

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Výroba fermentovaného nápoje z mláta

Diplomová práce

**Bc. Nikola Hamerníková
Výživa a potraviny (NUTRIM)**

Ing. Karel Štěrba, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výroba fermentovaného nápoje z mláta" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Karlu Štěrbovi, Ph.D. za odborné vedení, spolupráci a vstřícnost při konzultacích, které napomohly vzniku této diplomové práce.

Výroba fermentovaného nápoje z mláta

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývala výrobou nového kvašeného nápoje za využití pivovarského mláta. Mláto je zdrojem cenných látek, obsahuje vysoké množství vlákniny, zejména celulózy. Dříve se mláto využívalo hlavně ke zkrmování hospodářskými zvířaty nebo se ukládalo na skládky. Dnes může být mláto alternativně využíváno v recyklaci a opětovném použití průmyslových odpadů díky rozvoji nových technologií. Vzhledem ke stabilní produkci mláta pivovary je snaha o nalezení dalších možností jeho využití.

Praktická část byla zaměřena na přípravu fermentovaných nápojů z mláta za použití různých produkčních mikroorganismů a charakterizaci výsledných produktů pomocí stanovení celkových polyfenolů, obsahu ethanolu a dalších těkavých látek vzniklých během procesu fermentace. Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné vyrobit fermentovaný nápoj z pivovarského mláta za použití specifických mikroorganismů schopných štěpit vysokomolekulární polysacharidy (zbytky škrobu, celulóza) přítomné v mlátě a nahradit tak v současnosti nutný krok chemické hydrolýzy.

Klíčová slova: destilace, kvašení, hlubokoprokvašující kvasinky

Production of fermented beverage from the spent grain

Summary

This thesis was concerned with the production of a new fermented beverage using brewers' spent grain. Spent grain is a source of valuable substances, it contains high amount of fibre, especially cellulose. In the past, spent grain was mainly used for feeding livestock or landfilled. Today, thanks to the development of new technologies, spent grain can be used alternatively in the recycling and reuse of industrial waste. Due to the stable production of spent grain by breweries, efforts are being made to find further possibilities for its use.

The practical part was focused on the preparation of fermented beverages from the spent grain using different production microorganisms and on the characterization of the final products by determination of total polyphenols, ethanol content and other volatiles produced during the fermentation process. The aim of this work was to investigate whether it is possible to produce a fermented beverage from brewers' spent grain using specific microorganisms capable of breaking down the high-molecular-weight polysaccharides (starch residues, cellulose) present in the spent grain, thus replacing the currently necessary chemical hydrolysis step.

Keywords: distillation, fermentation, deep-fermenting yeast

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Mláto	10
3.2 Produkce	10
3.2.1 Mletí.....	12
3.2.2 Vystírání	12
3.2.3 Rmutování.....	12
3.2.4 Scezování.....	12
3.3 Uchování mláta.....	13
3.3.1 Skladování	13
3.3.2 Konzervace	13
3.3.2.1 Sušení pomocí bubnových sušiček.....	13
3.3.2.2 Sušení v horkovzdušné sušárně.....	14
3.3.2.3 Lyofilizace a zmrazování	14
3.3.2.4 Siláž.....	14
3.4 Chemické složení.....	15
3.4.1 Lignocelulózový materiál	16
3.4.1.1 Celulóza.....	16
3.4.1.2 Lignin	17
3.4.1.3 Hemicelulóza.....	17
3.5 Pozitivní účinky na zdraví.....	17
3.5.1 Vlákna.....	18
3.6 Využití	18
3.6.1 Zkrmování hospodářskými zvířaty	18
3.6.2 Obohacení půdy	19
3.6.3 Výroba bioplynu	19
3.6.4 Výroba bioethanolu	20
3.6.5 Výroba dřevěného uhlí	20
3.6.6 Další využití.....	20
3.6.7 Využití v potravinářství	20
3.6.7.1 Chléb	21
3.6.7.2 Sušenky	21
3.6.7.3 Tortilové chipsy.....	23
3.6.7.4 Těstoviny	23

3.6.7.5	Rostlinný jogurt	24
3.6.7.6	Masné výrobky	24
3.7	Fermentace.....	26
3.7.1	Alkoholové kvašení	26
3.8	Kvasinky.....	27
3.8.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.8.2	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	28
3.8.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	28
3.8.4	<i>Torulaspota delbrückii</i>	29
3.8.5	<i>Aspergillus oryzae</i>	29
4	Metodika	30
4.1	Suroviny pro přípravu	30
4.2	Použité mikroorganismy.....	30
4.3	Přístroje.....	31
4.4	Stanovení extraktu mláta	31
4.4.1	Princip metody	31
4.4.2	Pracovní postup.....	31
4.4.3	Výpočet.....	32
4.5	Stanovení sušiny mláta	32
4.6	Příprava vzorku	32
4.7	Stanovení celkového obsahu polyfenolů.....	35
4.7.1	Postup.....	35
4.8	Stanovení ethanolu a dalších těkavých látek	35
5	Výsledky	36
5.1	Extrakt mláta.....	36
5.2	Celkový obsah polyfenolů.....	36
5.3	Stanovení ethanolu a dalších těkavých látek	37
6	Diskuze	41
6.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů.....	41
6.2	Stanovení ethanolu a dalších těkavých látek	41
7	Závěr.....	43
8	Literatura.....	44

1 Úvod

Pivovarství je celosvětově rozšířené průmyslové odvětví. Pivovary produkují velké množství odpadů, nejhojnější představuje mláto, které tvoří přibližně 85 % celkových vyprodukovaných vedlejších produktů. Mláto je dostupné za minimální náklady po celý rok, průměrná roční celosvětová produkce mláta se odhaduje přibližně na 39 milionů tun. Vzhledem k jeho nízké ceně a dostupnosti je mláto zajímavou surovinou, která má potenciál k použití v různých oblastech průmyslu

Dříve se mláto využívalo hlavně ke zkrmování hospodářskými zvířaty nebo se ukládalo na skládky. Dnes může být mláto alternativně využíváno v recyklaci a opětovném použití průmyslových odpadů díky rozvoji nových technologií. Mláto lze aplikovat v mnoha průmyslových odvětvích. Vzhledem k vysokému množství vlákniny, bílkovin a dalších cenných látek, jako jsou fenolické sloučeniny, vitaminy a minerální látky, má mláto četné využití v potravinářském průmyslu, kde představuje plnohodnotnou surovinu v mnoha výrobcích, jako je pečivo, sladké i slané pochutiny, těstoviny, dále také v masných výrobcích nebo jogurtu.

Díky vysokému obsahu vlákniny, zejména celulózy, je mláto eventuálně možnou surovinou k výrobě fermentovaného nápoje. Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné vyrobit fermentovaný nápoj z pivovarského mláta za použití specifických mikroorganismů schopných štěpit vysokomolekulární polysacharidy (zbytky škrobu, celulóza) přítomné v mlátě a nahradit tak v současnosti nutný krok chemické hydrolýzy.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit, zda je možné vyrobit fermentovaný nápoj z pivovarského mláta s vlastnostmi, které by byly srovnatelné s charakteristikami běžných fermentovaných nápojů.

Hypotéza: při použití vhodných mikrobiálních kultur lze mláto zkvasit na nápoj obsahující ethanol.

3 Literární rešerše

3.1 Mláto

Pivovarské mláto (BSG) je definováno jako zbytek po oddělení mladiny během procesu vaření piva (Santos 2013). Obsahuje pluchy, oplodí a obaly vnějších vrstev zrn ječmene a dalších obilovin obsahující živiny, které nejsou extrahovány během sladování a rmutování (Bianco et al. 2020). BSG je nejvýznamnější vedlejší produkt pivovarnického průmyslu a představuje přibližně 85 % z celkového množství vyprodukovaných vedlejších produktů (Mussatto et al. 2006). Ze 100 kg sladu lze získat 100–130 kg čerstvého mláta, což vychází na 21–22 kg BSG na hektolitr uvařeného piva (Bianco et al. 2020).

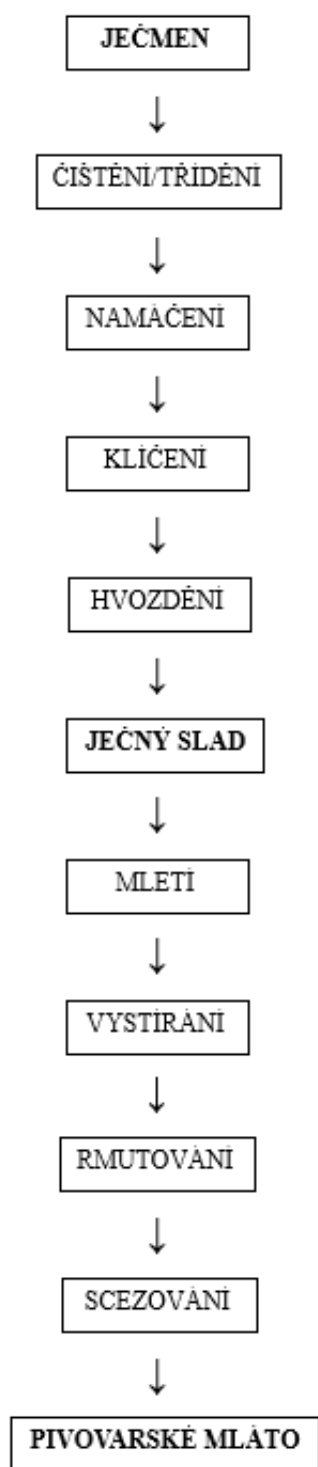
Průměrná roční celosvětová produkce BSG se odhaduje přibližně na 39 milionů tun, přičemž asi 3,4 milionů tun je vyprodukováno v Evropské unii (Lynch et al. 2016). V minulosti se mláto vytvořené pivovarskou činností využívalo hlavně ke zkrmování hospodářskými zvířaty, v menší míře také k výrobě bioplynu nebo bylo uloženo na skládku (Bianco et al. 2020). Mláto je dostupné za minimální náklady po celý rok a je produkováno ve velkém množství nejen velkými, ale i malými pivovary (Mussatto 2014). BSG je také velmi cennou surovinou z pohledu nutriční hodnoty. Obsahuje vysoké množství vlákniny, bílkovin a dalších cenných látek. BSG se pro všechna tato pozitiva stává zajímavou surovinou, která má potenciál v použití v různých průmyslových odvětvích (Mussatto 2014).

3.2 Produkce

Mláto vzniká při výrobě piva, jednotlivé kroky vedoucí k získání mláta jsou znázorněny na Obrázku 1. Představuje nerozpustné zbytky rozemletých sladových zrn, které byly odděleny od sladiny v průběhu scezování. Slad, který je hlavní surovinou pro výrobu piva, se vyrábí v několika krocích: čištění a třídění, máčení, klíčení a hvozďení.

Před samotnou výrobou sladu je potřeba zbavit ječmen nečistot a jiných nežádoucích částic, jako je písek, kaménky, jiná zrna, pluchy, různé úlomky zrn, slámy, dřeva, kovových částic apod. Dále se ječmen třídí podle velikosti zrn. Tyto procesy jsou velice důležité k výsledné kvalitě sladu.

Prvotním a velmi významným technologickým úsekem výroby je máčení ječmene, které trvá většinou po dobu 3 dnů, během kterých je třeba ječným zrnům dodávat vzduch pomocí provzdušnění nebo vzdušných přestávek. Cílem máčení je zvýšit obsah vody v ječmenu až na 48 % (pro světlý slad na 40–44 %, pro tmavý slad 45–48 %). Po máčení následuje proces klíčení. Doba klíčení je různá, trvá, dokud klíčky nemají 3/4 délky zrna, přibližně je to asi 5 dní. Při klíčení dochází k aktivaci enzymů. Cílem hvozďení je zastavit všechny vegetační procesy (především klíčení), zastavit aktivaci enzymů, snížit množství vody a vytvořit chuťové, barevné a oxidačně-redukční láky odpovídající typu sladu. Hvozďení se dělí do tří fází: růstová, kdy sladové zrno obsahuje více než 20 % vody a je schopné dalšího klíčení. Následně enzymová, kdy obsah vody je pod 20 %, zastavují se vegetační procesy, ale enzymové pokračují. A poslední chemická, kdy se obsah vody dostává pod 10 %, zastavují se enzymové reakce a vznikají chuťové a barevné látky (Basařová 2015).



Obrázek č. 1: Schematické znázornění procesu získání BSG z přírodního ječmene (Mussato et al. 2006)

3.2.1 Mletí

Výroba piva začíná mletím neboli šrotováním sladových zrn. Jedná se o mechanický proces, při kterém se drtí endosperm, aby se zpřístupnil pro fyzikálně-chemické a enzymové reakce při výrobě mladiny, zároveň se ale musí co nejméně poškodit celistvost pluch. Způsob mletí se vybírá dle zařízení, které je k dispozici pro scezování (Basařová et al. 2021).

Mezi základní způsoby mletí patří: mletí za sucha, mletí za sucha s oddělením jednotlivých frakcí, mletí s kondicionováním, při kterém se slad zvlhčí tlakovou vodou či párou před samotným mletím, anebo také příprava velmi jemného moučnatého šrotu. Tento postup se využívá pro speciální vakuové filtry určené k oddělování mláta (Basařová et al. 2021). Ke šrotování se využívají dvouválcové až šestiválcové šrotovníky (Chládek 2007).

3.2.2 Vystírání

Vystírání je proces smísení sladového šrotu a vody, vzniklá směs se nazývá vystírka. Při vystírání je velmi důležité, aby byl slad důkladně rozmíchán, aby na povrchu nezůstávaly nerozmočené zbytky sladového šrotu. Rozlišují se dva typy vystírání: studené a teplé. Studené probíhá při teplotě vody pod 20 °C, kdy se předpokládá uvolňování dusíkatých látek za delší časový úsek. Teplé vystírání probíhá při teplotě vody 35–38 °C a je typické pro výrobu českých piv. Délka vystírání je přibližně 10–30 minut dle použitého postupu (Basařová et al. 2021).

3.2.3 Rmutování

Po vystírání následuje proces rmutování, během kterého se směs sladového šrotu s vodou zahřívá na optimální teploty působení sladových enzymů. Nejdůležitější sladové enzymy jsou α -amyláza a β -amyláza, které jsou zodpovědné za štěpení škrobu na zkvasitelné sacharidy. Po ukončení zcukření škrobu je rmutování ukončeno zahřátím směsi na 78 °C za účelem denaturace zbývajících enzymů a zastavení jejich aktivity (Jackowski et al. 2020).

3.2.4 Scezování

Po skončení rmutování začíná fáze scezování, kdy se sladina odděluje od mláta. Tento proces probíhá ve scezovací kádi, která je vybavena perforovaným (jalovým) dnem. Po napuštění díla mláto sedimentuje na dno scezovací kádě a vytváří vrstvu vysokou 20–30 cm, přes kterou protéká sladina. Dokud je sladina kalná, vrací se zpět do scezovací kádě, čirá odtéká do mladinové pánve. Po ukončení stékání sladiny dochází k vyslazování, během kterého se mláto skrání horkou vodou, aby se snížil obsah sacharidů zachycený v mlátě (Chládek 2007).

3.3 Uchování mláta

Mokrý pivovarské mláto obsahuje cca 80 % vody spolu se zkvasitelnými cukry, což ho činí nestabilním a náchylným k mikrobiologickému znehodnocení (Ivanova et al. 2017), přičemž čím vyšší je obsah vody v mlátě, tím horší je jeho stabilita (Jedlička 2017). Chetrariu & Dabija (2020) uvádějí skladovatelnost mláta 7-10 dní, ale dle Preissinger et al. (2008) je aerobní stabilita mláta 2-3 dny a v teplém ročním období jen 1,5 dne. Silážované mláto vydrží v dobrém stavu až 6 měsíců. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje BSG konzervovat (Jedlička 2017).

3.3.1 Skladování

Dlouhodobé uchování mláta přináší výhody zejména v zimních měsících, kdy krmiva pro hospodářská zvířata je podstatně méně. Lze vytvořit dostatek zásob pro období s nízkou produkcí mláta, aniž by bylo přerušeno nebo omezeno množství mláta v krmné dávce. Krmná dávka je po celou dobu víceméně stejná a nedochází k výrazným změnám. Zároveň lze získat mláto za nižší cenu v letním období oproti zimnímu. Ve srovnání se sušeným mlátem je ekonomicky výhodnější (Mráz Agro 2018).

Mláto se běžně skladuje v polyetylenových vacích či v silážních žlabech, kde je ošetřeno konzervanty a anaerobně utěsněno. Po třech týdnech je dokončena fermentace a silážované pivovarské mláto je možné zkrmovat zvířatům či dále skladovat až po dobu šesti měsíců (Jedlička 2017).

3.3.2 Konzervace

Konzervace je proces, který slouží k ochraně a prodloužení životnosti organických materiálů. Cílem konzervace je zabránit růstu mikroorganismů, kvašení, oxidaci, enzymatickým procesům a dalším faktorům, které mohou vést k poškození a znehodnocení produktu.

Existuje několik způsobů konzervace mláta, mezi ty nejčastější patří: sušení pomocí bubnových sušiček, sušení v horkovzdušné sušárně, lyofilizace, zmrazení a siláž. Jednotlivé konzervace se liší v mnoha aspektech, jako je ekonomická a časová náročnost nebo třeba v zachování nutričních a sensorických vlastností.

3.3.2.1 Sušení pomocí bubnových sušiček

Sušení je považováno za nejúčinnější metodu konzervace BSG (Aliyu & Bala 2011). Tradiční proces sušení probíhá ve dvou krocích. Prvním je lisování, při kterém se obsah vody sníží pod 60 %. Poté následuje druhý krok sušení za pomoci rotačních bubnových sušáren, během kterého se obsah vlhkosti sníží pod 10 % (Johnson et al. 2010) (Aliyu & Bala 2011). Sušení probíhá 18 hodin při teplotách do 60 °C (Santos 2003). Je považováno za energeticky náročné ve srovnání s jinými metodami sušení (Aliyu & Bala 2011).

3.3.2.2 Sušení v horkovzdušné sušárně

Druhou nejčastěji používanou metodou je sušení v horkovzdušné sušárně. Jedná se o široce používanou metodu sušení BSG. Toto sušení probíhá 50 min při teplotě do 70 °C (Pratap-Singh 2020). Je častěji používané díky nižším nákladům ve srovnání s jinými sušicími technikami (Santos 2003). Nevýhodou této techniky je vysoká teplota v blízkosti výstupu ze sušičky, která může způsobit spálení materiálu a vznik nežádoucích zápachů (Johnson et al. 2010).

3.3.2.3 Lyofilizace a zmrazování

Dalšími metodami, které je možné použít pro konzervaci mláta, jsou lyofilizace a zmrazování. Lyofilizace probíhá několik hodin při teplotě -54 °C a je ekonomicky velmi náročná (Pratap-Singh 2020). Výhodou lyofilizace je, že složení mláta zůstává nezměněno. U zmrazování bylo zjištěno, že zmrazené vzorky mají vyšší obsah bílkovin a tuku ve srovnání s lyofilizovanými a sušenými vzorky, avšak nižší obsah cukru (zejména arabinózy) (Zeko-Pivač et al. 2022), proto se tato metoda skoro nepoužívá.

3.3.2.4 Siláž

Siláž je dalším druhem konzervace. Pro získání kvalitní siláže je nutné dodržet několik následujících podmínek. Hodnota pH silážní hmoty by se měla pohybovat v rozmezí 4,0–4,2 a sušina by měla dosahovat 30 %. Ideální teplota pro silážování je v rozmezí 20–30 °C, zatímco při skladování by teplota měla být udržována pod 15 °C. Aby se zabránilo vzniku hnilobných bakterií a plísní v silážní hmotě, je třeba rychle zamezit přístupu kyslíku a následně jej zcela odstranit. V takovém prostředí začnou bakterie mléčného kvašení tvořit kyselinu mléčnou, která rychle snižuje pH, čímž inhibuje růst klostridií. Použití organických a anorganických kyselin je považováno za jedno z nejúčinnějších aditiv pro silážování. Kromě zmíněné kyseliny mléčné se používají také kyseliny octová, mravenčí, benzoová, chlorovodíková a sírová. Poslední dvě jmenované jsou velmi účinné, avšak jsou v rozporu se snahou o použití co nejpřirozenějších konzervantů. Kyselina mravenčí se často používá pro své antibakteriální účinky proti mnoha druhům bakterií a je považována za nejúčinnější prostředek pro zlepšení kvality siláže (Terefe 2022). Pro úspěšné silážování je důležité minimalizovat ztráty výživových hodnot a zajistit vysokou hygienickou kvalitu.

3.4 Chemické složení

Z chemického hlediska je mláto složeno z lignocelulózového materiálu (70 % v sušině), proteinů (20 %) a lipidů (10 %) (Terefe 2022), významné složky mláta jsou uvedeny v Tabulce 1. Mláto obsahuje aminokyseliny, mastné kyseliny, minerální látky a vitaminy. BSG také obsahuje vosky, pryskyřice, třísloviny a silice (Ikram et al. 2017).

Tabulka č. 1: Významné obsahové složky mláta (Nagy & Diósi 2021)

Analytické složky	Množství v sušině (g/kg)
Hrubý protein	233,0
Hrubá vláknina	195,0
Hrubé tuky	71,0
Hrubý popel	46,0
Škrob	45,0

Nejvíce vyskytující se aminokyseliny v mlátě jsou threonin, izoleucin, valin, fenylalanin, lysin a leucin (Farcas et al. 2021), jejich množství je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka č. 2: Obsah aminokyselin s největším zastoupením v mlátě (Nagy & Diósi 2021) (Ikram et al. 2017)

Aminokyseliny	Množství v sušině (g/kg)
Lysin	9,7
Threonin	8,8
Methionin	5,0
Cystin	4,7

V BSG se vyskytují mastné kyseliny, jako například kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová a kyselina linolová (Tan et al. 2019), jejich množství je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka č. 3: Obsah mastných kyselin v mlátě (Nagy & Diósi 2022) (Zeko-Pivač et al. 2022)

Mastné kyseliny	Množství v sušině (g/kg)
Kyselina palmitová	1,805
Kyselina stearová	0,596
Kyselina olejová	0,041
Kyselina linolová	0,445

Z minerálních látek se v BSG vyskytuje vápník, fosfor, kobalt, měď, železo, hořčík, mangan, draslík, selen, sodík a síra (Ivanova et al. 2017), množství nejvýznamnějších minerálních látek je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka č. 4: Obsah minerálních látek s největším zastoupením v mlátě (Nagy & Diósi 2021)
(Mráz Agro 2018)

Minerální látky	Množství v sušině (g/kg)
P	6,2
Ca	4,0
Mg	1,7
K	0,47
Na	0,18

Mezi vitaminy vyskytující se v mlátě patří biotin, cholin, kyselina listová, niacin, kyselina pantotenová, riboflavin, thiamin a pyridoxin (Nagy & Diósi 2021), množství nejvýznamnějších vitaminů je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka č. 5: Obsah vitaminů s největším zastoupením v mlátě (Nagy & Diósi 2021)

Vitaminy	Množství v sušině (mg/kg)
Vitamin B1	25,0
Vitamin B2	25,0
Vitamin B6	9,0
Vitamin K	4,5

3.4.1 Lignocelulózový materiál

Lignocelulózový materiál představuje nejhojněji dostupnou surovinu na Zemi, jež se využívá pro výrobu biopaliv (především bioethanolu). Biomasa zahrnuje lesnické, zemědělské a zemědělsko-průmyslové odpady. Mezi takové odpady patří kromě pivovarského mláta také piliny, bagasa z cukrové třtiny, odpadový papír, proso, různá stébla, stonky, listy, slupky, skořápky a jiné. Tyto odpady se hromadí v životním prostředí každý rok ve velkém množství. Vzhledem k jejich chemickému složení na bázi cukrů jsou předmětem zájmu, a mohou být využity v řadě průmyslových odvětví (Mussatto et. al 2010). Hlavními složkami lignocelulózy jsou celulóza (30–50 %), hemicelulóza (20–35 %) a lignin (10–25 %) (Saha 2003).

3.4.1.1 Celulóza

Celulóza je nejhojněji se vyskytující biopolymer v přírodě. Představuje hlavní stavební látku rostlinných primárních buněčných stěn, spolu s ligninem a hemicelulózami se podílí na stavbě sekundárních buněčných stěn. Celulóza je nerozpustná ve vodě a ve většině běžných rozpouštědel. Její špatná rozpustnost je přisuzována především díky silným intramolekulárním a intermolekulárním vodíkovým vazbám mezi jednotlivými řetězci. Celulóza se používá v mnoha odvětví výroby, například při výrobě síťoviny, nátěrů, obalů, papíru nebo také v čalounictví (Kamel et al. 2008).

3.4.1.2 Lignin

Lignin je polyfenolická makromolekula s komplexní strukturou, která je důležitá pro udržení strukturální rigidity a integrity stěn rostlinných buněk (Lynch et al. 2016). Lignin je zodpovědný za několik funkcí, které jsou nezbytné pro život rostliny. Jednou z nich je snížení prostupu vody přes buněčnou stěnu. Dále je důležitý při transportu vody, živin a metabolitů uvnitř rostliny. Lignin také zpevňuje buněčné stěny a působí jako pojivo mezibuněčných vláken, čímž zajišťuje celistvost rostliny a činí ji mimořádně odolnou vůči stlačení, nárazu a ohybu. Také činí rostliny odolné vůči biologickým degradacím (Lebo et al. 2002)

3.4.1.3 Hemicelulóza

Hemicelulóza je hlavní složkou mláta a může být přítomna v množství až 40 %. Jedná se o heterogenní polymery pentóz (xylóza, arabinóza), hexóz (manóza, glukóza, galaktóza) a cukerných kyselin. Oproti celulóze není chemicky homogenní. Hemicelulózy z tvrdého dřeva obsahují převážně xylany, hemicelulózy z měkkého dřeva obsahují převážně glukomanany. Xylany jsou nejhojnější hemicelulózy a lze je kategorizovat do čtyř skupin: lineární homooxylany, arabinoxylany, glukuronoxylany a glukuronoarabinoxylany (Saha 2003).

V mlátu se nejvíce vyskytuje arabinoxylan a to v množství 30–40 % (Saha 2003). Arabinoxylan je hlavní necelulózový polysacharid vyskytující se v obilovinách (oves, kukuřice, žito) a travách (Lynch et al. 2016), výhoncích bambusu a semenech lnu. Společně s arabinoxylany tvoří β -glukany hlavní podíl škrobového endospermu a aleuronové vrstvy ječmene. Až 75 % β -glukanů je přítomno ve škrobovém endospermu, 20–25 % v aleuronu a 4 % v oplodí. Nejvíce β -glukanů se vyskytuje v ječmenu a ovsu, kromě obilovin se β -glukany hojně vyskytují také v buněčných stěnách bakterií a hub (Emmanuel et al. 2022).

3.5 Pozitivní účinky na zdraví

V posledních letech se mláto jeví jako potenciální zdroj zdraví prospěšných látek. Mezi hlavní složky BSG totiž patří vláknina (30–50 %) a bílkoviny (19–30 %) (Lynch et al. 2016), které jsou základními nutričními složkami v lidské stravě.

BSG je také bohaté na fenolické sloučeniny, zejména kyselinu ferulovou, p-kumarovou a hydroxyskořicovou, které mají protizánětlivé a antioxidační účinky. Tyto účinky se využívají při léčbě chronických zánětlivých onemocnění (Cooray et al. 2017). Další nalezené fenolické sloučeniny v BSG jsou kyselina chlorogenová, kávová, syringová a vanilová, které kromě antioxidačních účinků vykazovaly také protirakovinné účinky. Byla provedena studie na myších, která zkoumala účinnost některých kyselin při léčbě nádorového onemocnění. Výsledky účinnosti léčby pomocí kyselin byly následující: kyselina chlorogenová – 60 %, kyselina ferulová – 28 % a kyselina kávová – 35 % (Farcas et al. 2021). V jiné studii bylo prokázáno, že BSG ze světlých sladů obsahuje vyšší množství fenolických sloučenin ve srovnání s BSG z tmavého sladu. Dále bylo zjištěno, že antioxidační aktivita se snížila v důsledku zvyšujících se teplot hvozdu (Lynch et al. 2016).

3.5.1 Vlákna

Mláto je cennou surovinou zejména pro svůj vysoký obsah vlákniny v množství (30–50 %). Je obecně známo, že strava bohatá na vlákninu je pozitivně spojena s různými zdravotními přínosy, mezi které patří snížení výskytu chronických onemocnění, jako je obezita, srdeční choroby a cukrovka. Dále vláknina navozuje pocit sytosti, snižuje vstřebávání lipidů a cholesterolu ve střevě, napomáhá kontrole hladiny glukózy v krvi a zpomaluje trávení. Konzumací celozrnných potravin lze snížit riziko ischemické choroby srdeční.

Vláknina je klasifikována podle rozpustnosti. Rozpustná vláknina zahrnuje β -glukany, pektiny, arabinogalaktany, vysoce rozvětvené arabinoxylany a xyloglukany. Nerozpustná vláknina zahrnuje lignin, celulózu, nízko rozvětvené arabinoxylany, xyloglukany a galaktomannany (Ikram et al. 2017).

Bylo zjištěno, že právě β -glukany a arabinoxylany mají prebiotický účinek a příznivě ovlivňují aktivitu prospěšné mikrobiální populace *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Lactobacillus* (Emmanuel et al. 2022). Zdravá populace těchto bakterií je považována za důležitou pro udržení zdraví střev. V posledních letech bylo provedeno mnoho výzkumů na potravinách z naklíčeného ječmene, který se mele a prosévá za účelem získání produktu bohatého na vlákninu a glutamin. Naklíčený ječmen se používá k léčbě pacientů se zánětlivými střevními onemocněními (ulcerózní kolitida, Chronova choroba) (Ikram et al. 2017).

3.6 Využití

V současné době se usiluje o snížení znečištění, které vzniká průmyslovou činností. Téměř všechny vyspělé i zaostalé země se snaží této skutečnosti přizpůsobit úpravou svých procesů tak, aby jejich zbytky mohly být recyklovány. V důsledku toho se pivovarské zbytky nepovažují za odpad, ale za surovinu pro další procesy (Mussatto et al. 2006). Dříve se mláto vytvořené pivovarskou činností využívalo hlavně ke zkrmování hospodářskými zvířaty. Nyní díky rozvoji nových technologií, může být BSG alternativně využíváno v recyklaci a opětovném použití průmyslových odpadů (Lynch et al. 2016). Byly provedeny studie zkoumající možnosti využití mláta například při výrobě bioplynu a dřevěného uhlí nebo jako složka k obohacení půdy. Mláto našlo své využití hlavně v potravinářském průmyslu jako surovina v mnoha výrobcích, např. pečiva, sladkých i slaných pochutin, těstovin, dále také v masných výrobcích nebo jogurtu.

3.6.1 Zkrmování hospodářskými zvířaty

Jak již bylo zmíněno výše, BSG je bohaté na cukry a bílkoviny, proto je jeho hlavní využití zkrmování hospodářskými zvířaty (Mussatto 2014). BSG se přidává do krmiva zejména skotu. Bylo zjištěno, že obohacením krmiva mlátem se zvýšila produkce mléka. Tyto pozitivní změny podnítily použití mláta do krmiv také pro drůbež, prasata a ryby. Při zkrmování prasatům byl zaznamenán nárůst hmotnosti a zlepšení kvality masa (Zeko-Pivač et al. 2022). U drůbeže je třeba být obezřetný s množstvím mláta přidaného do krmiva, jelikož

gastrointestinální trakt ptáků není schopný strávit většinu polysacharidů přítomných v buněčných stěnách mláta (včetně arabinoxylanu a β -glukanu), protože nemá enzymy potřebné pro hydrolýzu těchto polymerních řetězců. Možným řešením tohoto problému je přidávání enzymů xyilanázy a β -glukanázy do krmiva společně s mlátem (Mussatto 2014). Bylo zjištěno, že když bylo v krmivu ryb *Pangasianodon hypophthalmus* nahrazeno 50 % sójové mouky mlátem, ryby měly větší hmotnost, obsah bílkovin byl výrazně vyšší a náklady na krmivo se snížily o 27,56 % (Chetrariu & Dabija 2020). Mláto lze zvířatům zkrmovat za sucha i za mokra. Díky jeho nízké ceně srovnatelné s močovinou jej lze využít jako zdroj aminokyselin potřebných pro výživu zvířat (Emmanuel et al. 2022).

3.6.2 Obohacení půdy

Mláto má také přímé využití ve formě přídatku do půdy, jelikož obsahuje spoustu cenných živin jako je fosfor a draslík, které jsou důležité pro zemědělské plodiny (Jackowski et al. 2020). BSG zvyšuje podíl organické hmoty, stabilitu agregátů a retenci vody. Přídavkem mláta do půdy se zlepšuje její využitelnost žížalami, jako příklad lze uvést jeho použití k vermikompostování žížalou *Eisenia fetida* při výrobě biologického hnojiva. Vhodnost BSG jako substrátu pro růst těchto kroužkovic dokazují výsledky sníženého organického uhlíku, zvýšeného dusíku a celkové humusové hmoty, což vyvolává zvýšenou mineralizaci a stabilizaci (Bianco et al. 2020).

3.6.3 Výroba bioplynu

Několik studií uvádí možnost výroby bioplynu z BSG. Bioplyn označuje směs plynů, která vzniká anaerobním rozkladem biomasy za vzniku methanu. Skládá se z methanu (40–75 %), vody (0–10 %), oxidu uhličitého (25–55 %), sirovodíku (1–3 %), amoniaku, dusíku, kyslíku a vodíku. Bioplyn má tepelnou hodnotu přibližně 22 MJ/m³ (Chetrariu & Dabija 2020).

Získávání bioplynu z BSG zahrnuje dvě technologické části: hydrolytický stupeň, během kterého dochází k úplné degradaci materiálu. Jedná se o velmi důležitý krok k dosažení vysokých výtěžků. Druhým je methanogenní stupeň, kde se makromolekuly uvolněné v předchozí fázi přeměňují za pomoci mikroorganismů na těkavé mastné kyseliny, acetáty, butyrát, propionát a methan. Předúpravy hrají důležitou roli při degradaci krystalické struktury molekul celulózy a snižují stupeň polymerace, což usnadňuje enzymatickou hydrolýzu na jednoduché cukry. Alkalická předúprava poskytuje příznivé pH prostředí pro další fermentaci, která je účinnější (Chetrariu & Dabija 2020). Po 15 dnech digesce v dávce anaerobní fermentace byl výtěžek bioplynu 3476 cm³ na 100 g BSG. Produkci bioplynu z BSG zpomalují meziprodukty lignocelulóзовé biodegradace, především p-kresol. Inhibici nelze zabránit ani podrobením mláta chemické, termochemické a mechanické předúpravě. Produkce bioplynu z BSG je aktuálně výzkumnou oblastí s cílem vyvinout stabilní výrobní proces. Adaptace anaerobní mikrobiální biomasy na zvýšené koncentrace p-kresolu a také vystavení BSG fázi biologického předběžného ošetření houbami nebo bakteriemi, by mohly být možné alternativy k zamezení tohoto problému (Mussatto 2014).

3.6.4 Výroba bioethanolu

Ethanol vyráběný z obnovitelných zdrojů je potenciální náhradou za fosilní paliva s cílem snížit emise oxidu uhličitého, hlavního skleníkového plynu. Potenciální surovinou k výrobě bioethanolu je lignocelulóзовý materiál. Jak hemicelulóзовé, tak celulóзовé frakce BSG lze použít pro výrobu ethanolu. K výrobě ethanolu z celulózy je nutná určitá předúprava suroviny, aby se usnadnila extrakce glukózy z celulózy pro následné použití jako zdroj uhlíku pro fermentaci. Předběžná úprava může mimo jiné zahrnovat například úpravu kyselinou, mikrovlnnou digesci, ultrazvuk nebo enzymatickou hydrolyzu. Po předběžné úpravě se štěpí lignocelulóзовý materiál na jednoduché cukry. Jednoduché cukry se následně fermentují na ethanol pomocí aktivity mikroorganismů (například *Saccharomyces cerevisiae*) (Mussato 2014) (Marcus & Fox 2021).

3.6.5 Výroba dřevěného uhlí

Mussatto a kolektiv (2016) uvádí, že z mláta lze vyrobit brikety dřevěného uhlí. Ve výrobním procesu se mláto o vysokém obsahu vody se suší, lisuje a karbonizuje při nízké teplotě a za minimálního přístupu kyslíku. Takto vyrobené brikety mají vysokou výhřevnost – 27 MJ/kg, což je velice příznivé v porovnání s výhřevností dřevěného uhlí vyrobeného z jiných surovin (dřevo – 25,5 MJ/kg). Ve vzorku brikety bylo naměřeno 81 % uhlíku a 12 % popela. Největší zastoupení minerálních látek v cihlách vykazovaly fosfor – 47 %, vápník – 22 %, hořčík – 14 % a křemík – 13 %.

3.6.6 Další využití

Již bylo zmíněno v kapitole Chemické složení, že mláto je složeno z lignocelulóзовého materiálu. Díky jeho vláknité struktuře a nízkému obsahu popela je mláto vhodné pro použití ve stavebních materiálech. Přidáním BSG do cihel se zvýšila pórovitost cihel a tím je možnou náhradou za piliny, které se běžně používají ke zvýšení pórovitosti. BSG nesnížilo kvalitu cihel, ani jejich barvu (Mussatto et al. 2006).

Mláto může také sloužit jako substrát pro kultivaci mikroorganismů a produkci enzymů nebo jako substrát ve fermentačních procesech, jako je výroba xylitolu či kyseliny mléčné (Chetrariu & Dabija 2020).

3.6.7 Využití v potravinářství

Samostatná kapitola je věnována využití mláta v potravinářství, jelikož ho lze zakomponovat do spousty výrobků. Mláto se používá zejména v pekárenském průmyslu k výrobě výrobků s vysokým obsahem bílkovin a vlákniny. Přidávat BSG lze do chlebů (Pei et al. 2022), muffinů, sušenek, koláčů, vafelí, palačinek, koblih či tortill. Přidáním 10 % mláta do pekárenského výrobku se obsah bílkovin může zvýšit až o 50 %, esenciální aminokyseliny o 10 % a obsah vlákniny se může zdvojnásobit ve srovnání s tradičními výrobky bez BSG

(Mussato et al. 2006). V následujících kapitolách jsou shrnuty studie zaměřené na sledování vlastností potravin obohacených mlátém.

3.6.7.1 Chléb

Baiano et al. (2023) testovali výrobu chleba s příměsí mláta. Cílem bylo zjistit, zda je možné mouku alespoň částečně nahradit pivovarským mlátém za účelem využití potravinového odpadu, a tím ušetřit náklady na jeho likvidaci. V rámci experimentu bylo vyrobeno třináct druhů chleba, jeden kontrolní vzorek a dvanáct vzorků vzniklých kombinací mouky Manitoba a mláta. Mouka byla nahrazena mlátém z 20 a 25 %, přičemž do každého vzorku bylo přidáno různé množství lepku. Vlákna ze vzorků byla extrahována a analyzována pomocí enzymaticko-gravimetrické metody. Bylo zjištěno, že částečné nahrazení pšeničné mouky BSG vedlo k významnému zvýšení obsahu fenolů a nerozpustné a rozpustné dietní vlákniny v obohacených chlebech. Ikram et al. (2017) uvádí, že chleby obohacené o BSG obsahují více vlákniny, ale zároveň mají tužší konzistenci, kratší trvanlivost, a dokonce objem bochníku byl menší než u chlebu vyrobeného pouze z pšeničné mouky.

3.6.7.2 Sušenky

Petrovic a kolektiv (2017) sledovali účinek přidání pivovarského mláta do pšeničné mouky při výrobě sušenek. Mláto bylo v čerstvém stavu, tj. nesušené a nemleté a přidávalo se v různém množství. Byly připraveny čtyři vzorky, ve třech vzorcích byla pšeničná mouka nahrazena různým množstvím mláta (15 %, 25 % a 50 %), poslední vzorek sloužil jako kontrolní vzorek. Vzorky byly označeny následovně: Kontrolní vzorek (pouze s pšeničnou moukou), B15 – 15% mláta, B25 – 25% mláta, B50 – 50% mláta.

Na přípravu těsta na sušenky byly kromě pšeničné mouky a mláta použity následující suroviny: rostlinný tuk, cukr, jedlá soda, cukrářské droždí a sůl. Připravené těsto se peklo 10 minut při teplotě 220 °C v laboratorní peci. Obsah bílkovin v sušenkách byl stanoven pomocí Kjeldahlovy metody. Celkový obsah vlákniny pomocí kombinace enzymatických a gravimetrických metod, z výsledků uvedených v Tabulce 6 je průkazný nárůst množství bílkovin a vlákniny v sušenkách v závislosti na přídavku mláta (Petrovic et al. 2017).

Tabulka č. 6: Obsah bílkovin a vlákniny v sušenkách (Petrovic et al. 2017)

Vzorek	Bílkoviny (%)	Vlákna (%)
Kontrolní	5,49	3,1
B15	7,55	6,8
B25	8,28	8,5
B50	9,69	15,55

Dále byla provedena mikrobiologická analýza s cílem zjistit mikrobiologický profil jednotlivých sušenek podle množství přidaného mláta kromě vzorků s přídavkem mláta byl testován i kontrolní vzorek a samotné čerstvé mláto. Cílem bylo zjistit, zda použití čerstvého

mláta ve výrobě nemůže způsobit mikrobiologické problémy, které by zabránily použití této aplikace v potravinářství. Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 7 a 8 (Petrovic et al. 2017).

Tabulka č. 7: Mikrobiologický profil (anaerobní mezofilní bakterie, kvasinky a plísně, *Escherichia coli*) sušenek podle množství přidaného mláta (cfu/g) (Petrovic et al. 2017)

Vzorek	Aerobní mezofilní bakterie	Kvasinky a plísně	<i>Escherichia coli</i>
BSG	$4,0 \times 10^5$	<10	nd
Kontrolní	$3,8 \times 10^3$	<10	nd
B15	$4,3 \times 10^3$	<10	nd
B25	$5,5 \times 10^3$	<10	nd
B50	$7,5 \times 10^3$	<10	nd

nd = nedetekováno

Tabulka č. 8: Mikrobiologický profil (*Clostridium spp.*, *Enterobacteriaceae*, Aerobní mezofilní sporulující bakterie) sušenek podle množství přidaného mláta (cfu/g) (Petrovic et al. 2017)

Vzorek	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Aerobní mezofilní sporulující bakterie
BSG	nd	40	$1,8 \times 10^2$
Kontrolní	nd	<10	$7,5 \times 10^2$
B15	nd	<10	$5,5 \times 10^3$
B25	nd	<10	$9,0 \times 10^2$
B50	nd	<10	$2,5 \times 10^3$

nd = nedetekováno

Výsledky dokazují, že BSG lze přidat do potravin za účelem zvýšení nutriční hodnoty. Vzorek, kde byla pšeničná mouka nahrazena z 50 % mlátem, vykazovala 1,75x více bílkovin a 5x více vlákniny oproti vzorku připraveného pouze z pšeničné mouky.

V mikrobiologické rozboru bylo zjištěno, že mláto je náchylné k mikrobiálnímu napadení, což lze přisoudit k vysokému obsahu vody. Celkový mikroorganismů se zvyšoval s množstvím přidaného BSG ve vzorcích sušenek (nejvyšší byl u vzorku B50). *Escherichia coli* a *Clostridium spp.* nebyly zjištěny ani BSG, ani ve vzorcích sušenek.

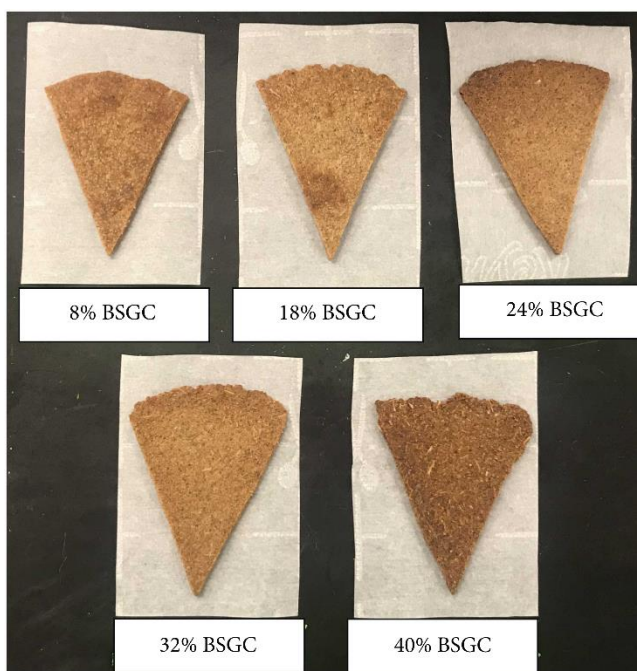
Ze senzoričského hlediska byl nejlépe hodnocený vzorek B25. Nicméně přídavek BSG měl negativní vliv na tvrdost a žvýkatelnost, rozdíly byly pozorovány i ve vzhledu sušenek, na kterých se objevily praskliny. Sušenky s přídavkem mláta měly tmavší barvu ve srovnání s kontrolními, což bylo pravděpodobně způsobeno Maillardovou reakcí díky vyššímu obsahu bílkovin.

Ze studie vyplývá, že přídavek BSG do těsta při výrobě sušenek zvyšuje obsah bílkovin a vlákniny, nicméně autoři doporučují, aby množství přidaného mláta nepřekročilo 25 % (Petrovic et al. 2017).

3.6.7.3 Tortillové chipsy

Díky své křehké struktuře, silné ořechové chuti a tmavým barevným profilům bylo BSG použito na výrobu tortillových chipsů. Cílem této studie bylo vyvinout chutný produkt, i přes zakomponování BSG. Mláto bylo do chipsů přidáno rozemleté v podobě mouky v množství od 8 % do 40 %. Před rozemletím bylo sušeno při nízké teplotě. Zkoumány byly fyzikální a sensorické vlastnosti za účelem vyhodnocení chuti, textury a pravděpodobnosti nákupu. Dále se hodnotila aktivita vody, barva a textura (Garrett et al. 2021).

Výsledky ukázaly, že nebyly žádné významné rozdíly v textuře chipsů obsahující různé množství BSG. Při měření barev zaznamenal narůst pigmentu vzorek obohacený o 40 % mláta, ostatní vzorky vykazovaly minimální rozdíly (Obrázek 2). Výsledky sensorického hodnocení ukázaly, že spotřebitelé preferovali texturu chipsů s 40 % BSG před chipsy s 8 % BSG a také častěji nakupovali chipsy se 40 % BSG. Spotřebitelé uvedli, že mezi chipsy obsahujícími různé množství BSG nebyly žádné významné chuťové rozdíly (Garrett et al. 2021). Ze závěru studie vyplívá, že množství přidaného BSG může dosahovat až 40 % v souvislosti s pozitivními reakcemi spotřebitelů.



Obrázek č. 2: Vzorky chipsů s různým množstvím BSG (Garrett et al. 2021)

3.6.7.4 Těstoviny

Schettino et al. (2021) testovali mláto jako přísadu k obohacení semolinových těstovin. Ve svém výzkumu sledovali, jak se změní složení těstovin, zejména makrosložky – bílkoviny, lipidy, sacharidy a vláknina po přidání mláta, výsledky jsou zaznamenána v Tabulce 9. Hodnoceny byly také sensorické atributy těstovin za pomoci dobrovolných respondentů.

Byly vytvořeny 3 vzorky – kontrolní vzorek (pouze semolinová mouka) a dva vzorky obohacené mlátem (každý vzorek obsahoval mláto z jiného pivovaru). Na 100 g těstovin bylo použito 65,4 g semolinové mouky, 23 g vody a 11,5 g mláta (Schettino et al. 2021).

Tabulka č. 9: Zastoupení makrosložek v těstovinách (Schettino et al. 2021)

Vzorek	Bílkoviny (%)	Lipidy (%)	Sacharidy (%)	Vláknina (%)
Kontrolní	14,11	2,18	79,44	2,91
BSG 1	15,16	3,49	67,47	11,88
BSG 2	14,96	3,36	65,69	11,96

Při senzorické analýze spotřebitelé označili těstoviny s BSG za více homogenní, příjemnější na skus, ale zároveň s drsnějším profilem oproti těstovinám bez BSG. Dále uvedli, že těstoviny s BSG mají obilnou/sladovou vůni a hořčejší chuť v porovnání s těstovinami bez BSG. Vysoký obsah bílkovin a vlákniny se projevil v obou fortifikovaných vzorcích těstovin ve srovnání s kontrolním vzorkem obsahující pouze semolinovou mouku. Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady o výživových a zdravotních tvrzeních na potravinářských výrobcích mohou být tyto obohacené těstoviny označeny jako „s vysokým obsahem vlákniny“ a „zdroj bílkovin“ (Schettino et al. 2021).

3.6.7.5 Rostlinný jogurt

Studie o zakomponování mláta do rostlinného jogurtu zkoumala účinek různého množství mláta jako náhradu za jogurtovou fermentaci. Proteolytické působení dalších mikroorganismů (v důsledku uvolňování aminokyselin) při výrobě jogurtu zkracuje proces fermentace zvýšením mikrobiálního růstu. Maximální kvalita jogurtu, včetně jeho kyselosti a rozvoje bakterií mléčného kvašení, se zlepšila se zvýšením přidaného mláta z 5 % na 10 %. Mláto má schopnost zadržovat vodu díky významnému obsahu nerozpustné vlákniny (zejména arabinoxylanů, které jsou schopné vázat vodu). Díky těmto vlastnostem je mláto schopné nahradit funkci škrobu. Rozemleté mláto přidané do jogurtu na rostlinné bázi udržovalo texturní a gelující tvorbu a zároveň zvyšovalo viskozitu účinnější (Naibaho et al. 2022)

3.6.7.6 Masné výrobky

Özvural et al. (2009) studovali účinky sušeného a mletého pivovarského mláta na obsah vlákniny a některé kvalitativní charakteristiky hovězích párků, konkrétně se jednalo o známé Frankfurters (frankfurtské párky) německého původu. Párky obsahovaly ve složení 22 % hovězího masa o 15 % tuku, 34 % hovězího masa o 28–30 % tuku a 10 % hovězího loje. Další přísady použité při přípravě párků byly – 20 g soli, 3 g směsi fosforečnanů, 0,5 g kyseliny askorbové, 0,125 g dusitanu sodného, 1 g tekutého kouře, 24 g škrobu, 6 g kaseinátu sodného a 5,1 g směsi koření.

V pokusu bylo připraveno 9 druhů párků, do každého bylo přidáno mláto o různé velikosti částic (jemné <212 µm, středně jemné 212–425 µm a hrubé 425–850 µm). Z párků byly odebrány 4 % vody a 2 % hovězího loje a nahrazeny mlátem v množství 1–5 %. Směs masa byla dále sekána v kutru při nízké rychlosti po dobu 20–30 sekund, v závěru se přidaly ještě konzervanty a koření. Párky byly dále plněny do střívek, tepelně zpracovány a uzeny v udírně (Özvural et al. 2009).

Tabulka č. 10: Bílkoviny, vláknina a vlhkost ve vzorcích mláta (Özvural et al. 2009)

Vzorek	Bílkoviny (%)	Vláknina (%)	Vlhkost (%)
Jemné (<212 µm)	31,19	62,4	7,6
Středně jemné (212–425 µm)	25,28	66,2	6,8
Hrubé (425–850 µm)	23,22	75,3	6,7

Tabulka č. 11: Obsah mláta včetně velikostí částic BSG, množství tuku v párcích (Özvural et al. 2009)

Vzorek	Obsah BSG (%), velikost částic (µm)	Hovězí lůj
1	0	10
2	1 (425–850)	8
3	3 (425–850)	6
4	5 (425–850)	4
5	1 (212–425)	8
6	3 (212–425)	6
7	5 (212–425)	4
8	1 (<212)	8
9	3 (<212)	6
10	5 (<212)	4

Celkový obsah vlákniny se ve vzorcích zvýšil úměrně k množství BSG ve skupinách s hrubou, střední a jemnou velikostí částic mláta. Schopnost zadržovat vodu byla v korelaci s celkovou vlákninou v experimentálních vzorcích. Celkový obsah vlákniny ve vzorcích s hrubě namletým mlátem o velikosti částic (425–850 µm) byl vyšší než u ostatních vzorků, vlhkost byla nejnižší. Studie odhalila, že mláto má velký potenciál jako zdroj vlákniny a může být použito jako náhrada tuku k výrobě masných výrobků, které mají vysoký obsah vlákniny a zároveň nízký obsah tuku (Özvural et al. 2009). Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 10 a 11.

3.7 Fermentace

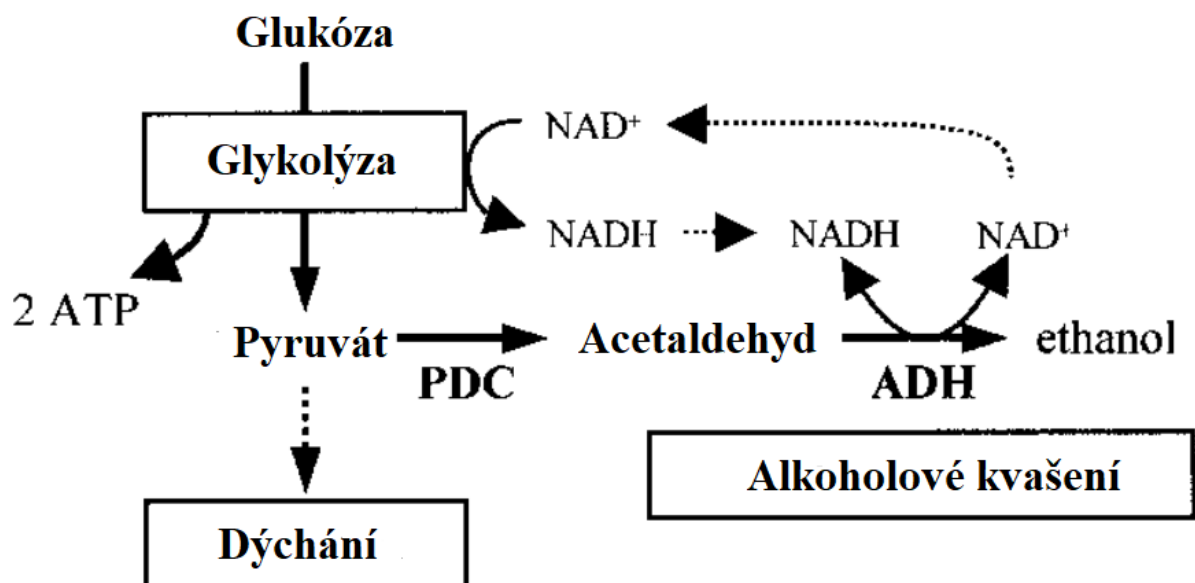
Fermentace neboli kvašení je biochemický proces, při kterém mikroorganismy (kvasinky nebo bakterie) rozkládají organickou látku za účelem získání energie. Při fermentaci dochází k přeměně sacharidů jednodušší substráty, např. ethanol a oxid uhličitý (Worku & Sahu 2017). Fermentace probíhá za anaerobních podmínek (bez přítomnosti kyslíku), avšak některé mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní mikroorganismy jsou také schopny provádět fermentaci aerobně (v přítomnosti kyslíku) (Ciani et al. 2013). Během tohoto procesu jsou také produkovány různé bioaktivní molekuly, které mohou mít zdravotní přínos pro spotřebitele (Yadav et al. 2012).

V potravinářském průmyslu se často využívá fermentace k výrobě alkoholických nápojů, kysaného zelí, jogurtů, sýru atd. Fermentace nachází uplatnění i v lékařství a kosmetickém průmyslu, kde se využívá k výrobě antibiotik, kyseliny mléčné a dalších látek. V oblasti ekologie se fermentace používá pro rozklad organického odpadu v odpadních vodách za vzniku bioplynu.

3.7.1 Alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení je biotechnologický proces prováděný kvasinkami, plísněmi nebo některými druhy bakterií za účelem přeměny cukrů na ethanol a oxid uhličitý. Kvasinky se používají jako biokultura a vodný roztok monosacharidů jako kultivační médium pro výrobu nápojů (Malakar et al. 2020). Kvasinky provádějí anaerobní fermentaci, ale mohou také fermentovat suroviny za aerobních podmínek (Ciani et al. 2013).

Kvašení začíná štěpením glukózy za vzniku pyruvátu v metabolickém pochodu zvaném glykolýza. Pyruvát se následně dekarboxyluje pomocí enzymu pyruvát-dekarboxyláza (PDC) na acetaldehyd a oxid uhličitý. Poté je vzniklý acetaldehyd redukován na ethanol za pomoci enzymu alkoholdehydrogenáza (ADH). Při glykolýze se akceptor elektronů NAD^+ redukuje za vzniku NADH, který je pak zpětně oxidován při redukcí acetaldehydu na ethanol. Celková energetická bilance alkoholové fermentace je získání 2 molekul adenosin trifosfátu (ATP) (Malakar et al. 2020) (Saika et al. 2006). Proces je znázorněn ve schématu na Obrázku 3.



Obrázek č. 3: Schéma alkoholového kvašení (Saika et al. 2006)

3.8 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní heterotrofní organismy patřící mezi houby (Kopecká et al. 2012). Dělí se do dvou fylogenetických skupin: askomycetové kvasinky a bazidiomycetové kvasinky (Hellborg & Piškur 2009). Od jiných eukaryot se kvasinky liší svou silnou a pevnou buněčnou stěnou. Vyskytují se především ve vodě, půdě, vzduchu a na povrchu rostlin a plodů. Důležitou roli mají v potravinářském průmyslu, využívají se při výrobě piva, vína, lihovin a v pekařském průmyslu. Nejvíce používané jsou především kvasinky z rodů *Saccharomyces*, *Kloeckera* a *Torulopsis* (Kopecká et al. 2012).

Kvasinky jsou pro člověka klíčovými mikroorganismy díky své schopnosti kvašení. Při kvašení piva se využívá tzv. spodních a svrchních kvasinek a jejich schopnosti přeměňovat jednoduché sacharidy (glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza), spolu s dalšími nezbytnými živinami (aminokyseliny, minerální látky, vitaminy) na ethanol a oxid uhličitý (Kopecká et al. 2012), (Walker & Stewart 2016).

Kvasinky při štěpení produkují četné sekundární metabolity, které působí jako důležité chuťové kongenery. Ty jsou velmi důležité při určování konečných chuťových a aromatických charakteristik nápojů. Z tohoto důvodu jsou kvasinky nezbytně důležité při poskytování obsahu alkoholu a sensorických profilů zmíněných nápojů (Walker & Stewart 2016).

Růst a kvašení kvasinek je ovlivněno řadou faktorů jako je rychlost očkování, osmotický tlak a aktivita vody. Pivovarské kvasinky jsou vybírány pro svůj vliv na chuť piva a pro jejich schopnost flokulovat a sedimentovat na konci fermentace (Stewart 2014).

3.8.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Druh kvasinek, který celosvětově dominuje ve výrobě alkoholických nápojů, je *Saccharomyces cerevisiae*. Řadí se mezi svrchní pivovarské kvasinky, které se shromažďují na povrchu kvasící mladiny (Chettri et al. 2022).

Kromě známého využití v pivovarském průmyslu je dalším zajímavým využitím aplikace kvasinek při vzniku destilovaných nápojů (Walker & Stewart 2016). Destiláty jsou vyráběny z různých surovin, například kukuřice, pšenice, žita, ječmene, rýže (Stewart 2014) nebo také ovoce či zeleniny. Výchozí cukernaté složky pro výrobu piv a whisky pocházejí z obilných škrobů. Při výrobě rumu se získává sacharóza z cukrové třtiny a v případě vína a brandy z ovoce (Walker & Stewart 2016).

Saccharomyces cerevisiae se hojně vyskytuje v potravinách, ale zřídka je označována jako původce kažení, ke kterému většinou dochází u potravin a nápojů s vysokým obsahem cukru. Jelikož *S. cerevisiae* toleruje koncentraci ethanolu až 15 %, může případně zkazit i alkoholické nápoje (Stewart 2014).

3.8.2 *Saccharomyces pastorianus*

Saccharomyces pastorianus je hybridní kvasinka, která vznikla spojením příbuzných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces eubayanus* (Dunn & Sherlock 2008). Řadí se mezi spodní pivovarské kvasinky, které sedimentují na dně nádoby (Chettri et al. 2022). Jsou odolné vůči nízkým teplotám, dobře flokulují, fermentují glukózu, fruktózu, ale i oligosacharidy jako jsou maltóza a maltotrióza v pivních mladinách (Troianou et al. 2019).

Tato kvasinka byla studována např. při fermentaci hroznové šťávy odrůdy Sauvignon Blanc. Kvašení probíhalo více dní ve srovnání se *S. cerevisiae*. Navzdory několik dnů delší fermentaci, byla hladina produkovaného alkoholu stejná jako u *S. cerevisiae*. Produkce kyseliny octové byla téměř nulová, čímž lze zaručit výrobu kvalitního vína. Další vítanou vlastností byla schopnost degradace kyseliny jablečné. V neposlední řadě bylo zjištěno, že *S. pastorianus* produkuje ve víně vyšší množství aromat připomínající růže (Troianou et al. 2019).

3.8.3 *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*

Saccharomyces cerevisiae var. *diastaticus* je kvasinka obecně známá jako kontaminant v pivu a lahvových nápojích, a to dokonce i měsíce poté, co produkt opustil varnu (Meier-Dörnberg et al. 2018). V prokvašeném pivě dochází díky pomnožení kvasinky k tzv. „superprokvašení“. Kvasinky mohou způsobit tvorbu sedimentu na dně nádoby nebo zákal na povrchu nápoje. Zároveň se kazí chuť, pivo získává tzv. fenolickou příchuť. To je způsobeno zvýšenou produkcí vyšších alkoholů a esterů oproti pivovarským kvasinkám (Janderová 1983). Také dochází ke zvýšení obsahu oxidu uhličitého, což může způsobit gushing, dokonce až poničení lahví. *S. diastaticus* se do produktu může dostat

prostřednictvím pivního potrubí, cirkulací vzduchu v oblasti plnicího stroje a uzávěru nebo pomocí nedostatečného bleskového tepelné zpracování (Meier-Dörnberg et al. 2018)

S. diastaticus je blíže příbuzný rodu *Saccharomyces cerevisiae*. V případě asimilace základních zdrojů dusíku a uhlíku z něj může být odvozen přidáním amylolytické aktivity (Janderová 1983). Díky své enzymové aktivitě (enzym amyloglukozidáza) jsou tyto kvasinky schopné štěpit α -1,4-glykozidické vazby na koncích řetězců cukerných dextrinů a získávat tak glukózu pro vlastní metabolismus. Tato schopnost štěpit dextriny je využívána při výrobě nízkokalorických piv nebo produkci ethanolu (Štulíková et al. 2019).

3.8.4 *Torulaspora delbrückii*

Torulaspora delbrückii je fermentační kvasinka spojována hlavně s výrobou vína. V posledních letech je věnována zvláštní pozornost využívání *T. delbrückii* v souvislosti zlepšení výsledného organoleptického profilu a kvality vín. Ukázalo se, že *T. delbrückii* má pozitivní účinky ve vlastnostech vín vzhledem ke spotřebě kyselin a cukrů. Dále zvyšuje komplexnost vůně kvůli produkci důležitých metabolitů (Fernandes et al. 2021). *T. delbrückii* také prokázala pozitivní dopad z hlediska nízké produkce nežádoucích sloučenin, jako je acetaldehyd, acetoin a kyselina octová (Canonico et al. 2016)

Kromě vína lze *T. delbrückii* využít i v jiných nápojích, především v oblíbeném pivě. Složky sladiny přeměňuje nejen na alkohol, ale také na organoleptické sloučeniny, jako jsou aldehydy, vyšší alkoholy, estery, karbonylové sloučeniny, organické kyseliny a terpenické látky, které dávají pivu konečnou sensorickou hodnotu (Fernandes et al. 2021).

Oproti *S. cerevisiae* vykazuje *T. delbrückii* nižší růst za přísných anaerobních podmínek, má také nižší intenzitu fermentace a pomalejší rychlost růstu oproti *S. cerevisiae* (Ramírez & Velázquez 2018).

3.8.5 *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae je vláknitá aerobní plíseň, která je bohatým zdrojem mnoha bioaktivních sekundárních metabolitů z různých chemických tříd, jako jsou terpenoidy, kumariny, oxylipiny a mastné kyseliny (Daba et al. 2021). *A. oryzae* je důležitým zdrojem organických sloučenin, jako je kyselina glutamová a mnoho průmyslových enzymů, jako je glukoamyláza, α -amylázy, celulóza a proteázy, které se po celém světě používají pro zpracování škrobu, pečení, výrobu detergentů a vaření piva (Chang et al. 2014).

A. oryzae se po staletí používá při fermentaci různých potravin v mnoha zemích po celém světě (Daba et al. 2021). V Evropě se aplikuje při výrobě enzymů pro pivovarnictví a pečení (Daba et al. 2021). Nejvíce je však používána v japonské kuchyni, kde byla dokonce označena jako národní mikroorganismus Japonska (Kitamoto 2015). *A. oryzae* se využívá při výrobě octu, sójové pasty miso, sójové omáčky zejména při výrobě saké (Zhu & Tramper 2013). Saké je tradiční japonský alkoholický nápoj, který se vyrábí z dušené rýže (Fujita et al. 2003). *A. oryzae* přeměňuje rýžový škrob na cukry a poté spolu s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* přeměňuje cukry na ethanol (Akaike et al. 2020).

4 Metodika

V kapitole metodiky jsou rozepsány všechny kroky vedoucí k popsání jednotlivých metod pro stanovení celkového obsahu polyfenolů, ethanolu, methanolu a dalších těkavých látek ve vzorcích mláta.

4.1 Suroviny pro přípravu

- Mláto
- Vodovodní voda

Mláto bylo získáno ze zkušební várky v pivovaru Um! v prostorách Výukového centra zpracování zemědělských produktů (VCZZP). Sypání várky bylo 11 kg sladu na 50 l vody. Koncentrace předku byla 10,2 % a koncentrace posledního výstřelku 6 %.

Před vlastním experimentem bylo mláto uchováváno v mrazáku při teplotě -18 °C.

4.2 Použité mikroorganismy

- *Torulaspora delbrueckii* (TD)
- *Saccharomyces cerevisiae* (SC)
- *Aspergillus oryzae* (AO)

Kvasinky *Torulaspora delbrueckii*, kmen RIBM B1

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kmen RIBM SD (*Saccharomyces diastaticus*)

Tyto organismy byly získány ze Sbírký pivovarských mikroorganismů (RIBM) Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., oddělení mikrobiologie. Obě kultury byly rozkvašené v mladině.

Spory plísně *Aspergillus oryzae*

- Ve variantě s bílými sporami (silné sladovací vlastnosti, široké spektrum použití, mj. pro saké)
- Ve variantě se zelenými sporami (menší produkce cukru, vhodné pro přípravu např. sójové omáčky)

Obě varianty byly získány na e-shopu fermentarum.cz.

4.3 Přístroje

- **Refraktometr Carl Zeiss-Jena, typ G08**

- **Rmutovací lázeň**

Výrobce: 1 – CUBE

- **Topné hnízdo LTHS 250**

- **Spectronic TM Helios TM Gamma Helios**

Výrobce: Thermo Fisher Scientific, Materials & Structural Analysis (MSA)

- **Plynový chromatograf Nexis GC-2030 s autosamplrem AOC-20i Plus**

Výrobce: SHIMADZU

- **Horkovzdušná sušárna Binder**

4.4 Stanovení extraktu mláta

4.4.1 Princip metody

Obsah extraktivních látek v mlátě byl stanoven metodou pro stanovení vyloužitelného extraktu. Hodnoty vyloužitelného extraktu jsou měřítkem k posouzení způsobu vyslazování. Mohou být ovlivněny funkcí scezovacího zařízení, prací vařiče a porozitou vrstvy mláta. Běžné hodnoty vyloužitelného extraktu v mlátě se pohybují v rozmezí 0,7–0,9 % (Basařová et al. 1993).

4.4.2 Pracovní postup

Stanovení vyloužitelného extraktu vyloužením teplou vodou:

100 g mokrého mláta bylo smícháno ve rmutovací kádince se 175 ml destilované vody o teplotě 70 °C. Mláto smíchané s vodou se rmutovalo se 60 minut při teplotě 70 °C. Po ochlazení se obsah doplnil na 300 g, zfiltroval z relativní hustoty byl určen extrakt.

4.4.3 Výpočet

Výpočet vyloužitelného extraktu:

$$E_{VM} = \frac{P(200 + V_C)}{(100 - P)}$$

$$E_{VS} = \frac{100 \cdot E_{VM}}{100 - V_C}$$

E_{VM} – hmotnostní zlomek vyloužitelného extraktu v mokřém mlátě (%)

E_{VS} – hmotnostní zlomek vyloužitelného extraktu v sušině mláta (%)

P – hmotnostní zlomek extraktu ve filtrátu (%)

V_C – celkový obsah vody v mlátě

4.5 Stanovení sušiny mláta

Přibližně 25 g mokřého mláta bylo naváženo s přesností na 0,001 g na Petriho misku a umístěno do sušárny po dobu 4 hodin při teplotě 105 °C. Z úbytku hmotnosti byl vypočten obsah vody, resp. sušina mláta.

4.6 Příprava vzorku

Spory plísně se nechaly naklíčit následujícím způsobem: ke 100 g mláta se přidalo 50 ml vody a 0,1 g spor plísně *Aspergillus oryzae*. Tato směs byla v kádince přikryta buničinou, aby nedocházelo k jejímu vysychání a následně se nechala 2 dny při laboratorní teplotě, během této doby došlo k vývinu mycelia. Zaočkování mláta plísní *Aspergillus oryzae* bylo provedeno pomocí 25 g této směsi.

K 300 g mláta bylo přidáno 50 ml mladiny obsahující kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Torulaspora delbrueckii*, případně naklíčená směs *Aspergillus oryzae* (rozpis vzorků je uveden v Tabulce 12) a směs byla doplněna vodou na celkový objem 1 l. Následně se tato směs nechala fermentovat po dobu 7 dní při laboratorní teplotě (viz Obrázek 4 a 5).

Po ukončení fermentace byla směs přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. 125 ml získaného filtrátu bylo umístěno do 250 ml varné baňky a směs byla predestilována. Destilace byla ukončena v okamžiku, kdy teplota par dosáhla hodnoty 102 °C. V destilátu byl refraktometricky stanoven obsah ethanolu.

Tabulka č. 12: Rozpis rozdílů mezi jednotlivými vzorky:

Vzorek	Zaočkování kvasinkami	Zaočkování plísní
1	50 ml TD	ne
2	50 ml SC	ne
3	25 ml TD + 25 ml SC	ne
A	50 ml SC	Bílá AO
B	50 ml SC	Zelená AO
C	50 ml TD	Bílá AO
D	50 ml TD	Zelená AO

Tabulka č. 13: Obsah alkoholu dle indexu lomu ve vzorcích

Vzorek	Index lomu	Odpovídající obsah alkoholu (% obj.)
1	1,3333	0,63
2	1,3335	1,03
3	1,3335	1,03
A	1,3337	1,42
B	1,3337	1,42
C	1,3337	1,42
D	1,3331	0,24



Obrázek č. 4: Vzorky 1, 2, 3



Obrázek č. 5: Vzorky A, B, C, D

4.7 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

4.7.1 Postup

2 ml destilátu byly naředěny destilovanou vodou na přibližně 30 ml. K takto upravenému vzorku bylo přidáno 2,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a směs byla promíchána. Poté bylo ke vzorku přidáno 7,5 ml 20 % Na_2CO_3 a směs byla opět promíchána. Po následném doplnění destilovanou vodou na objem 50 ml a promíchání, byly vzorky ponechány po dobu 2 hod při laboratorní teplotě pro správný průběh reakce. Následně byla u vzorků změřena absorbance při 765 nm oproti slepému vzorku připravenému stejným způsobem z destilované vody. Výsledky jsou vyjádřené jako mg kyseliny gallové ve vzorku.

4.8 Stanovení ethanolu a dalších těkavých látek

Pro stanovení obsahu ethanolu a dalších těkavých látek byly destiláty analyzovány na plynovém chromatografu s plamenoionizačním detektorem na katedře chemie FAPPZ.

Podmínky stanovení byly následující:

- Kolona: SUPELCOWAX 10 (30 x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Teplotní program kolony: 60 °C (2 min), 8 °C/min, 220 °C (8 min)
- Teplota nástřiku 250 °C, teplota detektoru 280 °C
- Objem nástřiku 0,5 μm , split 50:1
- Nosný plyn dusík, lineární rychlost 30 cm/min (vstupní tlak 92 kPa)
- Detektor: vzduch 200 ml/min, vodík 32 ml/min, make-up (dusík) 24 ml/min
- Čistoty použitých plynů: dusík 4.8, vodík 6.0, vzduch stlačený

5 Výsledky

5.1 Extrakt mláta

Obsah extraktu ve filtrátu byl 1,5 %, což při stanovené sušině mláta 25,21 % odpovídá obsahu extraktu 4,18 % v původním vzorku a 16,60 % extraktu v sušině mláta.

5.2 Celkový obsah polyfenolů

Tabulka č. 14: Obsah polyfenolů ve vzorcích

Vzorek	Celkové polyfenoly (mg kys. gallové/l vzorku)
1	25,047
2	15,422
3	13,262
A	10,676
B	11,55
C	11,176
D	12,18

Nejvyšší obsah polyfenolů se vyskytoval u vzorku č. 1, který byl zaočkovaný kvasinkou TD. Nejmenší množství vykazoval vzorek A, který byl zaočkován kvasinkou SC v kombinaci s plísní AO s bílými sporami. Rozdíly mezi vzorky byly nepatrné, lze ale říci, že ve vzorcích bez přítomnosti plísně byly zjištěny vyšší koncentrace než ve vzorcích fermentovaných kombinací kvasinek a plísně.

5.3 Stanovení ethanolu a dalších těkavých látek

Tabulka č. 15: Obsah alkoholů u vzorků 1, 2, 3

retenční čas		1	2	3
3,163	methanol (% obj.)	0,005	0,015	0,006
	isopropylalkohol			
3,299	(% obj.)	0,052	0,029	0,091
3,386	Ethanol (% obj.)	0,228	0,813	0,662
4,353	1-propanol (% obj.)	0,011	0,001	<0,001
4,566	2-butanol (% obj.)	0,002	0,004	0,004
5,396	isobutanol (% obj.)	nd	0,001	<0,001
6,226	1-butanol (% obj.)	0,256	0,317	0,489
	isoamylalkohol			
7,279	(% obj.)	0,001	0,002	0,002
13,144	neidentifikováno	(32221)	(16545)	(10934)
13,693	neidentifikováno	(12786)	(5692)	(4808)
14,979	neidentifikováno	(230759)	(422625)	(285029)

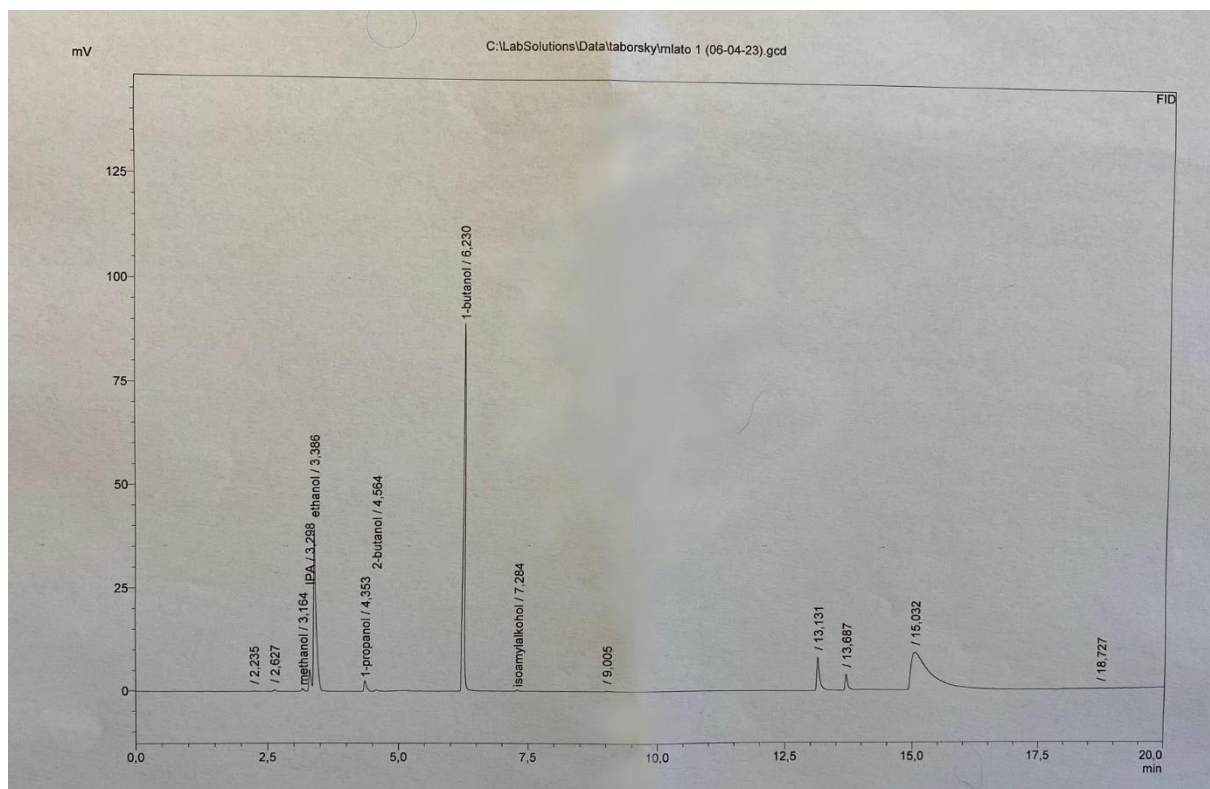
Tabulka č. 16: Obsah alkoholů u vzorků A, B, C, D

retenční čas		A	B	C	D
3,163	methanol (% obj.)	nd	nd	nd	nd
	isopropylalkohol	nd	nd	nd	nd
3,299	(% obj.)				
3,386	ethanol (% obj.)	1,024	0,87	0,772	0,088
	1-propanol				
4,353	(% obj.)	nd	nd	nd	nd
4,566	2-butanol (% obj.)	nd	<0,001	nd	nd
	isobutanol				
5,396	(% obj.)	<0,001	<0,001	nd	nd
6,226	1-butanol (% obj.)	nd	nd	nd	nd
	isoamylalkohol				
7,279	(% obj.)	0,001	0,001	0,001	nd
13,144	neidentifikováno	(5544)	(6493)	(5995)	(9681)
13,693	neidentifikováno	(2561)	(4013)	(3420)	(4476)
14,979	neidentifikováno	nd	nd	nd	nd

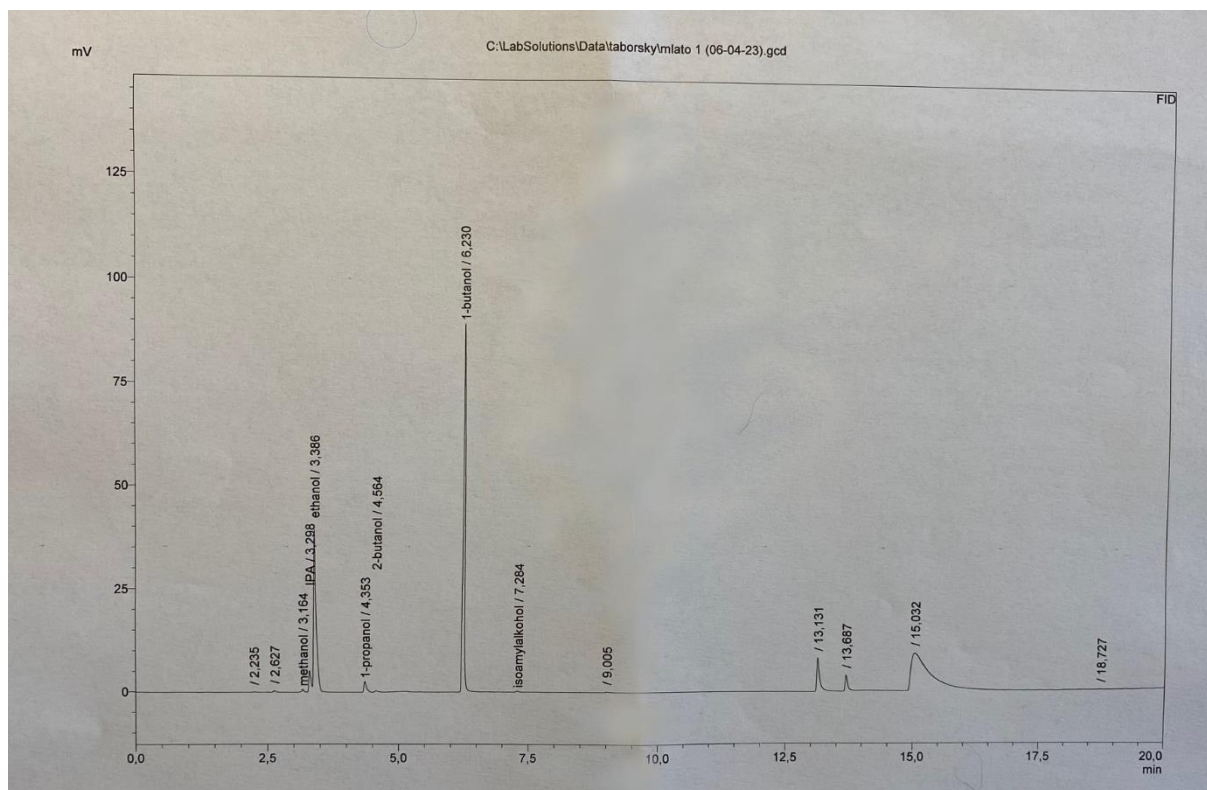
- v závorce uvedena plocha píku (u neidentifikovaných sloučenin)
- nd – výsledky, kdy plocha píku byla menší než 200
- píky 13,144 a 13,693 - pravděpodobně estery
- pík 14,979 – vzhledem ke tvaru píku lze usuzovat na mastnou kyselinu (pravděpodobně butanová) – i kvůli přítomnosti butanolu

Výsledky analýzy vzorků pomocí GC-FID jsou uvedeny v Tabulce 15 a 16. Zjištěný obsah ethanolu je velmi nízký. Nejvyšší obsah ethanolu byl stanoven ve vzorku A, nicméně hodnota 1,024 % obj. je velmi nízká pro praktické využití. Naměřené hodnoty přibližně odpovídají hodnotám zjištěným pomocí stanovení indexu lomu (Tabulka 13), nicméně refraktometrická metoda je pouze orientační a slouží pouze k potvrzení zjištěných nízkých koncentrací.

Zajímavé výsledky byly zjištěny při analýze vzorků nezaočkovaných plísni *Aspergillus oryzae*. V těchto vzorcích se obsah 1-butanolu pohyboval v rozmezí 0,256 až 0,489 % obj., což naznačuje, že v těchto vzorcích proběhla také butanolová fermentace. Navíc v čase kolem 15. minuty byl detekován velký asymetrický pík, z jehož tvaru lze usuzovat, že se jedná o organickou kyselinu, pravděpodobně propionovou nebo máselnou. Oproti tomu ve vzorcích zaočkovaných plísní AO (lhostejno, zda s bílými či zelenými spórami) nebyl 1-butanol ani zmíněný asymetrický pík detekovány. Další neidentifikované píky byly ve vzorcích zaočkovaných AO nižší (viz Tabulka 15 a 16 a Obrázek 6 a 7).



Obrázek č. 6: Chromatogram vzorku 1 (zaočkovaný pouze kvasinkou TD)



Obrázek č. 7: Chromatogram vzorku B (začokovaný kvasinkou SC a AO se zelenými spórami)

6 Diskuze

6.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Naměřené obsahy celkových polyfenolů v destilátu jsou velmi nízké (10,7–25,0 mg kys. gallové/l), např. u vinných destilátů se celkový obsah polyfenolů pohyboval v hodnotách 40 až 350 mg kys. gallové/l (Schwarz et al. 2020). Ovšem i přes řadu publikací o obsahu jednotlivých polyfenolových sloučenin v mlátu je celkový obsah polyfenolů spíše nižší, dle Tišma et al. (2018) jsou na úrovni 2,5 mg/g v sušině, zatímco např. v semínkách hroznů je to až 129,6 mg/g v sušině. Nižší hodnoty mohou být způsobeny i složením polyfenolů, neboť jejich těkavost klesá s molekulovou hmotností (Shahidi & Naczki 2003) a lze předpokládat, že část těkavých polyfenolů se odpařila během rmutování.

6.2 Stanovení ethanolu a dalších těkavých látek

Obsah ethanolu ve všech vzorcích byl velmi nízký a pohyboval se v rozmezí 0,09 až 1,02 % obj. Celkové množství extraktu dodané k fermentaci bylo 12,54 g, z fermentace bylo získáno přibližně 0,5 l zfiltrovaného prokvašeného média. Při 100 % účinnosti přeměny extraktu na ethanol (ze 100 g cukrů vznikne 51,11 g ethanolu) by během fermentace vzniklo 6,41 g ethanolu, což odpovídá 1,6 % obj. ethanolu ve prokvašeném vzorku. Při destilaci došlo ke zmenšení objemu o 1/3, tudíž koncentrace ethanolu v destilátu při teoretické 100 % účinnosti by se pohybovala na úrovni 2,4 % obj. Při výrobě lihu je praktická účinnost fermentace kolem 90 % (El-Diwanly et al. 1992). Nicméně výtěžek pro vzorky zaočkované plísní AO se pohybuje v rozmezí 32–42 % s výjimkou vzorku D s koncentrací ethanolu menší než 0,1 % obj. U vzorků nezaočkovaných plísní byla výtěžnost 9–34 %.

Důvodem nízké výtěžnosti může být obtížná dostupnost zkvasitelných sacharidů pro kvasinky. Ačkoliv *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* má širší enzymový aparát než běžná kvasinka a je schopna odštěpovat glukózu z polysacharidů vázaných α -1,4-glykozidickou vazbou, pravděpodobně dostupnost konců řetězců není ideální, lze předpokládat, že po rmutování v mlátě zůstávají pouze hůře rozluštěná škrobová zrna, což může efektivitu enzymového aparátu ovlivnit. Přítomnost *Aspergillus oryzae* výtěžnost ethanolu mírně navýšila, nicméně získané hodnoty byly stále nízké.

Plíseň *Aspergillus oryzae* je schopna tvořit enzym celulózu, jako optimální podmínky pro její produkci bylo určeno pH 5,9 a teplota 33 °C (Hoa & Hung 2013), což jsou hodnoty blízké proběhlému experimentu, jelikož pH sladiny po rmutování se pohybuje v rozmezí 5,4–6,0 (Briggs et al. 2004). Nicméně efekt produkce celulózy nebyl pozorován. To může být způsobeno přítomností ligninu, který může bránit v přístupu enzymu a bez předchozí hydrolýzy provedené jiným způsobem by rozklad celulózy trval neúměrně dlouho (Liu et al. 2019).

Nízké hodnoty využití extraktu naznačují, že nebylo dosaženo optimálních podmínek kvašení. Obsah ethanolu ve vzorku D byl extrémně nízký, nicméně GC analýza neodhalila ani

žádné jiné produkty fermentace, tudíž lze předpokládat, že v tomto případě fermentace neproběhla, nebo se její začátek byl z neznámých příčin výrazně opožděn.

Jiná situace nastala ve vzorcích, které nebyly zaočkované plísní AO. Dle GC analýzy vzorky obsahovaly i větší množství vedlejších produktů naznačujících, že ve vzorcích proběhla butanolvá fermentace. Za produkci butanolu jsou zodpovědné zejména bakterie rodu *Clostridium*, které jsou schopny extracelulárně rozkládat lignocelulózový materiál až na glukózu a v rámci aceton-butanol-ethanolové fermentace produkují jmenované látky v poměru 3 : 6 : 1. Při výrobě biopaliv bakterie r. *Clostridium* zpracovávají mj. i lignocelulózové materiály (Ezeji et al. 2007; Alam & Tanveer 2020), tudíž nelze vyloučit, že tento proces proběhl i při fermentaci mláta.

Velmi zajímavá je skutečnost, že butanolvá fermentace neproběhla při zaočkování vzorku mláta pomocí *Aspergillus oryzae*. Nepodařilo se dohledat, že by *Aspergillus oryzae* potlačoval růst r. *Clostridium*, naopak dle Ozturk et al. (2020) lze využít jejich kombinované působení pro efektivnější produkci biobutanolu, ačkoliv kultivace jednotlivými mikroorganismy byly v rámci daného experimentu oddělené. Dalším možným důvodem potlačení butanolového kvašení může být přítomnost kvasinek, které mohly spotřebovat zkvasitelné sacharidy uvolněné pomocí AO pro vlastní metabolismus, nicméně tuto teorii nepodporuje výsledek vzorku D.

Z hlediska praktické využitelnosti provedeného experimentu nezbyvá než konstatovat, že díky nízké efektivitě procesu a výtěžnosti ethanolu nelze očekávat rozšíření praktického použití, neboť existuje celá řada jiných možností produkce ethanolu i využití mláta. Vzhledem k velkému objemu mláta a nízkému obsahu extraktu však pravděpodobně nelze využít veškeré látky, které jsou v mlátě obsažené, bez předchozí chemické hydrolyzy.

7 Závěr

V rámci diplomové práce byl proveden experiment testující možnost využití vedlejšího pivovarského produktu – mláta k fermentaci a možné produkci alkoholového nápoje. Výsledky experimentu sice ukázaly, že je možné tímto způsobem produkovat ethanol, ale výtěžky celého procesu byly velmi nízké bez ohledu na použité mikroorganismy, maximální dosažená výtěžnost ethanolu byla 42 %, navíc v určitých případech došlo i k průběhu dalších mikrobiálních dějů nežádoucích z hlediska sensorické kvality.

Hypotéza o možnosti produkce nápoje obsahujícího ethanol nebyla potvrzena, pro možné použití v praxi je pravděpodobně nutné zařadit další krok pro předúpravu mláta.

8 Literatura

AKAIKE, Misaki, Hiroto MIYAGAWA, Yukiko KIMURA, Momoka TERASAKI, Yuki KUSABA, Hiroshi KITAGAKI a Hiromi NISHIDA. Chemical and Bacterial Components in Sake and Sake Production Process. *Current Microbiology* [online]. 2020, **77**(4), 632-637 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-019-01718-4

ALAM, Md. Saiful a Md. Sifat TANVEER. Conversion of biomass into biofuel: a cutting-edge technology. In: *Bioreactors* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 55-74 [cit. 2023-04-14]. ISBN 9780128212646. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821264-6.00005-X

ALIYU, Salihu a Muntari BALA. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*. **2011**. ISSN 1684-5315. Dostupné z: doi:10.5897/AJBx10.006

BASAŘOVÁ G., 2015: Sladařství: teorie a praxe výroby sladu. Praha: Havlíček Brain Team, 626 s. ISBN 978-80-87109-47-2.

BASAŘOVÁ, G., A. DOLEŽALOVÁ, M. KAHLER a J. ČEPIČKA. *Pivovarsko-sladařská analytika*. Merkanta s.r.o. Praha, 1993.

BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ, Pavlína BASAŘOVÁ a Adam BROŽ. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vydání druhé, přepracované, doplněné a aktualizované. Praha: Havlíček Brain Team, 2021. ISBN 978-80-87109-71-7.

BASTOS, Rita, Patrícia G. OLIVEIRA, Vítor M. GASPAR, João F. MANO, Manuel A. COIMBRA a Elisabete COELHO. Brewer's yeast polysaccharides — A review of their exquisite structural features and biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **277** [cit. 2022-11-09]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118826

BAIANO, Antonietta, Barbara LA GATTA, Mariacinzia RUTIGLIANO a Anna FIORE. Functional Bread Produced in a Circular Economy Perspective: The Use of Brewers' Spent Grain. *Foods* [online]. 2023, **12**(4) [cit. 2023-04-07]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods12040834

BIANCO, Angela, Marilena BUDRONI, Severino ZARA, Ilaria MANNAZZU, Francesco FANCELLO a Giacomo ZARA. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2020, **104**(20), 8661-8678 [cit. 2022-11-21]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10843-1

BRIGGS, D.E., C.A. BOULTON, P.A. BROOKES a R. STEVENS. *Brewing Science and Practice*. [online]. In: . Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge, 2004 [cit. 2023-04-14].

- CANONICO, Laura, Alice AGARBATI, Francesca COMITINI a Maurizio CIANI. *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology* [online]. 2016, **56**, 45-51 [cit. 2023-03-08]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2015.12.005
- CIANI, M., F. COMITINI a I. MANNAZZU. Fermentation. In: *Encyclopedia of Ecology* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 310-321 [cit. 2022-12-27]. ISBN 9780444641304. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.00693-X
- COORAY, Sachindra T., Jaslyn J. L. LEE a Wei Ning CHEN. Evaluation of brewers' spent grain as a novel media for yeast growth. *AMB Express* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2023-03-21]. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-017-0414-1
- DABA, Ghoson M., Faten A. MOSTAFA a Waill A. ELKHATEEB. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. *Bioresources and Bioprocessing* [online]. 2021, **8**(1) [cit. 2023-03-08]. ISSN 2197-4365. Dostupné z: doi:10.1186/s40643-021-00408-z
- DUNN, Barbara a Gavin SHERLOCK. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research* [online]. 2008, **18**(10), 1610-1623 [cit. 2023-04-02]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.076075.108
- EL-DIWANY, A.I., M.S. EL-ABYAD, A.H. EL-REFAI, L.A. SALLAM a Reda F. ALLAM. Effect of some fermentation parameters on ethanol production from beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y-7. *Bioresource Technology* [online]. 1992, **42**(3), 191-195 [cit. 2023-04-14]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/0960-8524(92)90022-P
- EMMANUEL, Jovine K., Philimon D. NGANYIRA a Godlisten N. SHAO. Evaluating the potential applications of brewers' spent grain in biogas generation, food and biotechnology industry: A review. *Heliyon* [online]. 2022, **8**(10) [cit. 2023-03-17]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11140
- EZEJI, Thaddeus Chukwuemeka, Nasib QURESHI a Hans Peter BLASCHEK. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2007, **18**(3), 220-227 [cit. 2023-04-14]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2007.04.002
- FARCAS, Anca Corina, Sonia Ancuța SOCACI, Maria Simona CHIȘ, Oana Lelia POP, Melinda FOGARASI, Adriana PĂUCEAN, Marta IGUAL a Delia MICHIU. Reintegration of Brewers Spent Grains in the Food Chain: Nutritional, Functional and Sensorial Aspects. *Plants* [online]. 2021, **10**(11) [cit. 2022-11-21]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants10112504

FERNANDES, Ticiana, Flávia SILVA-SOUSA, Fábio PEREIRA, Teresa RITO, Pedro SOARES, Ricardo FRANCO-DUARTE a Maria João SOUSA. Biotechnological Importance of *Torulasporea delbrueckii*: From the Obscurity to the Spotlight. *Journal of Fungi* [online]. 2021, **7**(9) [cit. 2023-03-07]. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof7090712

FUJITA, Jin, Yu-Ichi YAMANE, Hisashi FUKUDA, Yasuzo KIZAKI, Saburo WAKABAYASHI, Seiko SHIGETA, Osamu SUZUKI a Kazuhisa ONO. Production and properties of phytase and acid phosphatase from a sake koji mold, *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2003, **95**(4), 348-353 [cit. 2023-04-03]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(03)80066-X

GARRETT, Reann, Danielle BELLMER, William MCGLYNN, Patricia RAYAS-DUARTE a Antimo DI MARO. Development of New Chip Products from Brewer's Spent Grain. *Journal of Food Quality* [online]. 2021, **2021**, 1-6 [cit. 2023-04-08]. ISSN 1745-4557. Dostupné z: doi:10.1155/2021/5521746

HELLBORG, Linda a Jure PIŠKUR. Yeast Diversity in the Brewing Industry. In: *Beer in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 77-88 [cit. 2023-03-09]. ISBN 9780123738912. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-373891-2.00007-9

CHANG, P.-K., B.W. HORN, K. ABE a K. GOMI. ASPERGILLUS | Introduction. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 77-82 [cit. 2023-03-08]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00010-0

CHESTRARIU, Ancuța a Adriana DABIJA. Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review. *Applied Sciences* [online]. 2020, **10**(16) [cit. 2023-03-17]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10165619

CHESTRARI, Upashna, et al. Production of Malt-Based Beverages. In: *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Singapore: Springer Singapore, 2022. p. 279-306.

CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.

JOHNSON, Praveen; PALIWAL, Jitendra; CENKOWSKI, Stefan. Issues with utilisation of brewers' spent grain. *Stewart Postharvest Review*, 2010, **6.4**: 1-8.

IKRAM, Sana, LianYan HUANG, Huijuan ZHANG, Jing WANG a Meng YIN. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science* [online]. 2017, **82**(10), 2232-2242 [cit. 2023-03-17]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.13794

IVANOVA, Kristina, Rositsa DENKOVA, Georgi KOSTOV, Todorka PETROVA, Ivan BAKALOV, Milena RUSCOVA a Nikolay PENOV. Extrusion of brewers' spent grains and application in the production of functional food. Characteristics of spent grains and optimization of extrusion. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2017, **123**(4), 544-552 [cit. 2023-03-16]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.448

JACKOWSKI, Mateusz, Łukasz NIEDŹWIECKI, Kacper JAGIEŁŁO, Oliwia UCHAŃSKA a Anna TRUSEK. Brewer's Spent Grains—Valuable Beer Industry By-Product. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(12) [cit. 2023-03-17]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10121669

JANDEROVÁ, B. *Saccharomyces diastaticus* as a donor of genes for dextrin fermentation. *Kvasny Prumysl* [online]. 1983, **29**(5), 106-109 [cit. 2023-04-03]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1983020

JEDLIČKA, Martin. *Možnosti skladování pivovarského mláta* [online]. 31.01.2017 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: <https://naschov.cz/moznosti-skladovani-pivovarskeho-mlata/>

KAMEL, S., N. ALI, K. JAHANGIR, S. M. SHAH a A. A. EL-GENDY. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polymer Letters* [online]. 2008, **2**(11), 758-778 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2008.90

KITAMOTO, Katsuhiko. Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2015, **79**(6), 863-869 [cit. 2023-03-08]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2015.1023249

KOPECKÁ, Jana, Dagmar MATOULKOVÁ a Miroslav NĚMEC. Yeast and its uses. *Kvasny Prumysl* [online]. 2012, **58**(11-12), 326-335 [cit. 2023-03-05]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2012029

LEBO, S. E., GARGULAK, J. D., & MCNALLY, T. J. (2002). *Lignin*. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. doi:10.1002/0471440264.pst179

LIU, Chen-Guang, Yi XIAO, Xiao-Xia XIA, Xin-Qing ZHAO, Liangcai PENG, Penjit SRINOPHAKUN a Feng-Wu BAI. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnology Advances* [online]. 2019, **37**(3), 491-504 [cit. 2023-04-14]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2019.03.002

LYNCH, Kieran M., Eric J. STEFFEN a Elke K. ARENDT. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2016, **122**(4), 553-568 [cit. 2022-11-09]. ISSN 0046-9750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.363

MALAKAR, Santanu, Sanjib Kr PAUL a K.R. JOLVIS POU. Biotechnological Interventions in Beverage Production. In: *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 1-37 [cit. 2022-12-27]. ISBN 9780128166789. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816678-9.00001-1

MARCUS, Andrew a Glen FOX. Fungal Biovalorization of a Brewing Industry Byproduct, Brewer's Spent Grain: A Review. *Foods* [online]. 2021, **10**(9) [cit. 2023-04-14]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10092159

MEIER-DÖRNBERG, Tim, Oliver Ingo KORY, Fritz JACOB, Maximilian MICHEL a Mathias HUTZLER. *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe?—spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Research* [online]. 2018, **18**(4) [cit. 2023-04-03]. ISSN 1567-1364. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/foy023

MERTEN, Diane, Lara ERMAN, Gianluca Pierluigi MARABELLI, et al. Potential health effects of brewers' spent grain as a functional food ingredient assessed by markers of oxidative stress and inflammation following gastro-intestinal digestion and in a cell model of the small intestine. *Food & Function* [online]. 2022, **13**(9), 5327-5342 [cit. 2022-12-26]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/D1FO03090F

Mráz Agro CZ. Zkušenosti se silážováním pivovarského mláta v praxi. *Chov* [online]. **2018**(3) [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: https://mrazagro.cz/wp-content/uploads/clanek_05.pdf

Mráz Agro CZ.: *PIVOVARSKÉ MLÁTO* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://mrazagro.cz/wp-content/uploads/letaky/Pivovarske-mlato-cerstve.pdf>

MUSSATTO, S.I., G. DRAGONE a I.C. ROBERTO. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* [online]. 2006, **43**(1), 1-14 [cit. 2022-11-09]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001

MUSSATTO, Solange I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2014, **94**(7), 1264-1275 [cit. 2022-11-19]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.6486

MUSSATTO, Solange I.; TEIXEIRA, Jose A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. 2010.

NAGY, Vivien a Gerda DIÓSI. Using brewer's spent grain as a byproduct of the brewing industry in the bakery industry. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* [online]. 2021, **67**(1), 3339-3350 [cit. 2023-04-06]. ISSN 26768704. Dostupné z: doi:10.52091/EVIK-2021/1-5-ENG

NAIBAHO, Joncer, Nika BUTULA, Emir JONUZI, Małgorzata KORZENIOWSKA, Oskar LAAKSONEN, Maïke FÖSTE, Mary-Liis KÜTT a Baoru YANG. Potential of brewers' spent grain in yogurt fermentation and evaluation of its impact in rheological behaviour, consistency, microstructural properties and acidity profile during the refrigerated storage. *Food Hydrocolloids* [online]. 2022, **125** [cit. 2023-04-13]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2021.107412

ÖZVURAL, Emin Burçin, Halil VURAL, İncilay GÖKBULUT a Özen ÖZBOY-ÖZBAŞ. Utilization of brewer's spent grain in the production of Frankfurters. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2009, **44**(6), 1093-1099 [cit. 2023-04-08]. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2009.01921.x

PEI, Ya, Olugbenga BALOGUN, Dammah OTIENO, John S. PARKS a Hye Won KANG. The effects of brewers' spent grain on high-fat diet-induced fatty liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2022, **616**, 49-55 [cit. 2022-12-26]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2022.05.056

PETROVIC, Jovana, Biljana PAJIN, Suncica TANACKOV-KOCIC, Jelena PEJIN, Aleksandar FISTES, Nemanja BOJANIC a Ivana LONCAREVIC. Quality properties of cookies supplemented with fresh brewer's spent grain. *Food and Feed Research* [online]. 2017, **44**(1), 57-63 [cit. 2023-04-07]. ISSN 2217-5369. Dostupné z: doi:10.5937/FFR1701057P

PRATAP SINGH, Anubhav, Ronit MANDAL, Maryam SHOJAEI, Anika SINGH, Przemysław Łukasz KOWALCZEWSKI, Marta LIGAJ, Jarosław PAWLICZ a Maciej JARZĘBSKI. Novel Drying Methods for Sustainable Upcycling of Brewers' Spent Grains as a Plant Protein Source. *Sustainability* [online]. 2020, **12**(9) [cit. 2022-12-26]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su12093660

PREIßINGER, W., et al. Biertreber: Futterwert, Konservierung und erfolgreicher Einsatz beim Wiederkäuer. LfL-Information, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), 2008.

RAMÍREZ, Manuel a Rocío VELÁZQUEZ. The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(4) [cit. 2023-03-08]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation4040094

SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, **30**(5), 279-291 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-003-0049-x

SAIKA, Hiroaki, Hideo MATSUMURA, Tetsuo TAKANO, Nobuhiro TSUTSUMI a Mikio NAKAZONO. A Point Mutation of Adh1 Gene is Involved in the Repression of Coleoptile Elongation under Submergence in Rice. *Breeding Science* [online]. 2006, **56**(1), 69-74 [cit. 2023-04-02]. ISSN 1344-7610. Dostupné z: doi:10.1270/jsbbs.56.69

SANTOS, M, J.J JIMÉNEZ, B BARTOLOMÉ, C GÓMEZ-CORDOVÉS a M.J DEL NOZAL. Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry* [online]. 2003, **80**(1), 17-21 [cit. 2022-11-09]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(02)00229-7

SHAHIDI, F. a M. NACZK. Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC Press, Boca Raton*. 2003.

SCHETTINO, Rosa, Michela VERNI, Marta ACIN-ALBIAC, et al. Bioprocessed Brewers' Spent Grain Improves Nutritional and Antioxidant Properties of Pasta. *Antioxidants* [online]. 2021, **10**(5) [cit. 2023-04-08]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10050742

SCHWARZ, Mónica, M. Carmen RODRÍGUEZ-DODERO, M. Soledad JURADO, Belén PUERTAS, Carmelo G. BARROSO a Dominico A. GUILLÉN. Analytical Characterization and Sensory Analysis of Distillates of Different Varieties of Grapes Aged by an Accelerated Method. *Foods* [online]. 2020, **9**(3) [cit. 2023-04-14]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9030277

STEINER, J., S. PROCOPIO a T. BECKER. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology* [online]. 2015, **241**(3), 303-315 [cit. 2023-03-21]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-015-2461-7

STEWART, G.G. SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 309-315 [cit. 2023-02-28]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5

ŠTULÍKOVÁ, K., P. KUBIZNIAKOVÁ a D. MATOULKOVÁ. Amylolytická kvasinka „*Saccharomyces diastaticus*“ se představuje. *Kvasný I(4)*:22-25. 2019.

TAN, Yong Xing, Wai Kit MOK, Jaslyn LEE, Jaejung KIM a Wei Ning CHEN. Solid State Fermentation of Brewers' Spent Grains for Improved Nutritional Profile Using *Bacillus subtilis* WX-17. *Fermentation* [online]. 2019, **5**(3) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation5030052

TEREFE, Geberemariam. Preservation techniques and their effect on nutritional values and microbial population of brewer's spent grain: a review. *CABI Agriculture and Bioscience* [online]. 2022, **3**(1) [cit. 2023-03-28]. ISSN 2662-4044. Dostupné z: doi:10.1186/s43170-022-00120-8

TIŠMA, Marina, Anita JURIC, Ana BUCIC-KOJIC, Mario PANJICKO a Mirela PLANINIC. Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2018, **124**(2), 182-186 [cit. 2023-04-14]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.479

TROIANOU, V., C. TOUMPEKI, E. DORIGNAC, C. KOGKOU, S. KALLITHRAKA, Y. KOTSERIDIS a Jean-Marie AURAND. Evaluation of *Saccharomyces pastorianus* impact to Sauvignon blanc chemical & sensory profile compared to different strains of *S. cerevisiae/bayanus*. *BIO Web of Conferences* [online]. 2019, **12** [cit. 2023-04-02]. ISSN 2117-4458. Dostupné z: doi:10.1051/bioconf/20191202025

WALKER, Graeme a Graham STEWART. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* [online]. 2016, **2**(4) [cit. 2023-03-07]. ISSN 2306-5710. Dostupné z: doi:10.3390/beverages2040030

WILKINSON, Stuart, Katherine A. SMART a David J. COOK. A Comparison of Dilute Acid- and Alkali-Catalyzed Hydrothermal Pretreatments for Bioethanol Production from Brewers' Spent Grains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, **72**(2), 143-153 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2014-0327-02

WORKU, Anteneh a Omprakash SAHU. Significance of fermentation process on biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* (red beans). *Biotechnology Reports* [online]. 2017, **16**, 5-11 [cit. 2022-12-27]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2017.09.001

YADAV, Hariom, Shalini JAIN a Reza RASTAMANESH. Fermentation Technology in the Development of Functional Foods for Human Health: Where We Should Head. *Fermentation Technology* [online]. 2012, **01**(01) [cit. 2022-12-27]. ISSN 21677972. Dostupné z: doi:10.4172/2167-7972.1000e102

ZEKO-PIVAČ, Anđela, Marina TIŠMA, Polona ŽNIDARŠIČ-PLAZL, Biljana KULISIC, George SAKELLARIS, Jian HAO a Mirela PLANINIC. The Potential of Brewer's Spent Grain in the Circular Bioeconomy: State of the Art and Future Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, **10** [cit. 2022-11-10]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.870744

ZHU, Yang a Johannes TRAMPER. Koji – where East meets West in fermentation. *Biotechnology Advances* [online]. 2013, **31**(8), 1448-1457 [cit. 2023-03-08]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.07.001

