.*, 2007).

Existuje mnoho teorií o vzniku úplně prvního piva, z nichž všechny jsou založeny na náhodě. Podle nejznámější teorie vzniklo první pivo díky skladování obilí a to tak, že do hliněné nádoby s obilnou kaší natekla při dešti voda a horké slunce po nějaké době způsobilo její samovolné vykvašení. Takto vyrobený nápoj (či spíše kaše) vznikl nezávisle na sobě na odlišných místech téměř ve stejné době. Tato „piva“ se jistě nevyznačovala dobrou chutí a naprosto se nepodobala pivům, které známe dnes, avšak přesto se samovolným zkvašením vzniklá kaše stala nedílnou součástí jídelníčku v různých částech světa (Chládek *et al.*, 2007).

2.2.1 Reinheitsgebot – Zákon o čistotě piva

Reinheitsgebot, tedy zákon o čistotě piva (reinheit – čistota; gebot – příkaz) byl vydán v Mnichově v roce 1487 na nařízení vévody Albrechta IV. V roce 1516 byl rozšířen do celého Bavorska a poté, co se Bavorsko na konci 19. století stalo součástí tzv. Deutsches Reich (Německá říše), začal platit kompletně pro celé Německo. Podle této legislativy je možné k vaření piva používat pouze ječmen, chmel a vodu, přičemž použití jiných obilovin, koření a dalších přísad bylo zakázáno. Zákon o čistotě byl primárně zaměřen na tehdejší komerční sládky, na vévodu a jeho společníky se nevztahoval, tudíž mohli k výrobě piva svobodně používat i jakékoli jiné ingredience. Cílem Reinheitsgebot bylo především omezit v pivovarnictví používání pšenice, která byla tehdy vyhrazená hlavně na výrobu chleba nezbytného pro výživu obyvatelstva. Zákaz se tedy vztahoval např. na pšeničná piva, která byla v té době v Bavorsku velice oblíbená (Hornsey, 1999; Barth, 2013).

2.2.2 Pivo v Čechách

Výrobu piva v našich zemích znali již Slované, před nimi také Germáni, a dokonce i původní Keltové, kteří byli na území Čech usazení do 1. století našeho letopočtu. Podle historiků se první chmelení piva připisuje právě Slovanům, kteří si sem chmel společně s jinými kulturními plodinami přinesli ze své pravlasti. S pivem se začalo obchodovat až koncem 9. století, do té doby bylo vaření piva na našem území běžnou domácí prací. Zdokonalování vaření piva se spojuje se zakládáním klášterů, součástí kterých bývaly právě i vlastní klášterní pivovary. V tehdejší době bylo vaření piva výhradně ženskou záležitostí. Nejstarší písemný doklad přímo zmiňující pivovarství na našem území pochází z roku 1088. Jedná se o Nadační listinu kolegiátní kapituly, ve které je jmenován pivovar na Trávníku, nacházející se pod Vyšehradem (Chládek *et al.*, 2007).

Rozmach pivovarství je také spojen s obdobím zakládání královských měst (12. a 13. století), kdy panovník za účelem získání oddanosti obyvatel zavedl tzv. „právo várečné“. Toto privilegium vaření piva měli pouze měšťané královského města, nevztahovalo se na chudinu, ani na živnostníky (např. lazebníci). Mezi tato města patří např. Svitavy, Žatec (známý svým chmelem) a Plzeň. Právě v pivovaru v Plzni byl 5. října roku 1842 uvařen první tradiční světlý spodně kvašený ležák, jehož receptura je využívána po celém světě a označuje se jako „pivo plzeňského typu“ (Chládek *et al.*, 2007; Barth, 2013).

2.3 Rozdělení pivovarů

Existují dva hlavní typy pivovarů – průmyslové velkopivovary a tzv. minipivovary. Řemeslné pivovary (minipivovary) se zabývají vařením piva v malém měřítku a jsou nezávislé. Jeden z prvních takových pivovarů vznikl ve Spojených státech až v roce 1965, ve Velké Británii v 70. letech 20. století a v Česku pak v roce 1991. Tímto se liší od průmyslových pivovarů často fungujících déle než sto let. Řemeslná piva se od sériově vyráběných piv odlišují také svojí kvalitou a specifickou chutí. Podle americké obchodní skupiny „Brewers Association“ se za minipivovar obecně považuje pivovar s celkovou roční produkcí piva nepřesahující 15 000 sudů. Řemeslný pivovar je nezávislý, což znamená, že méně než 25 % tohoto pivovaru je vlastněno nebo řízeno členem alkoholového průmyslu, který sám není řemeslným sládkem. Neexistuje však žádná jednotná obecně přijímaná definice minipivovaru, a to kvůli rozdílům mezi zeměmi (např. z hlediska jejich velikosti) a jejich rozdílným tradicím ve vaření piva. Například v Itálii je maximální roční výstav piva v řemeslných pivovarech 200 000 hl, zatímco ve Spojených státech až 7 038 000 hl. Celková roční produkce piva z minipivovaru v USA tedy odpovídá v jiných zemích celkové roční produkci většiny průmyslových pivovarů (Garavaglia, 2017; Maier, 2019).

Piva z řemeslných pivovarů, narozdíl od piv komerčních, často nejsou dále upravována, tedy neprocházejí procesem filtrace a pasterizace a díky tomu se jedná o pivo bohaté na zdraví prospěšné látky. U neupravených piv je však snižena doba jejich trvanlivosti, lidé jsou ale ochotni toto omezení akceptovat v zájmu pití čerstvého piva (Barth, 2013).

2.4 Suroviny pro výrobu piva

2.4.1 Voda

Pivo je tvořeno z více než 90 % vodou, a proto je na její kvalitu (chemickou i mikrobiologickou) kladen velký důraz. Jednou z nevýhod pivovarnictví je právě vysoká spotřeba vody, což má negativní dopad na životní prostředí. Na každý vyrobený litr piva se použije zhruba 5–10 litrů vody, která je nezbytná na čištění, proplachování, chlazení a samotné vaření. Nejdůležitějším požadavkem na vodu využívanou při výrobě piva je její čistota (Palmer a Kaminski, 2013).

Pivo je bohaté na minerální látky pocházející právě z pivovarské vody či sladu. Patří mezi ně např. kationty hořčíku, draslíku, sodíku a vápníku a anionty chloridu, síranu, dusičnanu a fosforečnanu. Ionty těchto minerálních látek přítomných ve vodě ovlivňují pivo významným způsobem a mohou mít na jeho kvalitu jak pozitivní, tak i negativní vliv v závislosti na jejich koncentraci a povaze (Buiatti, 2009).

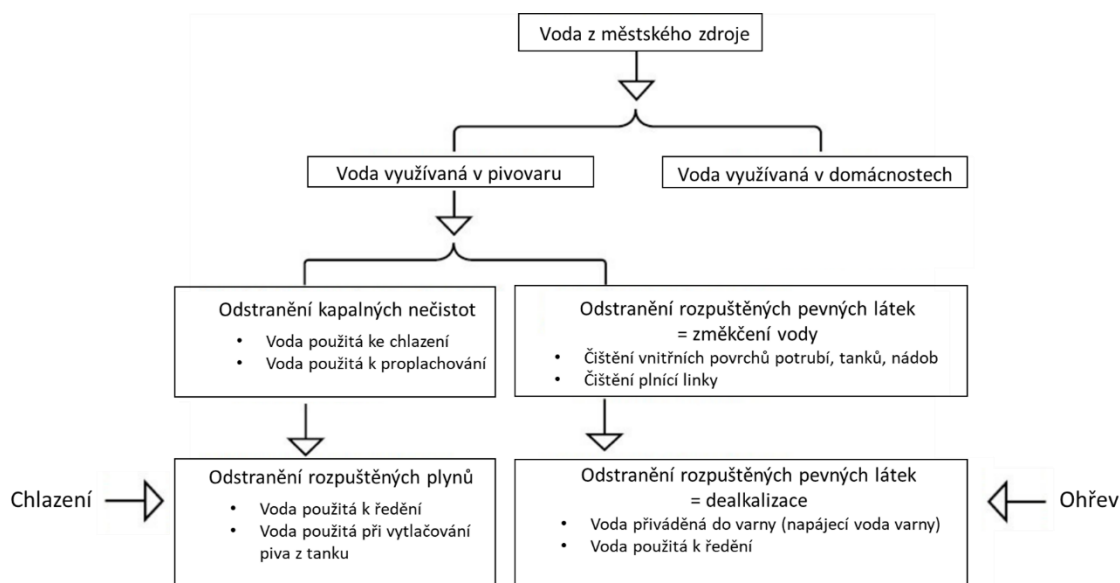
Pro výrobu piva je preferována spíše tvrdší voda. Tvrdost vody lze jednoduše definovat množstvím rozpuštěných solí, zejména solí vápníku a hořčíku. Čím tvrdší voda je, tím vyšší koncentraci těchto prvků obsahuje. Přibližně by pivovarská voda měla obsahovat alespoň 50 ppm vápníku, aby byl zajištěn vyšší výkon rmutování, kvašení a čiření piva (Briggs *et al.*, 2004; Palmer a Kaminski, 2013).

Různé vodní zdroje mají i různé chemické profily, to je třeba brát v úvahu při přípravě jednotlivých pivních stylů. Například alkalita pivovarské vody byla dříve vnímána pouze jako bariéra, kterou je třeba odstranit. Úroveň alkality se však liší v závislosti na požadovaném charakteru piva. Obecně platí, že u světlejších piv je žádoucí nízká zásaditost. U tmavších piv se potřeba zásaditosti naopak zvyšuje (Wunderlich a Back, 2009; Palmer a Kaminski, 2013).

2.4.1.1 Úprava vody

Ve vodě se vyskytuje velké množství různorodých látek, se kterými je nutno se vypořádat. Mezi nejčastější metody používané při úpravě vody pro odstranění nežádoucích látek patří např. iontová výměna, chemická precipitace, reverzní osmóza, sterilizace, koagulace a různé typy filtrace. Voda je upravována různými způsoby v závislosti na účelu, ke kterému bude použita. Například voda používaná k čištění musí být pro dosažení nejlepších výsledků často změkčena (Obr. 1; Briggs *et al.*, 2004).

Voda může obsahovat chlór, chloraminy, rozpuštěné plyny a různé organické sloučeniny, které mohou nepříznivě ovlivnit chuť piva (Barth, 2013). První krok úpravy pivovarské vody zahrnuje právě rozklad zmiňovaného chloru a chloraminu, a to filtrací přes aktivní uhlí nebo přidáním metabisulfitu. (Palmer a Kaminski, 2013). Typické schéma úpravy vody je znázorněno na obrázku 1.



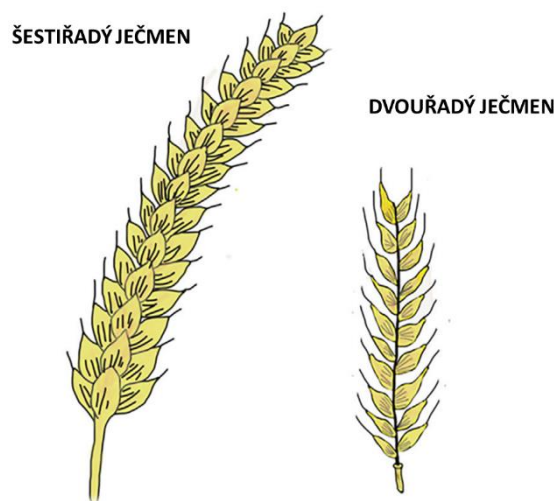
Obrázek 1. Schéma znázorňující příklad distribuce a úpravy vody v pivovaru. Převzato a upraveno podle: Palmer a Kaminski (2013).

2.4.2 Slad

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je po vodě druhou obsahově nejdůležitější složkou piva. Zrna ječmene jsou dále upravována procesem sladování za vzniku tzv. ječmenného sladu. Sladována mohou být i jiná obilná zrna, a to např. pšenice, žito, oves, čirok či proso (Briggs *et al.*, 2004; Wunderlich a Back, 2009)

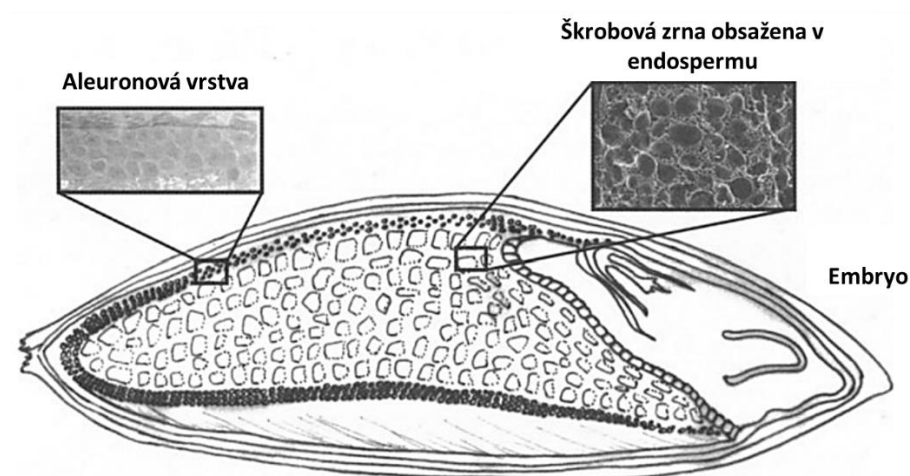
Ječmen je pro výrobu piva nejvíce preferován z mnoha důvodů. Daří se mu i v nepříznivých podmínkách pěstování a jeho klíčivost lze snadno upravit během sladování (Wunderlich a Back, 2009). Slupky ječmenných zrn jsou na rozdíl od pšeničných či žitných po celou dobu mletí a sladování zachovány, což je důležité pro pozdější číření sladiny, kde fungují jako přirozený filtr. Čím jsou slupky méně porušené, tím snazší a účinnější je krok číření. Další výhodou ječmene je jeho lehce stravitelný škrob a přiměřené množství bílkovin a lipidů (Reinold, 1997; Hertrich, 2013).

Na základě uspořádání zrn na klasech rozlišujeme dva typy sladovnického ječmene – dvouřadý a šestiřadý (Obr. 2). Šestiřadý ječmen má vyvinuto šest řad zrn, vyznačuje se vyšší enzymatickou aktivitou a vyšším obsahem bílkovin, avšak výtěžnost sladu je ve srovnání s dvouřadým nižší, a to kvůli malé velikosti zrn a nižšímu obsahu škrobu. V případě ječmene dvouřadého jsou vyvinuty pouze dvě řady zrn. Tato zrna mají nízký obsah bílkovin, jsou těžší, větší a obsahují vyšší množství cukru. Díky tomu poskytují vyšší výnos sladu a pro výrobu piva jsou proto preferovanější. Šestiřadý ječmen se často používá spolu s doplňkovým obilím (rýže, kukuřice, pšenice), aby se zohlednil snížený obsah cukru (Rani a Bhardwaj, 2021).



Obrázek 2. Druhy ječmene podle uspořádání zrn na klasech. Převzato a upraveno podle: Rani a Bhardwaj (2021).

2.4.2.1 Struktura ječmenného zrna



Obrázek 3. Struktura ječmene. Převzato a upraveno podle: Fox (2010).

Zrno ječmene se skládá ze tří hlavních složek – embrya, vnějších vrstev a endospermu. Embryo obsahuje omezené množství škrobu, lipidů a bílkovin. Vnější vrstvy se skládají ze slupky, perikarpu (oplodí), testy (osemení) a aleuronové vrstvy, která obklopuje dominantní složku zrna – škrobový endosperm (Obr. 3). Slupky, chránící zrno během skladování, se skládají z celulózy, malého množství polyfenolů a hořkých látek (Fox, 2010; Hertrich, 2013).

Endosperm se skládá ze škrobových granulí dispergovaných v proteinové matici. Škrob je nejhojnější složkou zrna, tvoří přibližně 60 % jeho hmotnosti. Buněčné stěny endospermu se skládají převážně z neškrobových polysacharidů, a to z β -glukanů a arabinoxylanů (Fox, 2010).

Ve sladovnickém ječmeni je nejvíce bílkovin produkováno v aleuronové vrstvě a endospermu, přičemž jejich ideální obsah je zhruba 10 až 12 %. Příliš velké nebo naopak malé množství bílkovin může negativně ovlivnit kvalitu sladu a také dochází ke snížené výtěžnosti finálního extraktu (Jaeger *et al.*, 2021).

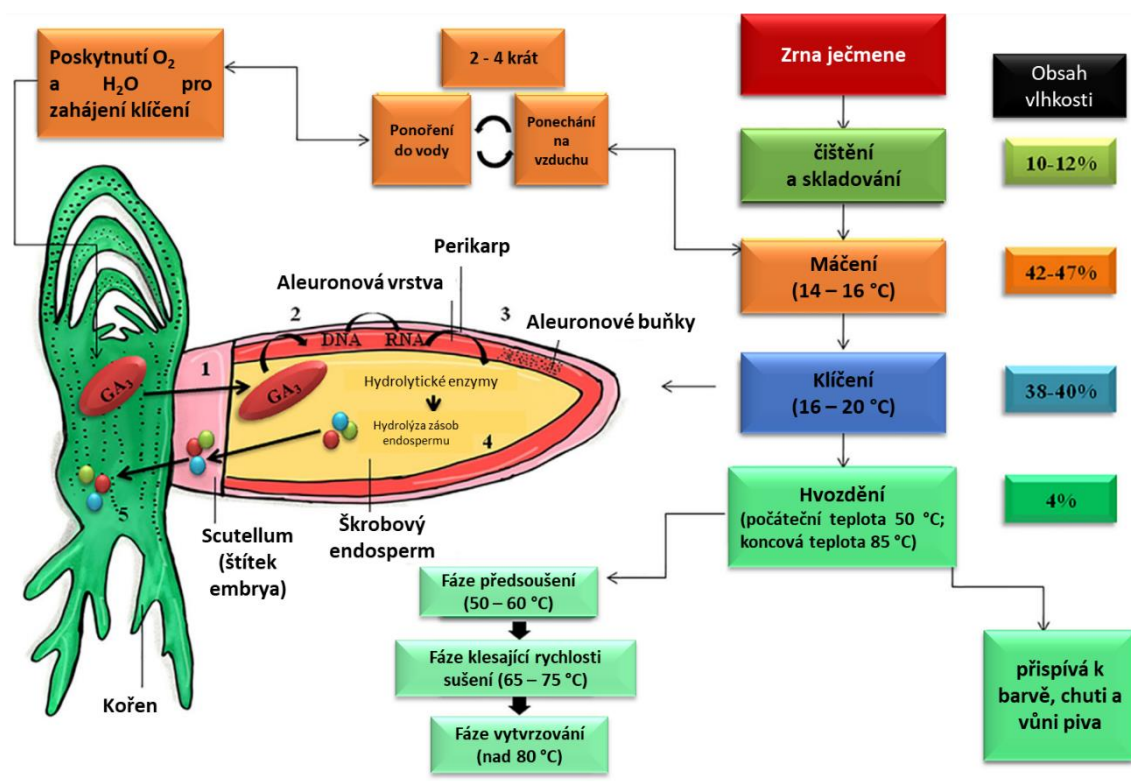
2.4.2.2 Výroba sladu (sladování)

Velké sloučeniny se složitou strukturou (škrob, bílkoviny a nukleové kyseliny) přítomné v ječmeni, musí být částečně nebo úplně degradovány na jednodušší složky (cukry, aminokyseliny a nukleotidy) hydrolytickými enzymy produkovánými během sladování. Buněčná stěna zrna je během procesu sladování změkčena a konečným výsledkem je přeměna škrobu na sladový extrakt (Rani a Bhardwaj, 2021).

Slad slouží jako přirozený zdroj antioxidantů a hraje tak důležitou roli v oxidační stabilitě piva. Tyto antioxidanty zabraňují oxidačním reakcím vychytáváním volných radikálů. Díky tomu je možné omezit přidávání exogenních antioxidačních sloučenin, které se používají k udržení oxidační stability piva (Vanderhaegen *et al.*, 2006).

Sladové antioxidanty mají také mnoho výhod pro zdraví spotřebitele, jelikož neutralizují reaktivní formy kyslíku, o nichž je známo, že jsou spojeny s řadou onemocnění (Landete 2013). Škrob obsažený ve sladu také přispívá k organoleptickým vlastnostem piva (např. barva a zákal; Carvalho *et al.*, 2016).

Proces sladování zahrnuje čištění zrn, jejich máčení ve vodě a následné klíčení a hvozdění (Obr. 4). Prvním krokem při výrobě sladu je dostatečné čištění zrn za účelem eliminace kontaminujících látek, které by mohly ovlivnit kvalitu a chuť piva. Sladovnický ječmen je dále nutno vytřídit podle velikosti zrna. Porušená a příliš malá zrna (zrna menší než 2 mm) jsou odstraněna a mohou být použita jako krmivo pro zvířata. Vyčištěná a vytříděná zrna jsou sušena a skladována při 12 % vlhkosti (Henry, 2016; Rani a Bhardwaj, 2021).



Obrázek 4. Schéma sladovnického procesu. Převzato a upraveno podle: Rani a Bhardwaj (2021).

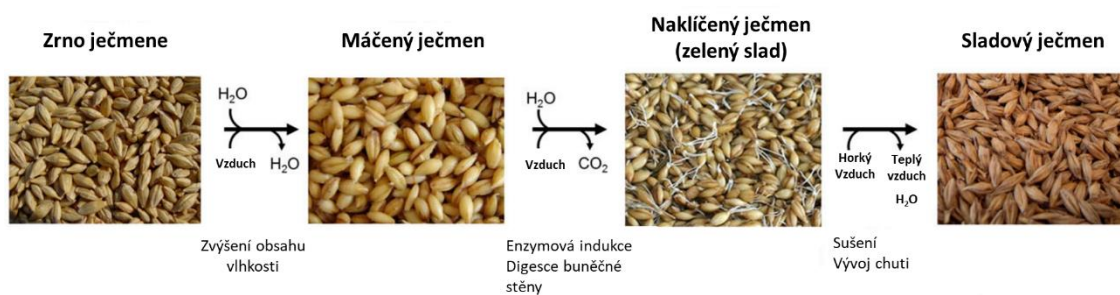
Stěžejním krokem sladování je tzv. proces máčení, při kterém sušená zrna nasávají vodu za účelem postupného zvýšení hladiny vlhkosti z přibližně 12 % na 42–47 %. Namáčení zrn ve vodě je vždy vystřídáno tzv. vzdušnou přestávkou, během níž se voda vypouští a pomocí ventilátorů je odsáván CO₂. Tento proces se opakuje 2krát až 4krát. Celková doba máčení se pohybuje okolo 2 až 4 dnů (Carvalho *et al.*, 2016).

Během prvního máčení se zrno promyje, tím se odstraní veškeré nečistoty a vylouhují se trísloviny, které jsou součástí slupky a vyznačují se svíravou chutí. Jakmile je zrno dostatečně hydratováno, embryo obnoví metabolické aktivity a zahájí biosyntézu kyseliny giberelové (GA₃), která difunduje do aleuronové vrstvy a působí jako katalyzátor pro produkci hydrolytických enzymů (glukanáz, proteáz a amyláz) v endospermu. Hydrolytické enzymy depolymerují polysacharidy a proteiny buněčné stěny endospermu a iniciují tak vývoj kořenů a výhonků, čímž je započata fáze klíčení (Rani a Bhardwaj, 2021).

Kyselinu giberelovou lze přidat i exogenně za účelem urychlení následujícího procesu klíčení nebo zvýšení účinku přirozeně produkované GA₃. Sladovnické přísady však nejsou obecně preferovány, jelikož ve sladovém extraktu zanechávají nežádoucí zbytky (Bamforth a Barclay, 1993).

Produktem fáze klíčení je tzv. zelený slad (zelený ve smyslu nezralý; Obr. 5), který se vyznačuje vysokým obsahem vlhkosti a vysokou enzymatickou aktivitou (Briggs *et al.*, 2004; Rani a Bhardwaj, 2021). Klíčení probíhá za vlhkých, aerobních podmínek při teplotě 16-20 °C po dobu 3-6 dnů v závislosti na podmínkách procesu (Poutanen, 2020).

Proces klíčení je regulován jak tvorbou α- a β-amylázy, tak degradací proteinů a β-glukanů v buněčných stěnách. Rozklad β-glukanů na menší molekuly rozpustné ve vodě je velmi důležitý pro dosažení rychlého scezování a pro zlepšení filtrovatelnosti piva (Briggs *et al.*, 2004).



Obrázek 5. Vzhled ječmenného zrna během všech fází sladovnického procesu. Převzato a upraveno podle: Carvalho *et al.* (2016).

Zelený slad je dále přemístěn do sušicí komory, kde se pomocí horkého vzduchu usmrtí embryo, klíčení je tím ukončeno a zrno vstupuje do poslední fáze jeho úpravy (Oser, 2015).

Závěrečnou fází sladování je úprava naklíčeného zrna procesem zvaným hvozdění. Jedná se o tepelné zpracování zrn, které má největší vliv na barvu a chuť sladu v závislosti na časovém průběhu, teplotě a obsahu vlhkosti (Yahya *et al.*, 2014). Cílem hvozdění je snížení obsahu vlhkosti zeleného sladu pod 5 %, zabránění denaturace enzymů a zajištění stability produktu při skladování a přepravě (Rani a Bhardwaj, 2021).

Hvozdění sestává celkem ze tří fází – „předsoušení“, fáze tzv. „klesající rychlosti sušení“ a fáze „vytvrzování“. Během první fáze dochází ke snížení vlhkosti zrna z přibližně 44 % na 12 % při teplotě 25 °C. V další etapě klesá vlhkost sladu z 12 % na 4 %, teplota sušení se pohybuje v rozmezí od 65 do 75 °C. Vlhkost má tendenci se přemísťovat z vnitřního prostoru zrna na jeho povrch, čímž je omezena rychlost sušení (proto název „klesající rychlost sušení“). Nakonec se teplota zvýší nad 80 °C (fáze „vytvrzování“) na 1-2 hodiny a poté se slad zchladí na teplotu vhodnou pro skladování a přepravu. Pokud by se teplota zvýšila, když jsou zrna mokrá, došlo by k denuraci enzymů a ke zhoršení kvality sladu. Fáze vytvrzování umožňuje vyvinout ideální aroma a barvu sladu (Mallett, 2014; Rani a Bhardwaj, 2021).

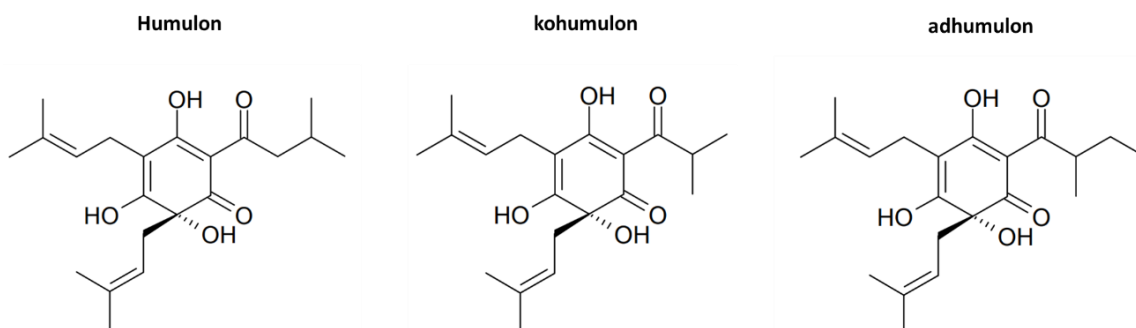
Během celého procesu sladování je nezbytná pečlivá regulace času, vlhkosti a teploty, aby se potlačila tvorba nežádoucích chemických sloučenin a denaturace enzymů citlivých na teplo (Rani a Bhardwaj, 2021).

2.4.3 Chmel

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus L.*) patří do čeledi konopovitých (*Cannabidaceae*) se do piva začal původně přidávat za účelem prodloužení jeho trvanlivosti (Briggs *et al.*, 2004). Za oxidační stabilitu piva jsou zodpovědné především polyfenolické sloučeniny zahrnující hlavně aromatické karboxylové kyseliny a flavonoidy jako proanthokyanidiny a flavonolové glykosidy (Steenackers *et al.*, 2015; Bocquet *et al.*, 2018).

Chmelové šišťice pivu dodávají také žádoucí hořkost a charakteristické aroma. Hlavním zdrojem specifické hořké chuti jsou iso- α -kyseliny obsažené v lupulinových žlázách šišťic. Jde o složky chmelových pryskyřic vznikající izomerací α -kyselin během varného procesu. Nejvíce zastoupenými α -hořkými kyselinami v chmelu jsou izomery humulon, adhumulon a kohumulon lišící se pouze svým postranním acylovým

řetězcem (Obr. 6). Iso- α -kyseliny se podílejí také na stabilitě pивní pěny (Česlová *et al.*, 2009; Karabín *et al.*, 2009).



Obrázek 6. Strukturní vzorce vybraných izomerů α -hořkých kyselin. Převzato a upraveno podle: Karabín *et al.* (2009).

Další hlavní složkou chmele jsou éterické oleje (silice) nejčastěji tvořeny terpeny (např. myrcen) nebo seskviterpeny. Jedná se o sekundární metabolity dodávající pивu typické kořeněné, citrusové a květinové aroma s nádechem ovocných a dřevitých tónů. Vzhledem k těkavé povaze silic dochází během přípravy pивa vlivem vysokých teplot k jejich částečnému odpaření. Chemické složení se u různých odrůd chmele liší v závislosti na pěstitelské oblasti a půdních a klimatických podmínkách (Bocquet *et al.*, 2018; Sanz *et al.*, 2019).

2.4.3.1 České odrůdy chmele

Chmel se na našem území pěstuje ve třech oblastech – Žatecko, Ústěcko a Tršicko. Nejvýznamnější odrůdou českého chmelařství je Žatecký poloraný červeňák (Ž.P.Č.). Mezi další české odrůdy chmele patří např. Sládek, Premiant, Agnus, Kazbek, Saaz Late apod. (Mikyška a Jurková, 2018).

Odrůdy chmele můžeme na základě jejich průměrného obsahu α -hořkých kyselin rozdělit do dvou skupin - „aromatické“ a „hořké“. Aromatické odrůdy obsahují asi 3 - 4 % α -kyselin, hořké pak 8 - 15 % (Jelínek *et al.*, 2010). Hořké odrůdy, jako např. Agnus či Premiant jsou zodpovědné za hořkost pивa a přidávají se na začátku varu. Naproti tomu aromatické odrůdy se do mladiny přidávají obvykle ke konci procesu varu a poskytují pивu těkavé aromatické látky. Typickým příkladem aromatického chmele u nás je Sládek (Nance a Setzer, 2011; Mikyška a Jurková, 2018).

2.4.3.2 Chmelové výrobky

Původně se v pivovarnictví využíval sušený chmel ve formě šištic. Od 60. let 20. století se drtivá většina chmele zpracovává na chmelové pelety nebo extrakty za účelem snížení nákladů na dopravu a skladování, snadnější manipulace a přesnějšího dávkování. Nejjednodušší zpracování chmelových hlávek spočívá v jejich namletí na prášek, který je dále lisován do podoby granulí či pelet. Další možností úpravy chmelových šištic je jejich vylouhování v extrakčním činidle za vzniku chmelového extraktu. Nejběžněji používaným extrakčním činidlem je tekutý oxid uhličitý (Barth, 2013).

2.4.4 Pivovarské kvasinky

Kvalita piva z velké části závisí na aktivitě pivovarských kvasinek. Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které přeměňují zkvasitelné cukry získané ze sladu na ethanol a CO₂. Při této fermentaci se také vytvářejí další minoritní sloučeniny, jako například estery a vyšší alkoholy, které přispívají k charakteristické chuti piva. Přesný aromatický profil piva je ovlivněn teplotou fermentace, složením sladu a chmelu, dobou kvašení a dalšími proměnnými v procesu vaření piva (Capece *et al.*, 2018).

2.4.4.1 Svrchně kvašené vs. spodně kvašené pivo

Rozdíl mezi svrchně kvašeným a spodně kvašeným pivem spočívá především v typu použitých kvasinek a v teplotě, při které kvašení probíhá. Svrchně kvašené pivo (také známé jako „Ale“) se vyrábí pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které mají během kvašení tendenci stoupat na povrch fermentované mladiny. Svrchní kvasinky kvasí při vyšších teplotách, obvykle v rozmezí 14 až 25 °C. Proces fermentace je díky tomu rychlejší a dochází k produkci vyššího množství esterů, které pivu dodávají ovocné a květinové aroma (Capece *et al.*, 2018; Humia *et al.*, 2019).

Spodně kvašené pivo, běžně známé jako ležák, se vyrábí pomocí spodních pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus*, které se usazují na dně fermentační nádoby a kvasí při teplotách v rozmezí 5 až 13 °C. V důsledku nízké teploty je proces kvašení pomalejší a výsledné pivo obvykle obsahuje nižší koncentraci esterů, což mu dodává charakteristickou čistou chuť (Barth, 2013; Humia *et al.*, 2019).

Pokud je však fermentace prováděna za příliš nízkých teplot, může docházet k nedostatečné aktivitě kvasinek, což způsobuje hromadění nežádoucích vedlejších produktů, které mohou negativně ovlivnit chuť piva. Příkladem takového produktu je

diacetyl, známý také jako butan-2,3-dion. Jedná se o vicinální diketon, který pivu dodává nežádoucí máslovou příchut' (Wainwright, 1973; Gibson *et al.*, 2018).

2.4.5 Pomocné suroviny

Často se do piva kromě ječného sladu přidávají i další suroviny sloužící jako zdroj sacharidů a bílkovin. Hlavním důvodem jejich použití je snížení výrobních nákladů a úprava kvality piva (barva, chuť, stabilita pěny). Mezi takové přísady se například řadí nesladované obiloviny jako rýže, kukuřice, žito, pšenice, čirok, oves atd. Další pomocnou surovinou může být granulovaný cukr (sacharóza) či tekuté přísady jako jsou sirupy na bázi sacharózy, získané z cukrové řepy nebo třtiny, přidávající se do mladiny během chmelového varu (Rani a Bhardwaj, 2021).

Je třeba brát v úvahu typ použitého cukrového sirupu. V předchozích studiích bylo zjištěno, že po přidání maltózového sirupu, na rozdíl od glukózového, dochází během metabolismu maltózy k produkci nižších hladin esterů a vyšších alkoholů (propanol, isobutanol), což je žádoucí pro lepší fermentační výkon kvasinek a chuťový profil finálního piva (Younis a Stewart, 1999).

Nevýhodou těchto pomocných surovin je jejich nízká diastatická síla, tedy schopnost enzymů rozkládat škrob na jednodušší zkvasitelné cukry. Tento problém lze překonat aplikací komerčních exogenních enzymů (Bioglukanáza, Bioproteáza), ty však mohou negativně ovlivnit stabilitu pěny konečného produktu (Agu a Palmer, 1998).

2.5 Výroba piva

Samotný proces vaření piva je složitý a zahrnuje několik kroků. Hlavním cílem je přeměnit nerozpustný slad na rozpustný extrakt, který je fermentovatelný kvasinkami (Thesseling *et al.*, 2019).

2.5.1 Šrotování (mletí) a vystírání sladu

Prvním krokem při výrobě piva je rozemletí sladu. Vzniklý šrot je dále smíchán s vodou o teplotě 37 nebo 52 °C (v závislosti na konkrétním typu připravovaného piva) za vzniku sladového roztoku neboli vystírky (Hornsey, 1999).

2.5.2 Rmutování a scezování

Tento proces slouží k uvolnění enzymů obsažených ve sladu a rozkladu škrobu na zkvasitelné cukry. Počáteční teplota rmutování je obvykle 52 °C. Při této teplotě se aktivují proteázy a proteiny se štěpí na krátké peptidy a aminokyseliny, které slouží jako hlavní zdroj dusíku pro kvasinky během procesu fermentace. Dusík je nezbytný pro množení kvasinek a pro dosažení optimálního procesu kvašení. Nedostatek dusíku může vést k oslabení růstu kvasinek, nedostatečnému rozkladu cukrů, a tedy nízkému výkonu kvašení. Nadměrné množství dusíku může mít naopak negativní vliv na chuť a stabilitu piva (Krogerus a Gibson, 2013; Thesseling *et al.*, 2019).

Z vystírky se stává tzv. rmut, který se dále zahřívá na teplotu 62–64 °C, při které dochází ke ztekucení škrobu a k jeho štěpení na jednodušší cukry pomocí amyláz. Takto vzniklý rmut se poté zahřeje na 72 °C, což umožní další rozklad polysacharidů. Tímto procesem se získává maltóza (sladový cukr) a další zkvasitelné cukry. Nakonec se teplota rmutu zvýší na 78 °C, čímž se téměř veškerá enzymatická aktivita zastaví (Thesseling *et al.*, 2019).

Výsledný rmut je přečerpán do scezovací kádě, kde je jeho kapalná část oddělena od nerozpuštěných pevných zbytků, tzv. sladového mláta. Mláto slouží při scezování jako přirozený filtr. Konečným produktem je sladká světlá tekutina obsahující cukry, enzymy, a další složky, které byly uvolněny během rmutování. Tato tekutina se nazývá sladina (Briggs *et al.*, 2004).

2.5.3 Chmelovar

Sladina je převedena do varného kotle, kde je povařena spolu s chmelem za vzniku tzv. mladiny. Látky obsažené v chmelu se během varu uvolňují do sladiny a přispívají k výsledné chuti piva. Na začátku varu se přidávají hořké odrůdy chmele, které obsahují vysoké koncentrace α -kyselin. Tyto α -kyseliny jsou v průběhu varu přeměněny na iso- α -kyseliny, které pivu dodávají žádoucí hořkost. Ke konci varu se přidávají aromatické chmele, obsahující sloučeniny jako např. myrcen či linalool, které přispívají k charakteristické vůni piva (Bamforth, 2006; Thesseling *et al.*, 2019).

Během varu dochází k zahušťování mladiny a odpařování nežádoucích těkavých složek, jako je např. dimethylsulfid. Chmelovar také slouží ke sterilizaci a eliminaci mikroorganismů, čímž se minimalizuje riziko kontaminace piva (Goldammer, 2022).

2.5.4 Kvašení a zrání piva

Po varu musí být mladina rychle ochlazená na teplotu ideální pro spuštění fermentace (cca 8 °C). Do zchlazené mladiny jsou přidány pivovarské kvasinky, čímž se spouští proces hlavního kvašení. Při tomto procesu kvasinky přeměňují zkvasitelné cukry na alkohol, CO₂ a další složky ovlivňující chuť piva, jako např. estery. Mezi hlavní estery zodpovědné za ovocné aroma piv patří isoamylacetát (banánové aroma) a ethylhexanoát (ananasové aroma). Průměrná doba hlavního kvašení se pohybuje kolem 10 dní (Thesseling *et al.*, 2019).

Z prokvašeného piva se odeberou kvasinky a pivo se přemístí do ležáckých tanků, kde dozrává při nízkých teplotách (-1 °C až 5 °C) několik dní až týdnů. Během zrání jsou zbývající kvasinky stále metabolicky aktivní, což vede k produkci dalšího CO₂ a ethanolu, a zároveň dochází ke stabilizaci piva (Thesseling *et al.*, 2019; Goldammer, 2022).

Celý proces fermentace piva, včetně období zrání, může trvat od několika týdnů až po několik měsíců v závislosti na druhu piva a dalších faktorech, jako je teplota fermentace, typ použitých kvasinek atd. (Briggs *et al.*, 2004).

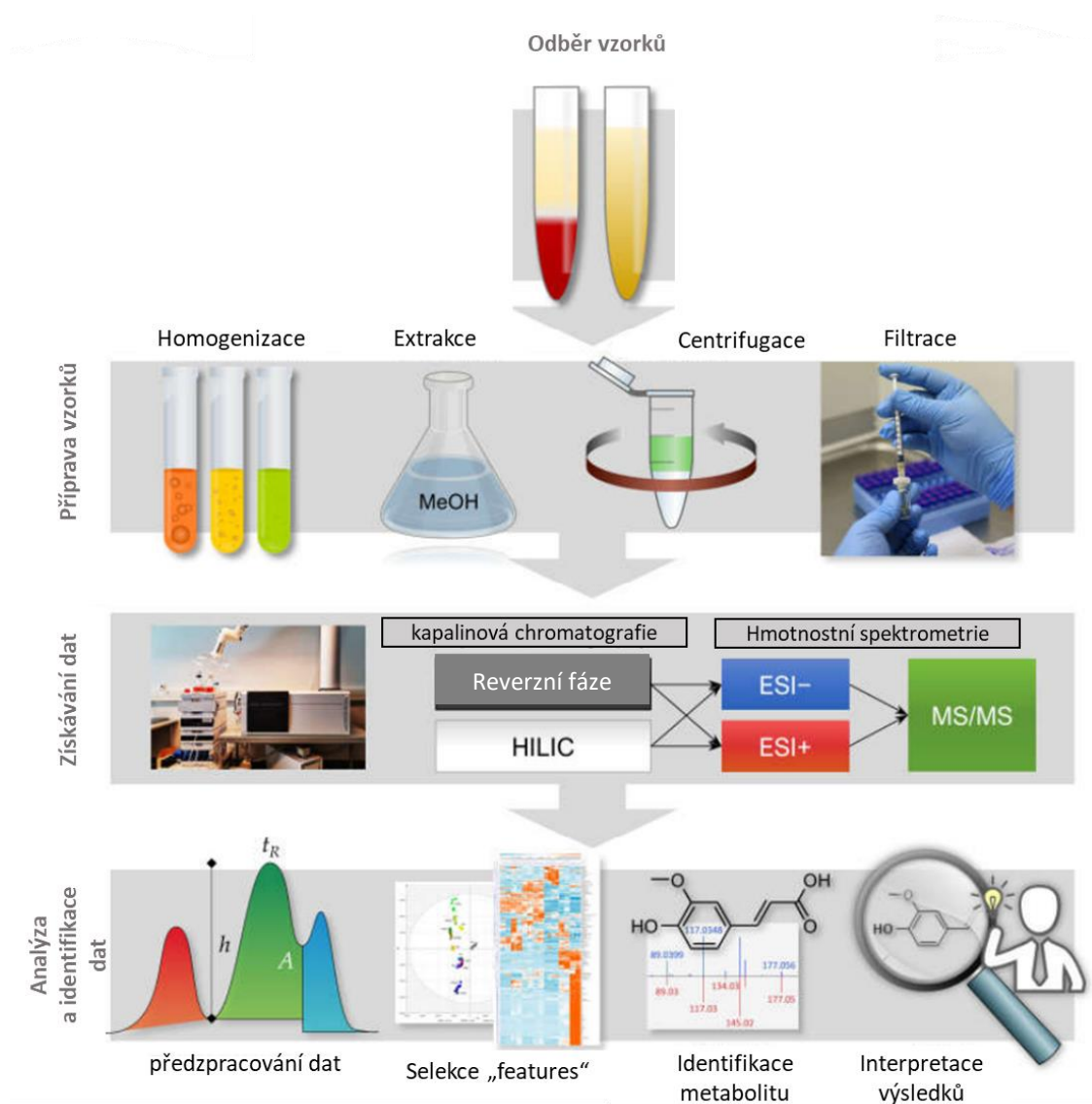
2.5.5 Filtrace a pasterizace piva

Před stáčením do lahví nebo sudů se pivo filtruje a pasterizuje. Cílem filtrace je odstranění zbytků kvasinek, nečistot a nežádoucích látek, které by mohly negativně ovlivnit chuť nebo stabilitu piva. Pasterizace, při které se pivo zahřívá na teplotu přibližně 60 °C, má za cíl zničit případné mikroorganismy a prodloužit trvanlivost piva. Filtrace ani pasterizace však není podmínkou a spousta pivovarů se rozhoduje je neprovádět kvůli možné ztrátě některých chuťových vlastností piva (Humia *et al.*, 2019; Goldammer, 2022).

2.6 Metabolomika

Metabolomika je obor zajišťující systematickou identifikaci a kvantifikaci všech metabolitů (sloučeniny s molekulovou hmotností zpravidla menší než 1500 Da) obsažených v daném organismu nebo biologickém vzorku. Jedná se jak o endogenní, tak o exogenní molekuly, které jsou produkty či substráty chemických reakcí v biologických systémech (Idle a Gonzales, 2007; Liu a Locasale 2017).

Existují dva základní přístupy metabolomické analýzy: metabolomika cílená a necílená. Cílená metabolomika umožňuje přesnou kvantifikaci známých, předem definovaných skupin metabolitů vykazujících specifickou biologickou aktivitu s použitím autentických analytických standardů. Na druhou stranu, necílená metabolomika je vysoce výkonná analýza všech možných metabolitů přítomných v dané sadě vzorků bez jakékoli předchozí znalosti metabolitů. Klíčovou výhodou necíleného přístupu oproti cílenému je umožnění identifikace nových oblastí metabolismu. Ke studiu metabolomu se obecně používá chromatografická separace s následnou citlivou detekcí pomocí UV či hmotnostní spektrometrie (MS). V případě necílené metabolomiky se k analýze molekulárního složení vzorku používá téměř vždy MS s vysokým rozlišením a přesností především kvůli lepší možnosti identifikace metabolitu na základě m/z (hmotnost/náboj). Obecný pracovní postup necílené metabolomické analýzy od odběru vzorků po identifikaci metabolitu je znázorněn na obrázku 7. V rámci metabolomických technik se často používá pojem „feature“. Feature odpovídá píku či signálu představující danou chemickou sloučeninu a je definován retenčním časem a poměrem m/z prekurzorového iontu. Jednomu metabolitu může odpovídat vícero features (Naz *et al.*, 2014; Liu a Locasale 2017).



Obrázek 7. Obecné schéma pracovního postupu necílené metabolické analýzy zahrnující odběr a přípravu vzorků, získávání dat, jejich analýzu a identifikaci. Převzato a upraveno podle: Klávus *et al.* (2020).

2.7 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

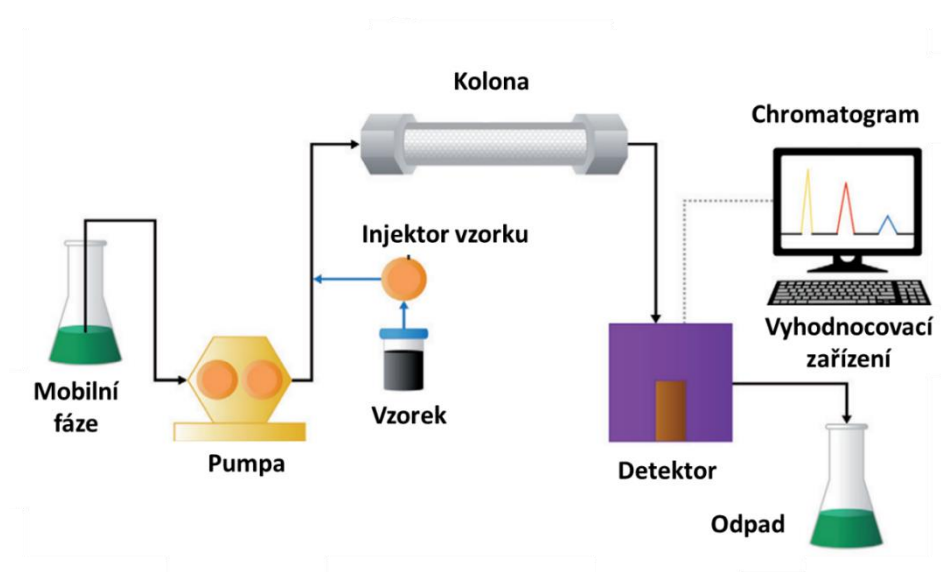
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, z anglického High Performance Liquid Chromatography) je analytická separační technika, při které jsou jednotlivé složky směsi separovány pomocí interakce mezi kapalnou mobilní fází (rozpuštědlem) a stacionární fází (náplní kolony). Mobilní fáze je při HPLC skrze chromatografickou kolonu poháněna pomocí čerpadel (pump). Jednotlivé složky vzorku (analyty) se dělí na základě jejich odlišné afinity ke stacionární fází v různých retenčních časech. Existují dva základní typy chromatografických technik – chromatografie na normální (NP) a reverzní fází (RP; Blum, 2014).

Chromatografie na normální fázi využívá kombinaci polární stacionární fáze (např. oxid křemičitý nebo oxid hlinitý) a nepolární mobilní fáze (např. hexan). V chromatografii na reverzní fázi (u HPLC běžněji používaná) je stacionární fáze nepolární povahy (nejčastěji 8-uhlíkové (C8) nebo 18-uhlíkové (C18) řetězce navázané na povrch pevného nosiče, např. silikagelu) a mobilní fáze naopak polární (voda, methanol či acetonitril). V případě NP jsou polární vzorky zadržovány kolonou silněji, což umožňuje eluci nejprve nepolárních sloučenin. Při RP se naopak nejdříve elují sloučeniny polární (Bélanger *et al.*, 1997; Blum 2014).

Pro změnu polarity mobilní fáze lze použít směs rozpouštědel. Pokud se složení směsi rozpouštědel v průběhu eluce nemění, mluvíme o izokratické eluci. V opačném případě se jedná o tzv. gradientovou eluci (Bélanger *et al.*, 1997).

Dalšími typy kolon v kapalinové chromatografii jsou např. aniontově/kationtově výměnné kolony (Strong Anion/Cation Exchange) a HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) kolony používané při oddělování a analýze sloučenin na základě jejich hydrofilních vlastností (Meyer, 2010).

Typický systém HPLC skládající se ze stacionární fáze, zásobníků mobilních fází, vysokotlaké pumpy, injektoru (dávkovač vzorku) a detektoru poskytujícího elektrický signál je znázorněn na obrázku 8. Nejběžnějšími detektory jsou spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr a refraktometr. Výstupem kapalinové chromatografie je chromatogram, zobrazující závislost intenzity detekovaných signálů na čase (Blum, 2014).



Obrázek 8. Typické schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Převzato a upraveno podle: Blum (2014).

2.8 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Kapalinová chromatografie může být přímo spojena s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). LC-MS je významný nástroj pro identifikaci neznámých látek a analýzu složení směsí, který poskytuje vysokou úroveň přesnosti a citlivosti. Z toho důvodu se široce využívá v mnoha různých oblastech, včetně farmacie, potravinářství či forenzní vědy (Bélanger *et al.*, 1997).

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Prvním krokem při MS analýze je tvorba iontů (ionizace). Iontový zdroj převádí analyty eluované z kolony do nabitého (ionizovaného) stavu. Nejčastěji používanou ionizační technikou je elektrosprejová ionizace (ESI; Pitt, 2009).

Princip ESI spočívá v aplikaci vysokého napětí (3-6 kV) na výstup kapiláry, kterou protéká roztok analytu. Působením silného elektrického pole se na špičce kapiláry vytváří nabitě kapičky, které jsou dále unášeny tokem plynu (obvykle dusíkem) a dochází tak k odpařování rozpouštědla. V důsledku toho se kapičky postupně zmenšují a jejich povrchový náboj se zvětšuje. Po překročení kritické hodnoty povrchového náboje (tzv. Rayleighův limit) se elektricky nabitě kapičky rozpadnou (tzv. Coulombická exploze) a uvolňují se jednotlivé ionty (Norková *et al.*, 2013; Awad *et al.*, 2014).

Vzniklé ionty dále postupují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Ionty nakonec dopadají na detektor a vzniklý signál je zaznamenán a interpretován jako hmotnostní spektrum (graf závislosti intenzity iontů na jejich m/z). Běžně používanými hmotnostními analyzátory jsou kvadrupólové analyzátory (Q, quadropole) a analyzátory doby letu (TOF, time-of-flight; Allwood a Goodacre, 2010).

2.8.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Pro identifikaci a kvantifikaci látek ve směsi je často využívána tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), poskytující fragmentační spektra vybraných iontů. Tato technika kombinuje dva (nebo více) hmotnostních analyzátorů zapojených v sérii za sebou. První analyzátor slouží k selekci a izolaci prekurzorových iontů, které jsou dále fragmentovány v kolizní cele pomocí kolizí indukované disociace. Fragmenty vzniklé disociací jsou analyzovány druhým analyzátozem a jejich intenzita je zaznamenána detektorem. Typickým příkladem hybridního analyzátoru je kvadrupólový analyzátor spojený s analyzátozem doby letu (QTOF; Hoffmann, 1996; El-Aneed, 2009).

Tandemová hmotnostní spektrometrie je často využívána v různých oblastech, jako je farmakologie, toxikologie, proteomika a metabolomika (Mittal, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

V experimentu bylo analyzováno 31 vzorků lahvových piv a 5 vzorků plechovkových piv. Za účelem sledování změn metabolitů během procesu vaření svrchně kvašeného 14° piva a spodně kvašeného 11° piva byly v místním minipivovaru odebírány vzorky v různých fázích varného procesu (sladina, mladina). Vstupní suroviny, tzn. sladový ječmen (*Hordeum vulgare* L.), granulovaný chmel (*Humulus lupulus*) a pivovarské kvasnice (pro spodní kvašení *Saccharomyces pastorianus*, pro svrchní kvašení *Saccharomyces cerevisiae*) byly také poskytnuty od místního minipivovaru. Bylo odebráno celkem 7 odrůd chmele. Spodně kvašené pivo bylo chmeleno 3 odrůdy chmele - Premiant, Žatecký poloraný červeňák a Kazbek. Na svrchně kvašené pivo bylo použito 6 odrůd chmele – Premiant, Kazbek, Ekuanot, Cascade, Citra a Crystal. Všechny vzorky byly vloženy do 2 ml mikrozkušavek Eppendorf a před LC-MS analýzou skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě - 80 °C.

3.2 Chemikálie

- Acetonitril $\geq 99,9$ % gradient grade pro LC-MS a pro extrakci (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Methanol $\geq 99,9$ % pro extrakci (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Deionizovaná destilovaná voda upravena pomocí zařízení SimplicityTM 185 water purification system (Millipore Corp., Billerica, USA)
- Lockspray leucin-enkefalin 5 ng/ μ l pro MS (Waters, Milford, USA)

3.3 Přístroje

- Analytické váhy Pioneer PA214C (Ohaus, Parsippany, USA)
- Rotační centrifuga Micro Star 17 (VWR, Avantor, Radnor, USA)
- Dusíková odparka TurboVap® LB (Biotage, Uppsala, Švédsko)
- Kulový mlýnek Verder MM400, Retsch® GmbH & Co. KG (Retsch GmbH, Haan, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (VWR International, Radnor, USA)
- Vortex Mixer typ WIZARD, Velp Scientifica (Usmate, MB, Itálie)

- UHPLC-MS/MS systém (Waters, Milford, MA, USA) s PDA detektorem (Acquity Ultra Performance), Sample managerem (FTN Acquity UPLC) a s pumpami (Quaternary Solvent manager Acquity UPLC Class H)
- Hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si (Waters, Milford, USA) vybavený ESI iontovým zdrojem
- Software MassLynx™ pro zpracování dat (verze 4.0, Waters, Milford, MA, USA)
- Separace probíhala na koloně s reverzní fází (RP) Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 (1.7 µm, 2,1 x 150 mm; Milford, MA, USA)
- Membránové 0,2 µm mikrofiltry RC Micro Spin Filter (Ciro Manufacturing Corp., Deerfield Beach, USA)

3.4 Navážení a extrakce pevného materiálu

Tuhý lyofilizovaný materiál (ječmen a granulovaný chmel) byl homogenizován ve třecí misce a navážen do 2 ml mikrozkušavek Eppendorf. Navážka každého vzorku se pohybovala kolem 20 mg DW (přesná váha vzorků byla zaznamenána).

Do každé mikrozkušavky s homogenizovaným materiálem byl přidán 1 ml 100 % acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly protřepány, homogenizovány v kulovém mlýnku se skleněnými kuličkami (27 Hz po dobu 10 min) a následně vloženy do ultrazvukové lázně na dobu 10 min. Poté byla provedena centrifugace vzorků (13 300 rpm, 10 min). Po centrifugaci následovalo odpaření vzniklých supernatantů pod dusíkem na dusíkové odparce při 37 °C. K získaným odparům bylo přidáno 200 µl 20 % methanolu. Vzorky chmele byly 50krát zředěny pomocí 20 % methanolu a protřepány. Vzorky ječmene zůstaly nezředěné.

Nakonec byly extrakty přefiltrovány přes membránové RC filtry (z recyklované celulózy) s póry o průměru 0,2 µm pomocí centrifugace (1 500 rpm, 3 min) a přepipetovány do vialek s inzertkou pro LC-MS analýzu.

3.5 Prekoncentrace vzorků piva, sladiny, mladiny a kvasnic

Vzorky piva, meziproductů a kvasnic byly prekoncentrovány přidáním 900 µl 100 % acetonitrilu (ACN). Vzorky piva byly protřepány na vortexu a ihned centrifugovány (13 300 rpm, 5 min). Vzorky sladiny, mladiny a kvasnic byly po protřepání nejdříve vloženy na 5 min do ultrazvukové lázně a následně do centrifugy (13 300 rpm, 5 min). Vzniklé supernatanty byly přeneseny do nových zkumavek Eppendorf a odpařeny v dusíkové odparce (37 °C). K odpařeným vzorkům piva, sladiny a mladiny bylo přidáno

200 μ l 20 % methanolu. K odpařeným vzorkům kvasnic byl přidán 1 ml 20 % methanolu. Všechny vzorky byly opět protřepány. Vzorky sladiny, mladiny a kvasnic byly navíc vloženy do ultrazvukové lázně (5 min). Následovalo přefiltrování extraktů přes 0,2 μ m membránové RC filtry, centrifugace (1 500 rpm, 3 min) a jejich přepipetování do vialek s inzertkou pro LC-MS analýzu.

3.6 Necílená LC-MS analýza

Separace byla provedena pomocí LC systému a následná detekce pomocí hmotnostního spektrometru s hybridním kvadrupól/průletovým analyzátozem vybaveným elektrosprejem (QTOF-ESI-MS).

4 μ l každého vzorku byly nastříknuty na chromatografickou kolonu Acquity UPLC[®] BEH C18 (1,7 μ m; 2,1 x 150 mm) s výjimkou vzorků kvasnic, kdy byl nástříkový objem 10 μ l. Teplota kolony odpovídala 30 °C a teplota vzorků 4 °C. Separace probíhala s využitím gradientu mobilní fáze (MF) ve 22 minutách. Gradient MF se skládal z acetonitrilu (A) a 5 mM kyseliny mravenčí (B) při průtoku 0,25 ml/min (Tab. 1).

Tab. 1: Složení gradientu mobilní fáze obsahující acetonitril (ACN; MF A) a kyselinu mravenčí (MF B)

Čas (min)	Průtok (μ l/min)	ACN (%)	5 mM HCOOH (%)
0	250	5	95
0,1	250	5	95
1	250	10	90
12	250	35	65
17	250	70	30
17,5	250	100	0
19	250	100	0
19,5	250	5	95
22	250	5	95

Detekce jednotlivých látek byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru Synapt G2-Si s QTOF hybridním analyzátozem s elektrosprejovou ionizací v negativním módu (ESI-). Podmínky pro MS jsou uvedeny v tabulce 2. Data z analyzátoru byla zaznamenána v režimu Data Dependent Acquisition (DDA). Měřený hmotnostní rozsah pro fragmentační (MS/MS) spektra byl 50–1500 Da.

Tab. 2: Podmínky pro MS analýzu a nastavení iontového zdroje

Parametr	Nastavení
Napětí kapiláry	2 000 V
Teplota zdroje	120 °C
Napětí na kóně (cone voltage)	15 000 V
Desolvatační teplota	500 °C
Průtok desolvatačního plynu	10 l/min
Průtok plynu na kóně (cone gas)	0,5 l/min
Rozsah měřených hmotnostní (m/z)	50-1500 Da
Zmlžující plyn	N ₂
Kolizní energie	20 eV

3.7 Statistické a bioinformatické vyhodnocení dat

3.7.1 Úprava surových dat

Surová data získána po MS analýze byla zaznamenána formou tabulky (Microsoft Excel). Celkem bylo detekováno 10 682 features (signálů) charakterizovaných m/z hodnotou a retenčním časem. Filtrace dat probíhala ve dvou krocích. Nejprve byly všechny features s intenzitou menší než 150 (šum přístroje) nahrazeny hodnotou 150. Z takto získaných features byly vybrány pouze ty, jejichž plocha byla v alespoň 1 vzorku větší než 2000. Touto úpravou bylo nakonec získáno finálních 843 features, se kterými jsme dále pracovali.

3.7.2 Formulace a statistické vyhodnocení hypotéz

Bylo formulováno celkem 6 hypotéz. Společným předpokladem je, že lze odlišit vybrané skupiny pív na základě metabolomu (filtrovaná vs. nefiltrovaná piva, svrchně kvašená vs. spodně kvašená piva, zahraniční vs. česká piva, piva obsahující přidaný cukr vs. piva bez

přidaného cukru, nízkostupňová vs. vysokostupňová piva a plechovková piva vs. identická lahvová piva).

Mezi vybranými 2 skupinami byl zjišťován statisticky významný rozdíl v koncentraci (ploše) pro každou feature pomocí Studentova nepárového t-testu s využitím FDR (False discovery rate) korekce. Pro porovnávání plechovkových piv s identickými pivy ve skle byl použit oboustranný párový t-test. Hladina významnosti α odpovídala 0,05.

3.7.3 Identifikace metabolitů

Statisticky významné features byly manuálně vyhodnoceny softwarem MassLynx™ (ver. 4.0). Postup identifikace zahrnoval určení molekulárních iontů a elementárního složení vybraných molekul a následné porovnání jejich MS/MS spekter s autentickými standardy (úplná identifikace struktury metabolitu) nebo s MS/MS spektry v databázi METLIN Metabolomics (předběžná strukturní identifikace).

4 VÝSLEDKY

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu vztahů mezi pivním metabolomem, typem piva, způsobem výroby (svrchní a spodní kvašení) a vstupními surovinami. Hlavním cílem bylo zjistit, zda jsme schopni rozlišit různé druhy piva na základě jejich metabolomu pomocí necílené LC-MS analýzy s následným statistickým a bioinformatickým vyhodnocením.

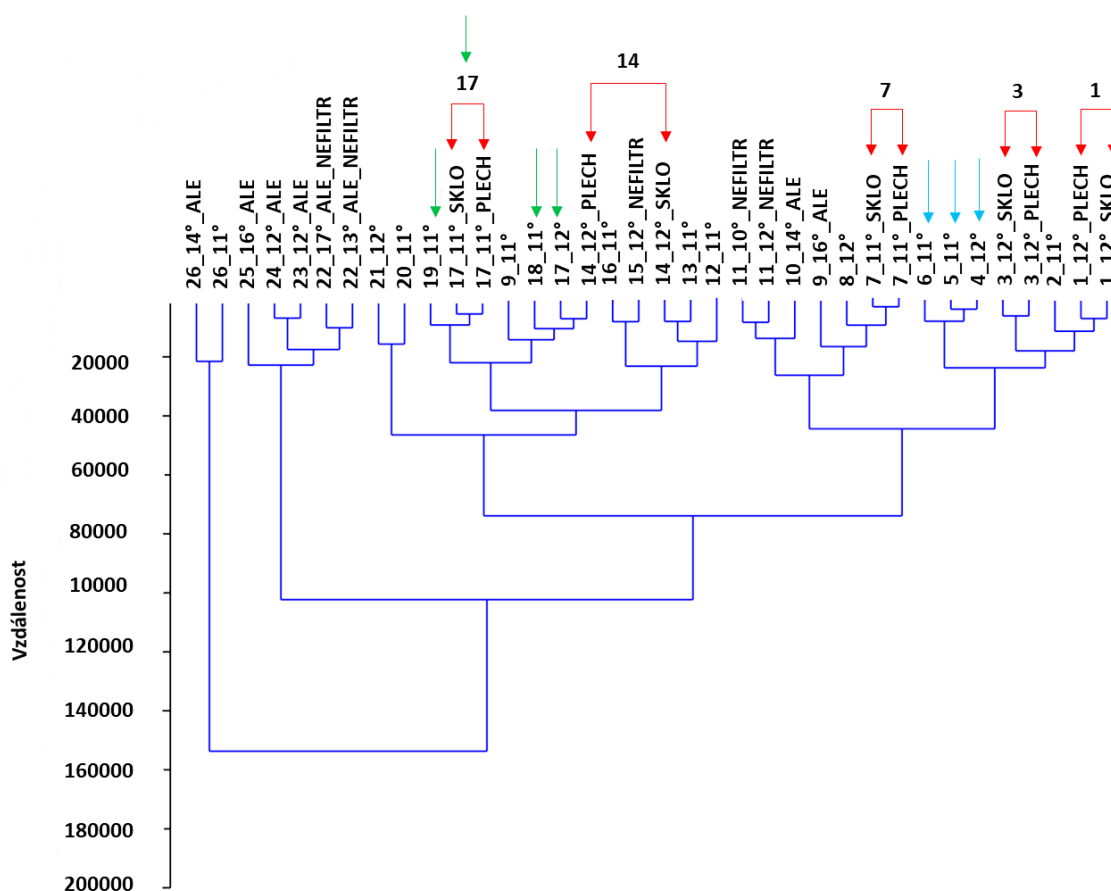
Za tímto účelem bylo stanoveno několik hypotéz spočívajících v odlišení různých typů/druhů piv na základě metabolomu:

- filtrovaná vs. nefiltrovaná piva
- svrchně kvašená vs. spodně kvašená piva
- zahraniční vs. česká piva
- piva obsahující přidaný cukr vs. piva bez přidaného cukru
- nízkostupňová vs. vysokostupňová piva
- plechovková piva vs. identická lahvová piva.

4.1 LC-MS analýza

Pomocí LC-MS v negativním ionizačním módu byly získány chromatogramy celkem 50 vzorků (36 vzorků piv, 1 vzorek sladu, 7 vzorků chmele, 2 vzorky sladiny, 2 vzorky mladiny a 2 vzorky kvasnic). Metabolomickým softwarem byl vygenerován seznam 10 682 detekovaných features. Tyto features byly dále filtrovány postupem popsáním v kapitole 3.7.1. Filtrace spočívala v nahrazení features s nízkou intenzitou (hodnotou šumu) a v odstranění features s maximální plochou < 2000 . Filtrací bylo získáno 843 features, které byly použity na následnou analýzu. Jedním z důvodů nahrazení je eliminace nulových hodnot, které negativně ovlivňují statistickou analýzu.

4.2 Shluková analýza



Obrázek 9. Výsledek hierarchické shlukové analýzy Wardovou metodou (software PAST 4.11). Kód odpovídá XX_YY°_ABC, kde XX = značka pivovaru, YY° = stupňovitost a ABC = typ piva. ALE = svrchně kvašené pivo. Pokud není uveden typ piva, jedná se o spodně kvašené filtrované pivo. Červené šipky označují identická piva lišící se obalovým materiálem. Piva spadající vždy pod jednu společnost jsou označena zelenými a modrými šipkami.

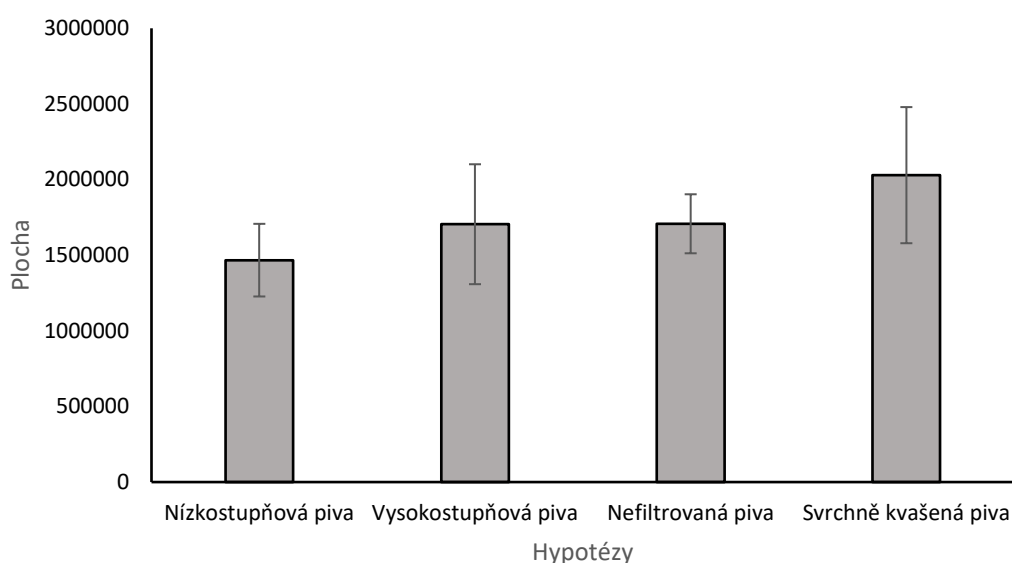
Pomocí shlukové analýzy byla potvrzena schopnost rozlišit různé druhy piva na základě metabolomu. Tato analýza umožnila nalezení podobnosti mezi 36 různými pivy. Čím větší je vzdálenost jednoho shluku od druhého, tím menší podobnost mezi těmito shluky (pivy) je.

Výstupem této analýzy je tzv. dendrogram (Obr. 9). Je zřejmé, že stejná plechovková a lahvová piva (lišící se pouze obalovým materiálem) se vždy shlukují spolu (piva 1, 3, 7 a 17) až na jednu výjimku (piva 14). Značná podobnost je také mezi pivy 17, 18 a 19 (zelené šipky). Tato piva jsou sice vyráběna různými pivovary, ale bylo zjištěno, že spadají pod jednu pivovarskou společnost. Stejný případ pozorujeme v případě piv 4, 5 a 6 (modré šipky) – různé pivovary součástí jedné pivovarské společnosti.

Piva z místního minipivovaru (26) se výrazně liší od všech ostatních piv, a to jak v případě spodně kvašeného 11° piva, tak v případě svrchně kvašeného 14° piva.

4.3 Průměrné množství extrahovaných látek u různých druhů piv

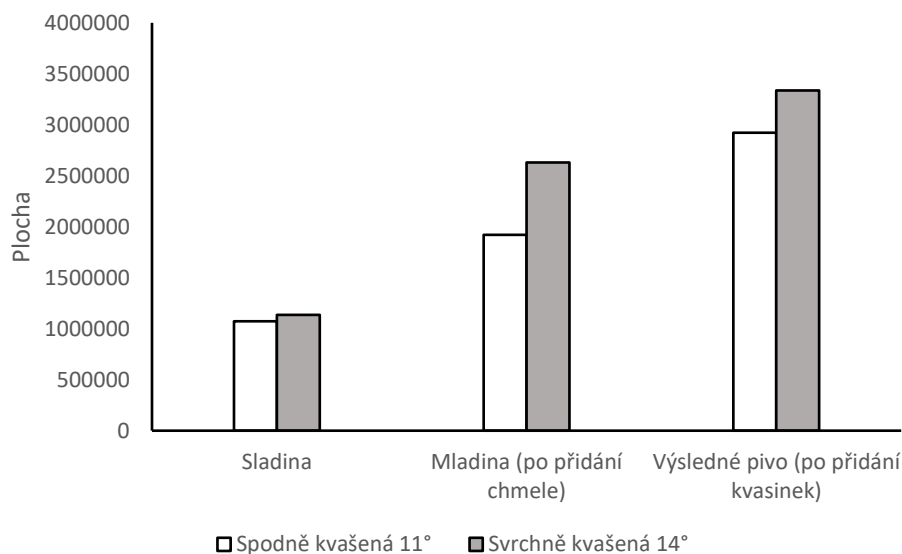
Bylo srovnáno průměrné množství rozpuštěných látek v různých pivech. Obsah těchto látek se mezi jednotlivými skupinami piv liší, přičemž nejvyšší obsah je pozorován v nízkostupňových pivech (Obr. 10).



Obrázek 10. Srovnání průměrného množství extrahovaných látek u různých druhů piv. Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka ($n = 5-13$).

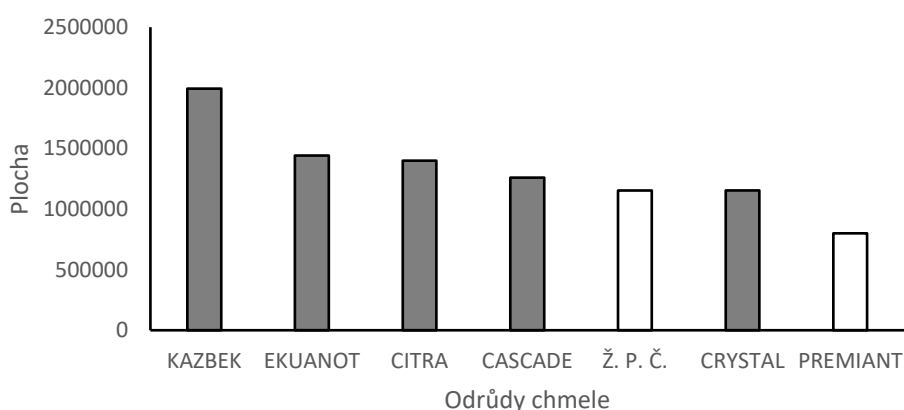
4.4 Množství rozpuštěných látek v různých fázích přípravy piva

Byl charakterizován nárůst rozpuštěných látek v průběhu přípravy dvou odlišných piv (spodně kvašené nízkostupňové vs. svrchně kvašené vysokostupňové pivo). Za tímto účelem byly kromě finálního piva analyzovány také vzorky sladín, mladín a kvasnic. Koncentrace rozpuštěných látek je u spodně kvašeného 11° piva nižší ve všech fázích procesu výroby oproti svrchně kvašenému pivu (Obr. 11).



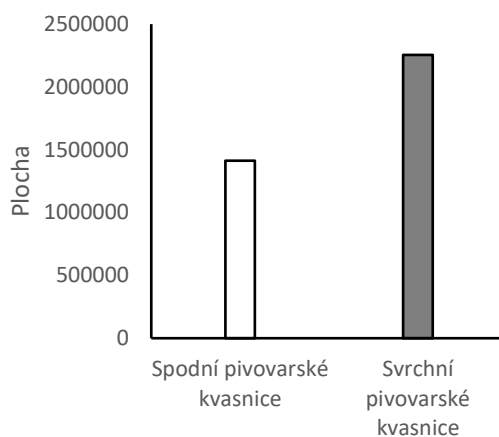
Obrázek 11. Srovnání celkové koncentrace extrahovaných látek v různých fázích vaření spodně a svrchně kvašeného piva. Mladina spodně kvašeného 11° piva obsahuje 3 druhy chmele. Mladina svrchně kvašeného 14° piva obsahuje 6 druhů chmele.

Do spodně kvašeného piva byly přidány 3 druhy chmele (Premiant, Žatecký poloraný červeňák, Kazbek), z toho jeden byl aromatický (Kazbek). Svrchně kvašené pivo bylo chmeleno 6 odrůdami chmele (Kazbek, Premiant, Ekuanot, Cascade, Citra, Crystal), z toho 5 z nich bylo aromatických (Kazbek, Ekuanot, Cascade, Citra, Crystal). V aromatických chmelech (šedé sloupce; Obr. 12) se obvykle nachází větší množství rozpuštěných látek než ve chmelech méně aromatických, vyznačujících se vyšší hořkostí (bílé sloupce).



Obrázek 12. Celková koncentrace extrahovaných látek v aromatických (šedé sloupce) a méně aromatických (bílé sloupce) odrůdách chmele. Ž.P.Č = Žatecký poloraný červeňák.

Spodní pivovarské kvasinky, které jsou aktivní při nižších teplotách, vykazují nižší obsah celkových rozpuštěných látek ve srovnání se svrchními kvasinkami, které kvasí při vyšších teplotách (Obr. 13).

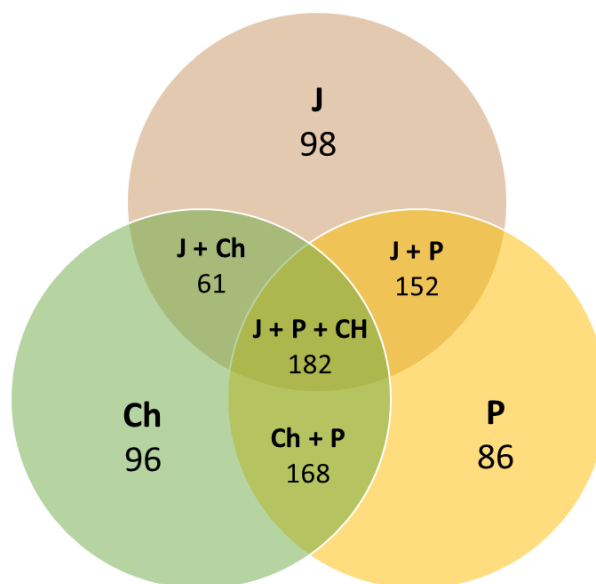


Obrázek 13. Celková koncentrace extrahovaných látek u kvasinek použitých pro spodní (bílý sloupec) a svrchní (šedý sloupec) kvašení.

4.5 Metabolom piva a vstupních surovin

Bylo zjištěno, kolik metabolitů ze dvou hlavních vstupních surovin (ječmen a chmel) přechází do finálního piva. Z ječmene i z chmele přechází do výsledného produktu podobný počet features (Obr. 14).

Ve finálním pivu bylo detekováno 86 features, které nepocházejí ani z ječmene, ani z chmele. V pivu se vyskytuje celkem 182 features pocházejících současně z ječmene i chmele. Obě suroviny tedy obsahují stejné metabolity, které přecházejí do výsledného piva.



Obrázek 14. Vennův diagram ilustrující celkový počet features detekovaných v ječmeni (J), chmelu (Ch) a samotném spodně kvašeném pivu (P). J – features detekovány pouze v ječmeni, nikoli v pivu; Ch – features detekovány pouze v chmelu, nikoli v pivu; P – features detekovány pouze ve výsledném pivu (po přidání kvasinek). J+P – features detekovány v ječmeni i v pivu; Ch+P – features detekovány v chmelu i v pivu; J+P+CH – features detekovány v ječmeni, v chmelu a ve výsledném pivu. Výsledky použity pouze pro 843 nejintenzivnějších features.

4.6 Metabolity rozlišující od sebe různé druhy piv

Hlavním cílem výzkumu byla identifikace metabolitů, jejichž koncentrace se mezi jednotlivými druhy piv významně liší. Námi stanovené hypotézy byly ověřeny pomocí Studentova t-testu s FDR korekcí. Pro každou hypotézu bylo získáno několik statisticky významných features (píků; s výjimkou plechovkových a lahvových piv), kdy každá feature odpovídala jednomu konkrétnímu metabolitu. U nejintenzivnějších features, současně majících MS/MS spektrum, byla pomocí bioinformatické analýzy provedena buď předběžná identifikace příslušných metabolitů (porovnáním MS/MS spekter s databází či literaturou) nebo jejich úplná strukturní identifikace srovnáním retenčních časů a MS/MS spekter s autentickými standardy. U některých látek bylo zjištěno pouze jejich elementární složení, dále se je identifikovat nepodařilo.

Počet všech signifikantních features a features vybraných k identifikaci je zaznamenán v tabulce 3. Podařilo se nám identifikovat celkem 6 látek, z toho 3 byly identifikovány úplně srovnáním s autentickými standardy. Zjištěné elementární složení látek, případně jejich strukturní charakterizace, je shrnuto v tabulkách 4-8. Průměrné zastoupení

některých z těchto látek v jednotlivých druzích piv je vyjádřeno formou grafů (Obr. 15, 16, 18, 19, 20). Pro 6 identifikovaných látek byla naměřena fragmentační spektra (Obr. 17, přílohy 1-5) . Piva z minipivovaru (26) byla pro tuto analýzu vynechána.

Tab. 3: Počty všech signifikantních features a features vybraných k identifikaci pro jednotlivé hypotézy

Hypotéza	Počet všech signifikantních features	Počet nejintenzivnějších signifikantních features vybraných k identifikaci
Filtrovaná vs. nefiltrovaná piva	8	1
Spodně kvašená vs. svrchně kvašená piva	34	6
Zahraniční piva vs. česká piva	28	4
Piva obsahující přidaný cukr vs. piva bez přidaného cukru	12	3
Nízkoprocentní vs. vysokoprocentní piva	5	3

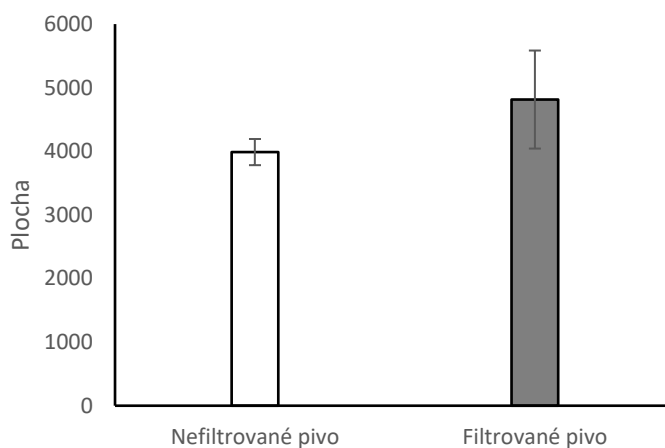
4.6.1 Filtrovaná vs nefiltrovaná piva

Pro srovnání filtrovaných vs. nefiltrovaných piv bylo určeno 8 signifikantních features, z nichž nejintenzivnější byla vybraná k identifikaci. Předpokládané složení tohoto metabolitu je znázorněno v tabulce 4.

Tab. 4: Seznam vybraného metabolitu, jehož koncentrace se významně liší mezi filtrovanými a nefiltrovanými pivy. Rozdíl byl proveden studentovým t-testem s FDR korekcí na hladině významnosti α 0,05. Necílená metabolomická analýza byla provedena pomocí LC-ESI-TOF-MS v negativním ionizačním módu.

Filtrované vs. nefiltrované pivo					
Naměřená m/z	Teoretická m/z	Chybová hodnota (mDa)	RT [min]	Předpokládané elementární složení molekuly	Anotace
323,1345	323,1342	0,3	5,76	$C_{13}H_{24}O_9$	—

Průměrná koncentrace látky $C_{13}H_{24}O_9$ je u nefiltrovaných piv o 17 % nižší než u piv filtrovaných (Obr. 15). Tento rozdíl je statisticky signifikantní.



Obrázek 15. Srovnání průměrných ploch látky $C_{13}H_{24}O_9$ ve filtrovaném a nefiltrovaném pivu. Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka ($n = 5-29$).

4.6.2 Spodně kvašená vs svrchně kvašená piva

Pro srovnání spodně kvašených vs. svrchně kvašených piv bylo určeno 34 signifikantních features, z nichž 6 nejintenzivnějších bylo vybráno k identifikaci. Kyselina ferulová byla identifikována pomocí autentického standardu (AS), kyselina trihydroxy oktadecenová (TriHOME) a kyselina fenylmléčná byly identifikovány pomocí databáze. U tří látek bylo zjištěno pouze jejich předpokládané elementární složení (Tab. 5)

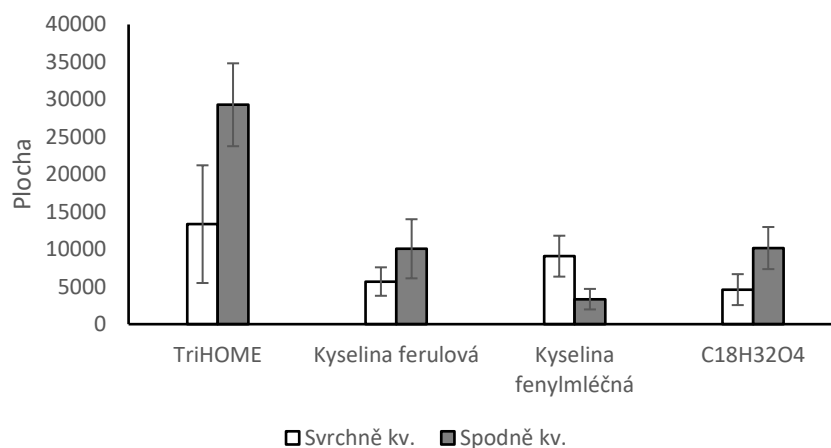
Tab. 5: Seznam vybraných metabolitů, jejichž koncentrace se významně liší mezi spodně a svrchně kvašenými pivy. Rozdíl byl proveden studentovým t-testem s FDR korekcí na hladině významnosti α 0,05. Necílená metabolická analýza byla provedena pomocí LC-ESI-TOF-MS v negativním ionizačním módu

Spodně kvašené vs. svrchně kvašené pivo					
Naměřená hodnota m/z	Teoretická hodnota m/z	Chybová hodnota (mDa)	RT [min]	Předpokládané elementární složení molekuly	Anotace
299,1984	299,1971	1,3	16,77	$C_{15}H_{28}N_2O_4$	—
311,2229	311,2222	0,7	18,38	$C_{18}H_{32}O_4$	—
329,2332	329,2328	0,4	17,53	$C_{18}H_{34}O_5$	TriHOME (kyselina trihydroxy oktadecenová) ^b
193,0509	193,0501	0,8	9,14	$C_{10}H_{10}O_4$	Kyselina ferulová ^a
165,0557	165,0552	0,5	8,76	$C_9H_{10}O_3$	kyselina fenylmléčná ^b
363,1815	363,1808	0,7	15,51	$C_{20}H_{28}O_6$	—

^astrukturní identifikace pomocí autentického standardu

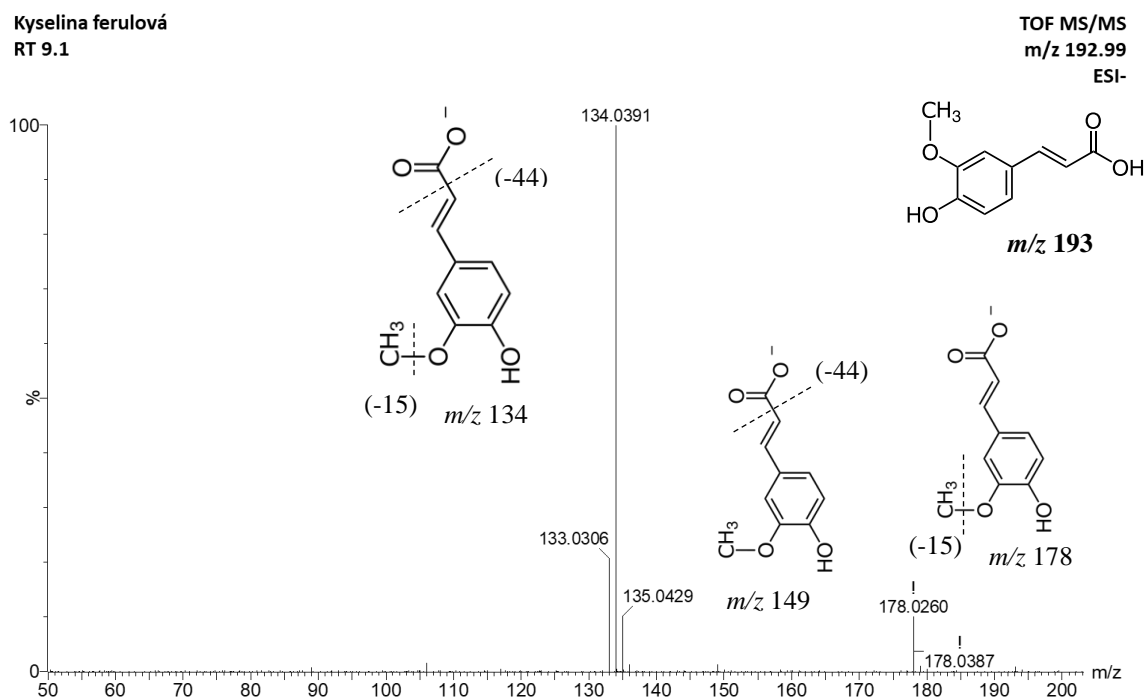
^bpředběžná identifikace pomocí databáze (na základě porovnání MS/MS spekter)

Nejvýraznější rozdíl byl zjištěný u látky TriHOME a kyseliny fenylmléčné. U svrchně kvašených piv je koncentrace látky TriHOME o 54 % nižší než v případě spodně kvašených piv. Koncentrace kyseliny fenylmléčné je naopak nižší u spodně kvašených piv, a to o 63 % (Obr. 16). Tento rozdíl je statisticky signifikantní.



Obrázek 16. Srovnání průměrných ploch kyseliny trihydroxy oktadecenové (TriHOME), ferulové, fenylmléčné a látky C₁₈H₃₂O₄ ve spodně a svrchně kvašeném pivu. Zobrazené hodnoty odpovídají průměru ± směrodatná odchylka (n = 7-27).

Kyselina ferulová patří mezi hlavní fenolové kyseliny vyskytující se v buněčných stěnách jednoděložných rostlin, hlavně v obalových vrstvách obilného zrna. Deprotonovaná ([M-H]⁻) kyselina ferulová produkuje po disociaci vyvolané kolizí typický fragmentační vzor, charakterizovaný ztrátou CO₂ (-44), methylového radikálu (-15) a jejich kombinací (-59; Obr. 17).



Obrázek 17. Fragmentační spektrum kyseliny ferulové měřené v negativním ionizačním módu s kolizní energií 20 eV, rozlišující od sebe jak svrchně a spodně kvašená piva, tak zahraniční a česká piva. Prekursorový ion [M-H]⁻ s hodnotou m/z 193.

4.6.3 Zahraniční vs. česká piva

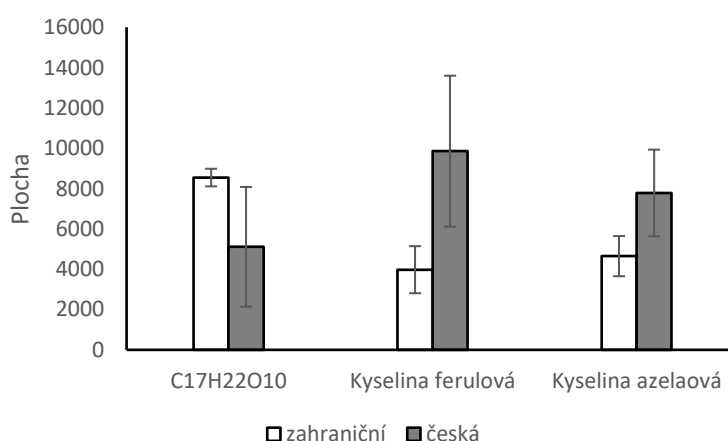
Pro srovnání zahraničních vs. českých piv bylo určeno 28 signifikantních features, z nichž 4 nejintenzivnější byly vybrány k identifikaci. Kyselina ferulová a azelaová byly identifikovány pomocí AS. U zbývajících dvou látek bylo zjištěno pouze jejich předpokládané elementární složení (Tab. 6).

Tab. 6: Seznam vybraných metabolitů, jejichž koncentrace se významně liší u zahraničních a českých piv. Rozdíl byl proveden studentovým t-testem s FDR korekcí na hladině významnosti α 0,05. Necílená metabolická analýza byla provedena pomocí LC-ESI-TOF-MS v negativním ionizačním módu

Zahraniční piva vs. česká piva					
Naměřená hodnota m/z	Teoretická hodnota m/z	Chybová hodnota (mDa)	RT [min]	Předpokládané elementární složení molekuly	Anotace
193,0509	193,0501	0,8	9,14	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Kyselina ferulová ^a
385,1140	385,1135	0,5	8,40	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	—
229,0983	229,0977	0,6	7,07	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	—
187,0979	187,0970	0,9	11,01	C ₉ H ₁₆ O ₄	Kyselina azelaová ^a

^astrukturní identifikace pomocí autentického standardu

Nejvýraznější rozdíl byl zjištěný u kyseliny ferulové. V zahraničních pivech je koncentrace této látky o 60 % nižší než v pivech českých (Obr. 18). Tento rozdíl je statisticky signifikantní.



Obrázek 18. Srovnání průměrných ploch látky C₁₇H₂₂O₁₀, kyseliny ferulové a azelaové v zahraničním a českém pivu. Zobrazené hodnoty odpovídají průměru ± směrodatná odchylka (n = 4-30).

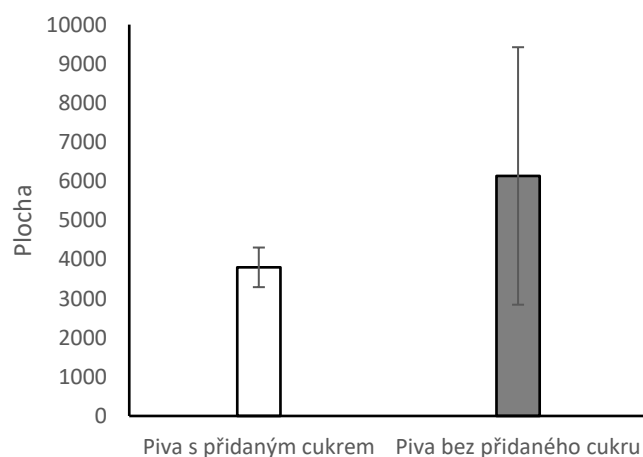
4.6.4 Piva s přidaným cukrem vs. piva bez přidaného cukru

Pro srovnání piv s přidaným cukrem vs. piv bez něj bylo určeno 12 signifikantních features, z nichž 3 nejintenzivnější byly vybrány k identifikaci. Ani jednu látku se nepodařilo anotovat. Předpokládané elementární složení těchto látek je uvedeno v tabulce 7.

Tab. 7: Seznam vybraných metabolitů, jejichž koncentrace se významně liší u piv s přidaným cukrem a u piv bez něj. Rozdíl byl proveden studentovým t-testem s FDR korekcí na hladině významnosti α 0,05. Necílená metabolická analýza byla provedena pomocí LC-ESI-TOF-MS v negativním ionizačním módu.

Piva s přidaným cukrem vs. piva bez přidaného cukru					
Naměřená hodnota m/z	Teoretická hodnota m/z	Chybová hodnota (mDa)	RT [min]	Předpokládané elementární složení molekuly	Anotace
371,0972	371,0978	0,6	7,78	$C_{16}H_{20}O_{10}$	—
385,1140	385,1135	0,5	8,40	$C_{17}H_{22}O_{10}$	—
277,1196	277,1188	0,8	8,29	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	—

Průměrná koncentrace vybrané látky $C_{17}H_{22}O_{10}$ je u piv s přidaným cukrem o 38 % nižší než u piv bez cukru (Obr. 19). Tento rozdíl je statisticky signifikantní.



Obrázek 19. Srovnání průměrných ploch látky $C_{17}H_{22}O_{10}$ v pivu s přidaným cukrem a v pivu bez něj. Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka ($n = 9-25$).

4.6.5 Nízkoprocentní vs vysokoprocentní piva

Pro srovnání nízkoprocentních vs. vysokoprocentních piv bylo určeno 5 signifikantních features, z nichž 3 nejintenzivnější byly vybrány k identifikaci. Kyselina kumarová byla identifikována pomocí AS, kyselina trihydroxy oktadekadienová (TriHODE) byla identifikována pomocí databáze a u zbývající látky bylo zjištěno pouze její předpokládané elementární složení (Tab. 8).

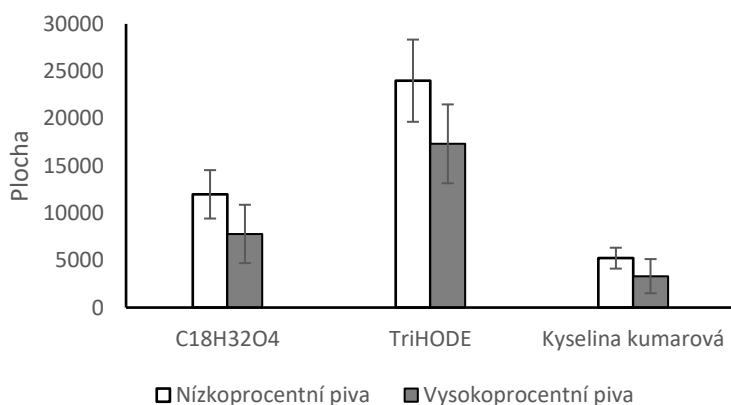
Tab. 8: Seznam vybraných metabolitů, jejichž koncentrace se významně liší u nízkoprocentních a vysokoprocentních piv. Rozdíl byl proveden studentovým t-testem s FDR korekcí na hladině významnosti α 0,05. Necílená metabolická analýza byla provedena pomocí LC-ESI-TOF-MS v negativním ionizačním módu.

Nízkoprocentní piva vs. vysokoprocentní piva					
Naměřená hodnota m/z	Teoretická hodnota m/z	Chybová hodnota (mDa)	RT [min]	Předpokládané elementární složení molekuly	Anotace
311,2229	311,2222	0,7	18,38	$C_{18}H_{32}O_4$	—
327,2174	327,2171	0,3	15,43	$C_{18}H_{32}O_5$	TriHODE (kyselina trihydroxy oktadekadienová) ^b
163,0399	163,0395	0,4	8,41	$C_9H_8O_3$	Kyselina kumarová ^a

^astrukturní identifikace pomocí autentického standardu

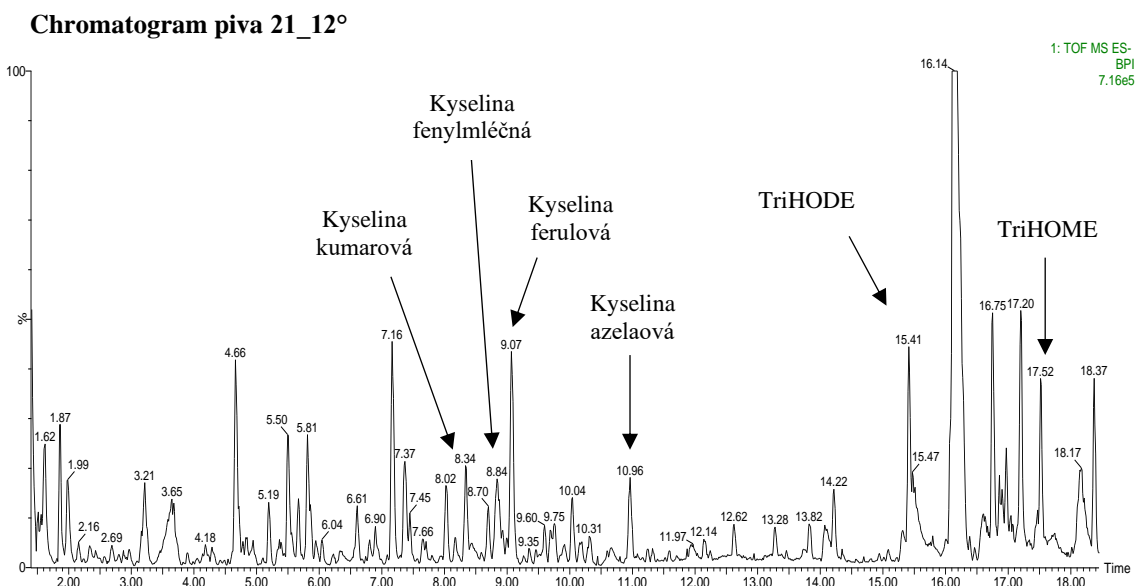
^bpředběžná identifikace pomocí databáze (na základě porovnání MS/MS spekter)

Nejvýraznější rozdíl byl zjištěný u látky TriHODE. U nízkoprocentních piv je koncentrace této látky o 39% vyšší (Obr. 20). Tento rozdíl je statisticky signifikantní.



Obrázek 20. Srovnání průměrných ploch látky $C_{18}H_{32}O_4$, TriHODE a kyseliny kumarové v nízkoprocentním a vysokoprocentním pivu. Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka (n = 10-24).

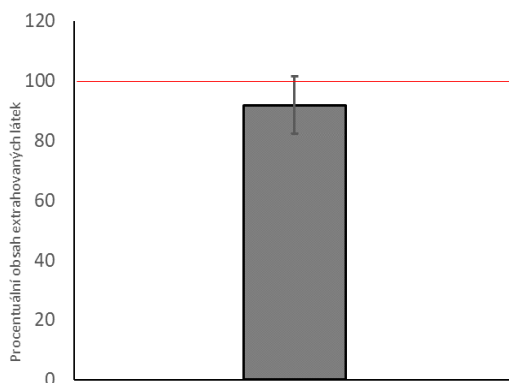
Vybraný LC-MS chromatogram 12° filtrovaného piva se znázorněnými identifikovanými látkami je zobrazen na obrázku 21.



Obrázek 21. LC-MS chromatogram piva v negativním ionizačním módu (ESI-) zobrazen jako BPI (Base Peak Intensity). Identifikované látky jsou znázorněny pomocí šipek.

4.5 Vliv obalového materiálu na metabolom piva

Při srovnání stejných plechovkových a lahvových piv nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl. U těchto piv je však pozorován rozdíl v celkovém množství extrahovaných látek, kdy v plechovkových pivech je průměrně o 8 % méně extrahovaných látek než v pivech lahvových (obr. 22). Tento pokles však nebyl signifikantní.



Obrázek 22. Průměrný relativní pokles rozpuštěných látek v plechovkových pivech (sloupec) ve srovnání s identickými pivy ve skle (červená čára). Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka ($n = 5$).

5 DISKUZE

Necílený metabolomický přístup ve spojení s LC-MS se ukazuje jako účinný nástroj pro analýzu pív na molekulární úrovni (Gallart-Ayala *et al.*, 2016). V předchozích studiích byla metabolomika použita například ke stanovení vlivu podmínek skladování na stabilitu piva, ke studiu metabolických výstupů různých kmenů kvasinek nebo k rozlišení různých druhů pív (ležáky, svrchně kvašená piva, nealkoholická piva; Spevacek, *et al.*, 2016).

5.1 Shluková analýza

V našem experimentu byla pro nalezení podobností mezi jednotlivými druhy pív použita shluková analýza (Obr. 9). Plechovková piva a stejná lahvová piva se až na jednu výjimku vždy shlukují spolu. Piva vyrobená stejným pivovarem (stejná značka) avšak s rozdílným způsobem přípravy, se ve většině případů také shlukovala spolu. Můžeme tedy říci, že pivovary svému vyrobenému pivu často vtiskují určitý metabolomický podpis.

Pomocí této techniky bylo navíc zjištěno, že pivovary značek 17, 18 a 19 spadají pod jednu větší společnost. Stejný případ pozorujeme u pivovarů značek 4, 5 a 6.

Shluková analýza byla již dříve použita k nalezení podobnosti například mezi zahraničními a českými pivy (Čejka *et al.*, 2004).

5.2 Průměrné množství extrahovaných látek u různých druhů pív

Množství a odrůda použitého sladu a chmele by měly korelovat s obsahem rozpuštěných látek v pivu. Bylo zjištěno, že kvalita těkavých sloučenin pocházejících z chmele je do značné míry určována procesem vaření piva, odrůdou chmele, množstvím a také formou použitého chmele – sušené chmelové hlávky, mechanicky zpracovaný chmel (pelety), chmelový extrakt (Adamenko a Kawa-Rygielska, 2022).

Granato *et al.* (2011) pozorovali rozdíly mezi spodně kvašenými nízkostupňovými ležáky a svrchně kvašenými vícestupňovými pivy typu ALE na základě obsahu celkových fenolických látek. Bylo zjištěno, že piva typu ALE obsahovala větší množství fenolických sloučenin a vykazovala tedy i vyšší antioxidační aktivitu než světlý ležák.

Tento trend je pozorován a znázorněn na obr. 10., kdy průměrné množství extrahovaných látek u vícestupňových pív a svrchně kvašených pív (piva chmelená kombinací několika druhů chmele) je vyšší než v případě pív nízkostupňových.

5.3 Množství rozpuštěných látek v různých fázích přípravy piva

Necílená metabolická analýza byla dále použita za účelem sledování metabolitů ve vybraných meziproduktech vzniklých během procesu vaření spodně kvašeného 11° (ležák) a svrchně kvašeného 14° piva. Svrchně kvašená piva se oproti ležákům vyznačují vyšším obsahem alkoholu, vyšší stupňovitostí, tmavší barvou a ovocnější chutí (Vanderhaegen *et al.*, 2007; Granato *et al.*, 2011).

Koncentrace rozpuštěných látek je u spodně kvašeného 11° piva nižší ve všech fázích procesu výroby oproti svrchně kvašenému pivu (Obr. 11). Tento rozdíl může být způsoben následujícími faktory:

- přidání většího množství sladu u svrchně kvašeného vícestupňového piva
- použití vícero druhů aromatických chmelů pro svrchní kvašení
- použití rozdílných kmenů pivovarských kvasnic
- doba skladování (Vanderhaegen *et al.*, 2007; Granato *et al.*, 2011)

Aromatické odrůdy chmele (Kazbek, Citra, Cascade atd.) obecně obsahují více rozpuštěných látek, než chmely méně aromatické (Premiant či Žatecký poloraný červeňák; Obr. 12). Tohle zjištění vysvětluje vyšší nárůst rozpuštěných látek v mladině svrchně kvašeného piva (Obr. 11), do kterého bylo přidáno celkem 5 odrůd aromatického chmele, přičemž do spodně kvašeného pouze jedna.

Další fáze vaření piva zahrnuje jeho kvašení přidáním pivovarských kvasinek. Svrchní pivovarské kvasnice nejlépe kvasí při vyšších teplotách (18–25 °C), kvašení je díky tomu rychlejší a vznikají i další produkty, jako např. estery (izoamylacetát, ethylacetát atd.) dodávající pivu specifickou „ovocnou“ chuť, která je pro svrchně kvašená piva žádoucí (Pires *et al.*, 2014).

Kvašení pomocí spodních kvasinek, které nejlépe kvasí při nižších teplotách (~5-15 °C), je naopak pomalejší a „čistější“. Vzniká převážně alkohol a energie, ostatní produkty se oproti svrchnímu kvašení tvoří daleko méně, čemuž odpovídá i náš graf (Obr. 13; Pires *et al.*, 2014).

V dřívější studii bylo zjištěno, že svrchně kvašená piva obsahují ve srovnání s ležáky výrazně vyšší hladiny propylenglykolu, 2,3-butandiolu, kyseliny propionové, glycerolu, kyseliny jantarové, kyseliny jablečné, fruktózy, sorbitolu, kyseliny palmitové, kyseliny stearové a sacharózy. Bylo potvrzeno, že v případě 2,3-butandiolu se jedná o metabolit související s obsahem alkoholu. Vyšší hladiny kyseliny propionové, kyseliny jablečné a sacharózy mohou být způsobeny rozdílným chmelením (Seo *et al.*, 2020).

Je tedy zřejmé, že množství a typ použitých vstupních surovin má vliv na obsah rozpuštěných látek u jednotlivých druhů pív.

5.4 Metabolom piva a vstupních surovin

Metabolity (v našem případě features) pocházející ze vstupních surovin významně ovlivňují senzorycké vlastnosti výsledného piva. Z ječmene a z chmele přechází do výsledného produktu podobný počet features (Obr. 14). Látky charakteristické pro chmel jsou zejména α -kyseliny, β -kyseliny, xanthohumol, α -humulen, β -karyofylen, myrcen, seskviterpeny a další (Steenackers *et al.*, 2015). Slad je zdrojem aminokyselin, mastných kyselin, lipidů, sacharidů, derivátů karboxylových kyselin, organických kyselin atd. (Bettenhausen *et al.*, 2018).

Do piva přechází několik features pocházejících současně z ječmene i chmele. Mezi látky vyskytující se současně v chmelu i ječmeni patří např. fenolické sloučeniny ovlivňující chuť, zákal, či plnost piva (Šibalić *et al.*, 2021). Hlavními polyfenoly přítomnými v pivu jsou flavonoidy, taniny (trísloviny), proanthokyanidiny, deriváty kyseliny benzoové a skořicové, kumariny, katechiny, chalkony, flavonoidy atd., přičemž zhruba 20–30 % pivních polyfenolů pochází z chmele a 70–80 % ze sladu (Martinez-Gomez *et al.*, 2020). K polymeraci fenolických látek na polyfenoly dochází během varu, fermentace a také při skladování vlivem oxidace (Asano *et al.* 1984; Wannemacher *et al.*, 2018).

Dále bylo zjištěno, že ve finálním pivu se vyskytuje 86 features unikátních pouze pro pivo (nepocházejí ani z ječmene, ani z chmele). Tyto features vznikají během přípravy piva, tzn. vaření, kvašení, ležení, skladování. Takovým příkladem může být např. 4-vinylguajakol, který vzniká dekarboxylací kyseliny ferulové v průběhu vaření piva a má i ve stopovém množství významný vliv na jeho aroma (Coghe *et al.*, 2004).

Značná část těchto features také vzniká přidáním pivovarských kvasnic. Hlavními produkty metabolismu kvasinek jsou ethanol a CO₂. Mezi další metabolity kvasinek patří vyšší alkoholy, estery, karbonyly (aldehydy/ketony), vicinální diketony (diacetyl, acetylaceton), mastné a organické kyseliny a sloučeniny síry (Capece *et al.*, 2018).

Nakonec bylo detekováno i několik features obsažených v chmelu a ječmeni, které nebylo možné detekovat v pivu. Tento výsledek může být způsoben efektivitou extrakce, kdy efektivita extrakce látek do piva (během varného procesu) není tak účinná jako extrakce v acetonitrilu za laboratorních podmínek. Navíc, spousta složek obsažených ve

vstupních surovinách může být během procesu vaření piva odpařena či vysrážena (Steenackers *et al.*, 2015).

5.5 Metabolity rozlišující od sebe různé druhy piv

Pomocí metabolomické analýzy bylo nalezeno několik metabolitů rozlišujících od sebe jednotlivé druhy piva, z nichž 6 bylo identifikováno:

- kyselina ferulová (odlišující od sebe jak svrchně a spodně kvašená piva, tak česká a zahraniční)
- kyselina fenylmléčná (odlišující od sebe svrchně a spodně kvašená piva)
- kyselina azelaová (odlišující od sebe česká a zahraniční piva)
- kyselina kumarová (odlišující od sebe nízkoprocentní a vysokoprocentní piva)
- TriHOME (odlišující od sebe svrchně a spodně kvašená piva)
- TriHODE (odlišující od sebe nízkoprocentní a vysokoprocentní piva)

5.5.1 Kyselina ferulová

Kyselina ferulová je považována za jednu z nejdůležitějších fenolových kyselin vykazující antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivou, antitrombotickou a protirakovinnou aktivitu. Také snižuje hladinu cholesterolu v séru a játrech a zvyšuje životaschopnost spermií (Ou a Kwok, 2004). Díky těmto vlastnostem je jí věnována zvýšená pozornost s ohledem na aplikace v potravinářském, zdravotnickém, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Kroon a Williamson, 1999).

Koncentrace kyseliny ferulové je v zahraničních pivech až o 60 % nižší než v pivech českých (Obr. 18). Kromě toho byla její nižší koncentrace naměřena také u svrchně kvašených piv ve srovnání s ležáky (spodně kvašenými pivy), které jsou typické právě pro Českou republiku (Obr. 16). Tato kyselina byla již dříve identifikována v českém chmelu i pivu (Kellner *et al.*, 2007).

5.5.2 Kyselina trihydroxy-oktadecenová (TriHOME)

Jednou z dalších látek rozlišujících od sebe svrchně a spodně kvašená piva je kyselina trihydroxy-oktadecenová, jejíž vyšší koncentrace byla naměřena ve spodně kvašených pivech (Obr. 16). Přítomnost této kyseliny v pivu byla poprvé objevena Drost *et al.* v roce 1971. Jedná se o metabolit kyseliny linolové, který vzniká během sladování a rmutování

ječmene. Trihydroxy-oktadecenové kyseliny jsou považovány za prekurzory trans-2-nonenalu, který vzniká při skladování piva a je zodpovědný za jeho nepříjemnou příchuť. Tyto kyseliny mají mírně svíravou pachut' a negativně ovlivňují kvalitu pивní pěny. Snížení obsahu TriHOME v pивu je tedy důležité pro zlepšení jeho kvality. Bylo zjištěno, že zahájením procesu rmutování při vyšší teplotě produkce těchto kyselin klesá (Kobayashi *et al.*, 2000; Kuroda *et. al.*, 2002).

5.5.3 Kyselina fenylmléčná

Kyselina fenylmléčná (aromatický derivát kyseliny mléčné) je schopna inhibovat růst mnoha mikroorganismů, vykazuje širokospektrální antimikrobiální vlastnosti a podporuje lidský imunitní systém. Díky tomu je rozsáhle používaná v potravinářském (pro prodloužení trvanlivosti potravin), krmivářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Wu *et al.*, 2023). Tato kyselina od sebe odlišuje svrchně a spodně kvašená piva, přičemž vyšší koncentrace byla detekována v prvních z nich (Obr. 16).

Fenylmléčná kyselina byla nedávno také detekována v nechmeleném pивu kvašeném pomocí probiotik (*Lactocaseibacillus paracasei*), které bylo připravené skupinou vědců Loh *et al.* (2021) za účelem zkoumání možných zdravotních přínosů probioticky kvašeného piva.

5.5.4 Kyselina azelaová

Jedna z identifikovaných látek rozlišujících od sebe zahraniční a česká piva je kyselina azelaová, která je více zastoupena v českých pivech (Obr. 18). Tato kyselina se přirozeně vyskytuje v obilovinách, jako je ječmen, pšenice a žito. Má antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. O této úžasné kyselině je také známo, že má svou roli při léčbě schizofrenie (Sharma *et al.*, 2020). Kromě toho byla také identifikována v pivovarském mlátě (odpad vzniklý po filtraci sladiny; Becker *et al.*, 2022).

5.5.5 Kyselina kumarová

Další fenolová kyselina identifikována v této studii, vykazující chemoprotektivní a antioxidační vlastnosti je kyselina kumarová (Torres y Torres a Rosazza, 2001). O něco vyšší koncentrace této kyseliny byla naměřena u nízkoprocentních piv ve srovnání s vysokoprocentními pivy (Obr. 20).

Bylo zjištěno, že kyselina ferulová a kumarová jsou nejhojněji zastoupenými fenolovými kyselinami v pivovarském mlátě (Bartolome a Gómez-Cordovés, 1999). Mussatto *et al.*

(2007) se proto zabývali alkalickou hydrolyzou pivovarského mláta za účelem extrakce těchto dvou kyselin, pro jejich aplikaci v potravinářském, zdravotnickém, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

5.5.6 Kyselina trihydroxy-oktadekadienová (TriHODE)

Koncentrace TriHODE se významně lišila mezi nízkostupňovým a vysokostupňovým pivem, kdy v prvním z nich je této látky průměrně o 39 % více (Obr. 20). Stejně jako v případě TriHOME je TriHODE odvozená z kyseliny linolové a do piva se dostává z ječmene. Obě tyto látky byly navíc identifikovány v mlátě (Becker *et al.*, 2022).

5.6 Vliv obalového materiálu na metabolom piva

Při srovnání plechovkových piv s identickými lahvovými pivy je pozorován rozdíl v celkovém množství extrahovaných látek. Piva v plechu obsahovala průměrně o 8 % méně extrahovaných látek než piva ve skle (Obr. 22). Tento pokles je s největší pravděpodobností způsoben oxidací při plnění a zavírání plechovek. Během procesu stáčení se do plechovky dostává větší množství kyslíku kvůli velké ploše jejího otvoru. Rychlejší oxidace je také způsobená nemožností odstranění vzduchu z plechovky pomocí vakua vzhledem k jejímu slabému hliníkovému materiálu. Naproti tomu piva ze skleněné lahve podléhají oxidaci pomaleji především díky menší ploše otvoru lahve při plnění a možnosti odsávání vzduchu za použití vakua. Jedním z identifikovaných markerů stárnutí piva je trans-2-nonenal, který způsobuje chuť podobnou papíru a vysychající pocit v ústech (Jamieson a Van Gheluwe, 1970; Fromuth *et al.*, 2023).

6 ZÁVĚR

Pomocí moderních instrumentálních metod, jako je necílená LC-MS analýza, se nám podařilo rozlišit různé druhy pív na základě jejich metabolomického profilu. Bylo identifikováno několik metabolitů způsobujících rozdíl mezi jednotlivými druhy pív. Mezi tyto metabolity patří kyselina ferulová, fenylmléčná, azelaová, kumarová, TriHOME a TriHODE.

Obalový materiál a rozdílný proces stáčení a skladování mohou ovlivnit stabilitu a senzorické vlastnosti piva. Zjistili jsme, že plechovková piva jsou ve srovnání s lahvovými pivy náchylnější na oxidaci. Proto je u plechovek víc než u lahví důležité, aby se dostaly k zákazníkovi a spotřebiteli v co nejkratší době po stočení a celou dobu byly skladovány v optimálních podmínkách. Metabolomika byla také využita ke sledování změn metabolitů během procesu vaření spodně a svrchně kvašeného piva.

Závěrem lze říci, že chuť piva je komplexní a je založená na změnách na molekulární úrovni ve výchozích surovinách, zejména sladu, chmelu a kvasinkách, a také během procesních fází, které zahrnují sladování, vaření, stáčení a skladování piva (Spevacek *et al.*, 2016). Využití necílené metabolomiky společně s LC-MS analýzou se ukázalo jako mocný nástroj pro studium pivního metabolomu. Všechny stanovené cíle této diplomové práce byly naplněny.

7 LITERATURA

- Adamenko, K., & Kawa-Rygielska, J. (2022). Effect of Hop Varieties and Forms in the Hopping Process on Non-Alcoholic Beer Quality. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(22), 7910. <https://doi.org/10.3390/molecules27227910>
- Agu, R. C., & Palmer, G. H. (1998). Effect of mashing with commercial enzymes on the properties of sorghum worts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 43–48.
- Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical analysis : PCA*, 21(1), 33–47. <https://doi.org/10.1002/pca.1187>
- Asano, K., Ohtsu, K., Shinagawa, K., & Hashimoto, N. (1984). Affinity of proanthocyanidins and their oxidation products for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(5), 1139–1146.
- Awad, H., Khamis, M. M., & El-aneed, A. (2014). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*. 50(2), 158-175.
- Bamforth, C. W. (2006). *Brewing: New Technologies*. CRC Press, USA, 484 stran.
- Bamforth, C.W., Barclay, A.H.P. (1993). Malting technology and the uses of malt. In: Barley Chemistry and Technology, A.W. MacGregor and R.S. Bhatti, Eds., *American Association of Cereal Chemists*: St. Paul, Minnesota, USA, 297–354.
- Barth, R. (2013). *The chemistry of beer: the science in the suds*. Hoboken: Wiley, 352 stran.
- Bartolome, B., & Gómez-Cordovés C. (1999). Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and *p*-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 435–439.
- Baxter, E. D., & Hughes, P. S., (2001). Beer: quality, safety and nutritional aspects. *Royal Society of Chemistry*. Cambridge, UK.
- Becker, D., Stegmüller S. & Richling E. (2022). Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides, and oxylipins. *Food Science & Nutrition*.
- Bélanger, J. M. R., Jocelyn Paré J.R., & Sigouin, M. (1997). Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. In: *Instrumental Methods in Food Analysis. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Elsevier, 37-59.
- Bettenhausen, H. M., Barr, L., Broeckling, C. D., Chaparro, J. M., Holbrook, C., Sedin, D., & Heuberger, A. L. (2018). Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 113, 487–504. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.024>
- Blum, F. (2014). High performance liquid chromatography. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*, 75(2), C18–C21. <https://doi.org/10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., et al. (2019). Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Briggs, D., Boulton, Ch., Brookes, P., & Stevens, S. (2004). *Brewing*. CRC Press, 900 stran.
- Bud, R. (1993). *The Uses of Life: A History of Biotechnology*. Cambridge, New York, USA, Cambridge University Press, 299 stran.
- Buchholz, K., & Collins, J. (2013). The roots--a short history of industrial microbiology and biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(9), 3747–3762. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4768-2>
- Buiatti, S. (2009). Beer Composition: An Overview. In: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 213-225.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. *Fermentation*, 4, 38. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>

- Cavallini, N., Savorani, F., Bro, R., & Cocchi, M. (2021). A Metabolomic Approach to Beer Characterization. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(5), 1472. <https://doi.org/10.3390/molecules26051472>
- Coghe, S., Benoot K., Delvaux F., Vanderhaegen B., & Delvaux, F. R. (2004). Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(3), 602-608.
- Čejka, P., Kellner, V., Čulík J., Horák, T., & Jurková, M. (2004). Characterizing a Czech-Type Beer. *Kvasny Prumysl*. 50(1), 3-11.
- Česlová, L., Holcapek, M., Fidler, M., Drsticková, J., & Lísa, M. (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1216(43), 7249–7257. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.022>
- De Hoffmann, E. (1996). Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry*, 31(2), 129–137.
- Drost, B. W., Van Eerde, P., Hoekstra, S. F., Strating, J. (1971). Fatty acids and staling of beer. *Proc. Eur. Brew. Conu.* 13, 451-458.
- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210–230.
- Fox, G. P. (2010). Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality. In: ZHANG, Guoping a Chengdao LI, ed. *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Advanced Topics in Science and Technology in China. Springer: Berlin/Heidelberg, s. 63-98.
- Fromuth, K., Chaparro, J. M., Sedin, D., Van Buiten, Ch. & Prenni, J. E. (2023). Characterizing the Impact of Package Type on Beer Stability. *ACS Food Science & Technology*. 3(4), 616-625.
- Gallart-Ayala, H., Kamleh, M. A., Hernández-Cassou, S., Saurina, J., & Checa A. (2016). Ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry based metabolomics as a strategy for beer characterization. *Journal of the Institute of Brewing*. 122(3), 430-436.
- Garavaglia, C. & Swinnen, J. (2017). The Craft Beer Revolution: An International Perspective. *Choices*, 32(3), 1–8.
- Gibson, B., Vidgren, V., Peddinti, G., & Krogerus, K. (2018). Diacetyl control during brewery fermentation via adaptive laboratory engineering of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 45(12), 1103–1112. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2087-4>
- Goldammer, T. (2022). *The Brewer's Handbook: The Complete Book to Brewing Beer* . 3rd. Apex Publishers, USA, 376 stran.
- Granato, D., Branco, G. F., Faria, J.de A., & Cruz, A. G. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(3), 563–571. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4222>
- Hamberg, M., (1991). Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: qualitative and quantitative analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(9), 1568-1572.
- Henry, R. J. (2016). Barley: Harvesting, storage, and transport. In: *Reference module in food science*. Elsevier, 50-53.
- Hertrich, J. (2013). Topics in Brewing: Malting. The Master Brewers Association of the Americas. *Technical Quarterly*, 50, 72-81.
- Hornsey, I. S. (1999). *Brewing*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, 231 stran.
- Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M. D. C., & Padilha, F. F. (2019). Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8), 1568. <https://doi.org/10.3390/molecules24081568>
- Chládek, L. (2007). *Pivovarnictví*. Praha, Grada, 208 stran.
- Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2007). Metabolomics. *Cell metabolism*, 6(5), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005>

- Jaeger, A., Zannini, E., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2021). Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1389. <https://doi.org/10.3390/foods10061389>
- Jamieson, A. M., & Van Gheluwe, J. E. A. (1970). Identification of a Compound Responsible for Cardboard Flavor in Beer. Proceedings. Annual Meeting. *American Society of Brewing Chemists*, 28(1), 192–197.
- Jelínek, L., Šneberger, M., Karabín, M. & Dostálek, P. (2010): Comparison of Czech hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. *Czech J. Food Sci.*, 28, 309–316.
- Karabín, M., Brányik, T., Kruliš, R., Dvořáková, M. & Dostálek, P. (2009). Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarství. *Chemické Listy*, 103, 721-728 (2009).
- Klávus, A., Kokla, M., Noerman, S., Koistinen, V. M., Tuomainen, M., Zarei, I., Meuronen, T., Häkkinen, M. R., Rummukainen, S., Farizah Babu, A., Sallinen, T., Kärkkäinen, O., Paananen, J., Broadhurst, D., Brunius, C., & Hanhineva, K. (2020). "notame": Workflow for Non-Targeted LC-MS Metabolic Profiling. *Metabolites*, 10(4), 135. <https://doi.org/10.3390/metabo10040135>
- Kobayashi, N., Kaneda, H., Kuroda, H., Watari, J., Kurihara, T., & Shinotsuka, K. (2000). Behavior of mono-, di-, and trihydroxyoctadecenoic acids during mashing and methods of controlling their production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)80036-5](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)80036-5)
- Krogerus, K., & Gibson, B. R. (2013). 125 th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 119, 86-97.
- Kroon, P. A., & Williamson, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: Current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 355-361.
- Kubo, I. (2003). Molecular design of multifunctional antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 11(19), 4255-4262.
- Kuroda, H., Kobayashi, N., Kaneda, H., Watari, J., & Takashio, M. (2002). Characterization of factors that transform linoleic acid into di- and trihydroxyoctadecenoic acids in mash. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(1), 73–77.
- Landete J. M. (2013). Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(7), 706–721. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.555018>
- Liu, X., & Locasale, J. W. (2017). Metabolomics: A Primer. *Trends in biochemical sciences*, 42(4), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>
- Loh, L. X., Ng, D. H. J., Toh, M., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2021). Targeted and Nontargeted Metabolomics of Amino Acids and Bioactive Metabolites in Probiotic-Fermented Unhopped Beers Using Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(46), 14024–14036. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03992>
- Maier, T. (2019). *Minipivovary a řemeslné pivovary*. Národní zemědělské muzeum, Praha, s.p.o., 189 stran.
- Mallett, J. (2014). *Malt: a practical guide from field to brewhouse*. *Brewers Publications*, Boulder, Colorado, 336 stran.
- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>
- Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th. United Kingdom, Wiley, 395 stran.
- Mikyška, A., & Jurková, M. (2018). Evaluation of α - and β -Bitter Acids Content in Harvest of Czech Hops in 2017. *Kvasny Prumysl*, 64(3), 122-130.
- Mittal, R. D. (2015). Tandem mass spectroscopy in diagnosis and clinical research. *Indian journal of clinical biochemistry, IJCB*, 30(2), 121–123. <https://doi.org/10.1007/s12291-015-0498-9>
- Mussatto, S.I., Dragone G., & Roberto, I.C. (2007). Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 231-237.
- Nance, M. R., & Setzer, W. N. (2011). Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus L.*) commonly used in beer brewing. *Journal of Brewing and Distilling*. Vol. 2(2), 16-22.

- Naz, S., Vallejo, M., García, A., & Barbas, C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of chromatography. A*, 1353, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.071>
- Norková, R., Dyrtrtová, J.J., & Kašička, V. (2013). Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické Listy*. 107, 949–955.
- Oser, H. H. (2015). *Producing quality barley for the malting industry*. University of Nebraska-Lincoln.
- Ou, S., & Kwok, K.-C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(11), 1261-1269.
- Palmer, J., & kaminski C. (2013). *Water: a comprehensive guide for brewers*. 2nd. *Brewers Publications*, Boulder, Colorado, 300 stran.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T. a Vicente, A. A. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34.
- Poutanen, K. S. (2020). Cereal raw material pretreatment. In: *Breakfast Cereals and How They Are Made*. Elsevier, 97-107.
- Rani, H., & Bhardwaj, R. D. (2021). Quality attributes for barley malt: "The backbone of beer". *Journal of food science*, 86(8), 3322–3340. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15858>
- Reinold, M.R. (1997). *Manual Prático de Cervejaria*. Aden, São Paulo, Brasil, 149 stran.
- Sanz, V., Torres, M. D., López Vilariño, J. M., & Domínguez, H. (2019). What is new on the hop extraction? *Trends in Food Science & Technology*, 93, 12-22.
- Seo, Seung-Ho, Kim, Eun-Ju, Park, Seong-Eun, Park, Dae-Hun, Park, K. M., Na, Chang-Su & Son, Hong-Seok. (2020). GC/MS-based metabolomics study to investigate differential metabolites between ale and lager beers. *Food Bioscience*. 36.
- Sharma, N., Khurana, N., Muthuraman, A., Utreja, P., Tiwari, N., & Vyas, M. (2020). PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF AZELAIC ACID: A RECENT UPDATE. *Plant Archives*. 20(supplement 2), 3048-3052.
- Spevacek, A. R., Benson, K. H., Bamforth, Ch. W., & Slupsky, C. M. (2016). Beer metabolomics: molecular details of the brewing process and the differential effects of late and dry hopping on yeast purine metabolism. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(1), 21-28.
- Steenackers, B., De Cooman, L., & De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food chemistry*, 172, 742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Šibalić, D., Planinić, M., Jurić, A., Bucić-Kojić, A., & Tišma, M. (2021). Analysis of phenolic compounds in beer: from raw materials to the final product. *Chemical Papers*, 75(1), 67-76.
- Thesseling, F. A., Bircham, P. W., Mertens, S., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). A Hands-On Guide to Brewing and Analyzing Beer in the Laboratory. *Current protocols in microbiology*, 54(1), e91. <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>
- Torres Y Torres, J. L., & Rosazza, J. P. (2001). Microbial transformations of p-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of natural products*, 64(11), 1408–1414. <https://doi.org/10.1021/np010238g>
- Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert H. & Delvaux, F. R. (2007). Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*. 103(2), 404-412.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006): The chemistry of beer aging—a critical review. *Food Chemistry*, 95(3), 357-381.
- Wainwright, T. (1973). DIACETYL-A REVIEW: PART I-ANALYTICAL AND BIOCHEMICAL CONSIDERATIONS. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(6), 451-470.
- Wannenmacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(4), 953–988. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>

- Wu, H., Guang, C., Zhang, W., & Mu, W. (2023). Recent development of phenyllactic acid: physicochemical properties, biotechnological production strategies and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 43(2), 293–308. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.2010645>
- Wunderlich, S., & Back W. (2009). Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 3-16.
- Yahya, H. R., Linforth, S.T., & Cook, D. J. (2014). Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. *Food Chemistry*, 145, 378-387.
- Younis, O. S., & Stewart, G. G. (1999). Effect of malt wort, very-highgravity malt wort, and very-high-gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57, 39–45.

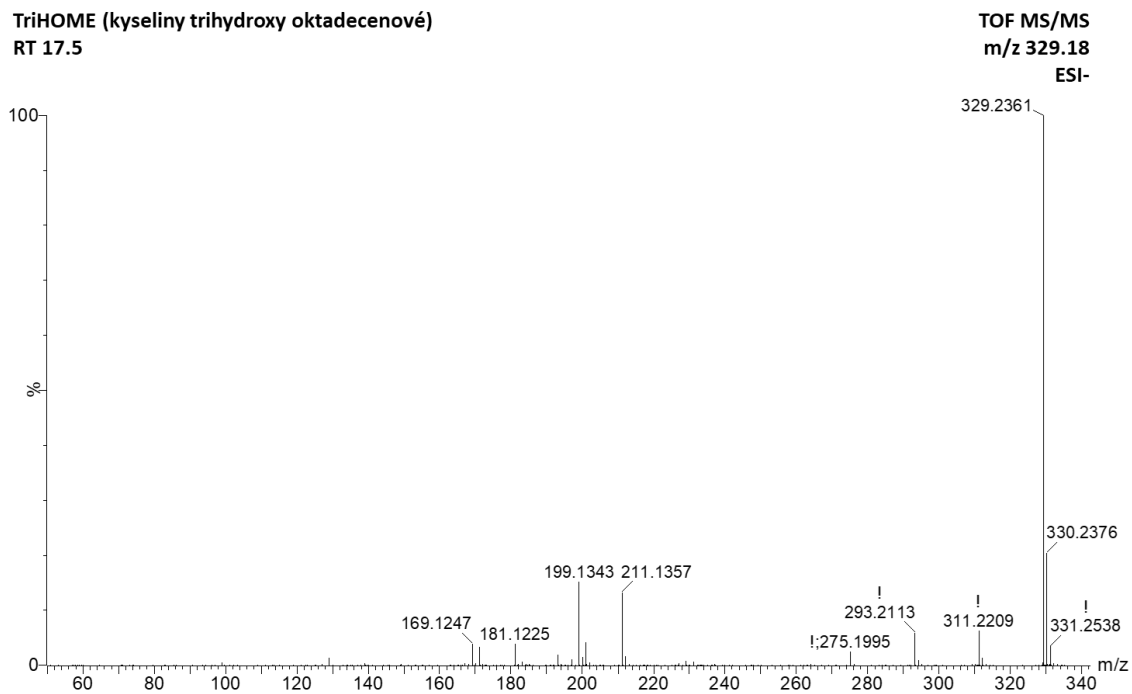
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ALE	svrchně kvašené pivo
AS	autentický standard
C18	oktadecylový uhlíkový řetězec vázaný na nosič
C8	oktylový uhlíkový řetězec vázaný na nosič
DW	hmotnost suché hmoty
ESI	ionizace elektrosprejem
FDR	false-discovery rate korekce
GA ₃	kyselina gibberelová
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysoce-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LC-ESI-TOF-MS	kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací spolu s hmotnostní spektrometrií a analyzátozem doby letu
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MS/MS spektrum	fragmentační spektrum
NP	normální fáze
Q	kvadrupólový hmotnostní analyzátor
QTOF	kvadrupólový analyzátor spojený s analyzátozem doby letu
QTOF-ESI-MS	hmotnostní spektrometr s hybridním kvadrupól/průletovým analyzátozem vybaveným elektrosprejem
RP	reverzní fáze
RT	retenční čas
TOF	hmotnostní analyzátor doby letu
TriHODE	kyselina trihydroxy oktadecadienová
TriHOME	kyselina trihydroxy oktadecenová
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UHPLC-MS/MS ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s
tandemovou hmotnostní spektrometrií
Ž.P.Č. Žatecký poloraný červeňák

9. PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1

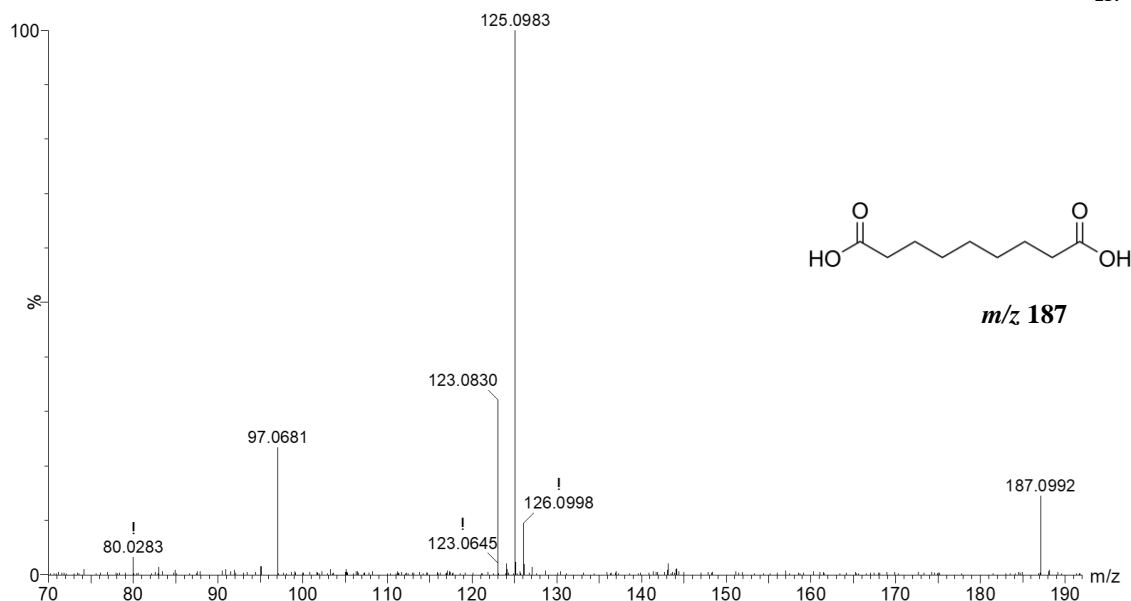


Obrázek 23. Fragmentační spektrum TriHOME měřené v negativním ionizačním módu s kolizní energií 20 eV, rozlišující od sebe svrchně a spodně kvašená piva. Prekurzorový ion $[M-H]^-$ s hodnotou m/z 329.

9.2 Příloha 2

Kyselina azelaová
RT 11

TOF MS/MS
m/z 187.04
ESI-

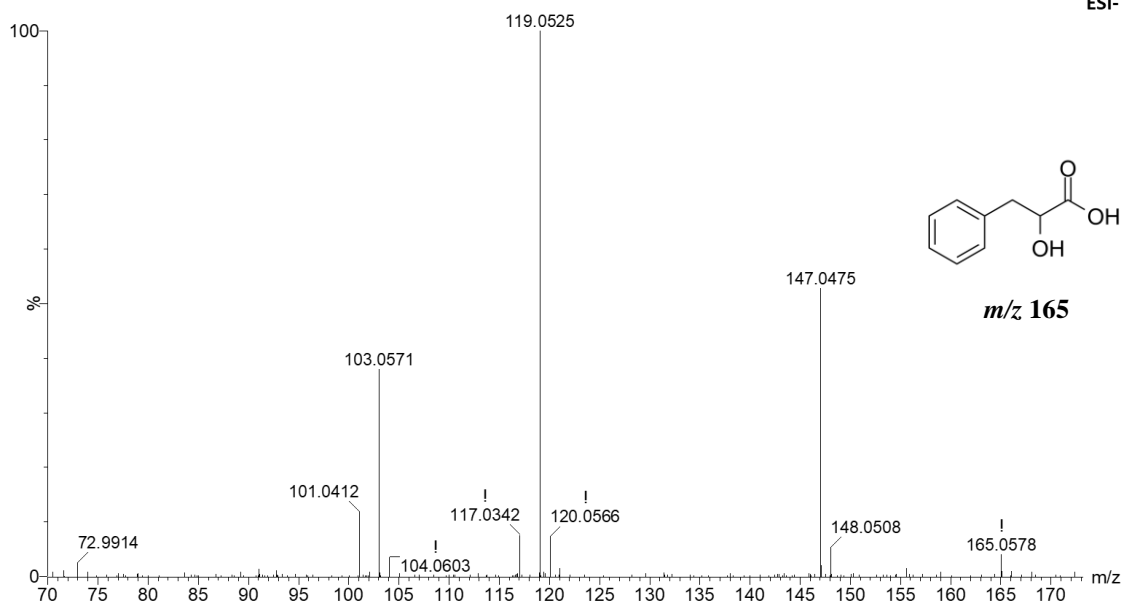


Obrázek 24. Fragmentační spektrum kyseliny azelaové měřené v negativním ionizačním módu s kolizní energií 20 eV, rozlišující od sebe česká a zahraniční piva. Prekurzorový ion $[M-H]^-$ s hodnotou m/z 187.

9.3 Příloha 3

Kyselina fenylmléčná
RT 8.7

TOF MS/MS
m/z 165.00
ESI-

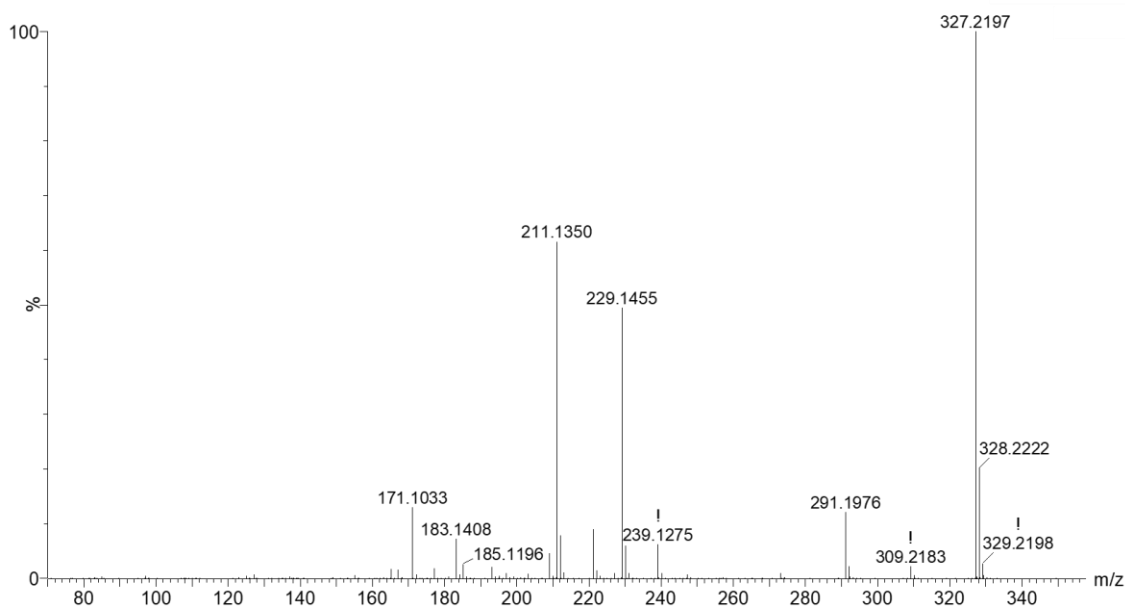


Obrázek 25. Fragmentační spektrum kyseliny fenylmléčné měřené v negativním ionizačním módu s kolizní energií 20 eV, rozlišující od sebe svrchně a spodně kvašená piva. Prekurzorový ion $[M-H]^-$ s hodnotou m/z 165.

9.4 Příloha 4

TriHODE (kyselina trihydroxy oktadekadienová)
RT 15.4

TOF MS/MS
m/z 327.17
ESI-

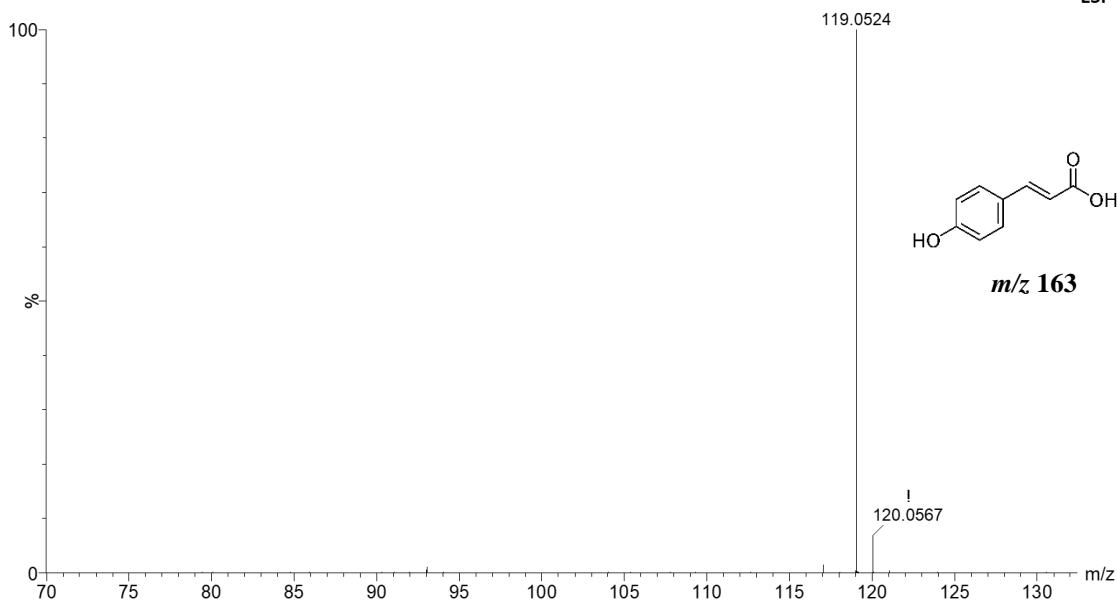


Obrázek 26. Fragmentační spektrum TriHODE měřené v negativním ionizačním módu s kolizní energií 20 eV, rozlišující od sebe jak česká a zahraniční piva, tak nízkoprocentní a vysokoprocentní piva. Prekurzorový ion $[M-H]^-$ s hodnotou m/z 327.

9.5 Příloha 5

Kyselina kumarová
RT 8.4

TOF MS/MS
m/z 162.98
ESI-



Obrázek 27. Fragmentační spektrum kyseliny kumarové měřené v negativním ionizačním módu s kolizní energií 20 eV, rozlišující od sebe nízkoprocentní a vysokoprocentní piva. Prekurzorový ion $[M-H]^-$ s hodnotou m/z 163.