

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Vliv rozdílného dekokčního rmutování na kvalitu piva**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Antonín Puskarčík**

**Obor studia: Výživa a potraviny (AMD)**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

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

V Praze dne 13.04. 2017

---

### **Poděkování**

Rád bych zde poděkoval doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu a čas, které mi při psaní této práce věnoval. Dále děkuji Bc. Filipu Kalčicovi za pomoc, cenné rady a vstřícnost při realizaci provádění analýz a také Ing. Matěji Božikovi za vstřícnost a pomoc při přípravě vzorků.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za neutuchající podporu a pomoc při studiu.

# Vliv rozdílného dekokčního rmutování na kvalitu piva

## Souhrn

Práce se zabývá vlivem jednormutového (postup A) a dvourmutového (postup B) rmutovacího postupu na kvalitu piva. Za účelem analýzy byla uvařena dvě piva ze stejných surovin na pokusném minipivovaru. Piva se odlišovala pouze rmutovacím postupem, vše ostatní bylo totožné.

Analyzovány byly vzorky sladín odebrané přímo při rmutovacích postupech na klíčových teplotách a také vzorky piv vyrobených ze stejných surovin v různých pivovarech po ČR (průmyslové i minipivovary).

Pro analýzu byla zvolena metoda nukleární magnetické rezonance (NMR), pomocí které se podařilo zmapovat vývoj obsahu maltózy a profilu aminokyselin ve sladínách každého z postupů. I přesto, že oba postupy v průběhu rmutování vykazovaly odchylky, výsledné sladiny byly téměř totožné, bez statisticky významných rozdílů.

Postup A se zdál být vhodnějším pro funkci amylolytických enzymů a konstantně vykazoval vyšší absolutní hodnoty obsahu maltózy ve výsledných sladínách, takže umožňuje získat pivo s vyšším objemovým výtěžkem ve stejné kvalitě a ještě ušetřit čas i energii.

PCA analýza vzorků piv ukázala rozdělení mezi pivy typu Ale a Lager v aromatické oblasti a také mezi pivy z minipivovarů a z průmyslových pivovarů v oblasti sacharidů. V žádné z analýz však nedošlo k významnému odlišení našich vzorků. PCA analýzy neukázaly rozdíl mezi odlišnými dekokčními postupy. Největší vliv na NMR spektra piv mají vstupní suroviny.

Tyto výsledky potvrdila i senzorická analýza, kde pomocí trojúhelníkové metody nebyl zaznamenán rozdíl mezi našimi vzorky.

Pomocí této metodiky se nepodařilo najít významný rozdíl mezi postupem A a postupem B, který je delší a ekonomicky náročnější. Výsledky neukázaly žádné významné rozdíly v kvalitě piva.

**Klíčová slova:** pivo, rmutování, dekokce, kvalita, chmel, slad, rozdíl, NMR, konzumentský test

# Effect of different decoction mashing on beer quality

## Summary

The influence of single (Method A) and double (Method B) decoction mashing on beer quality were compared. Two beers were made from the same raw materials on experimental minibrewery. Beer differed in mashing process only.

Samples of wort were collected directly during mashing processes at key temperatures. Samples of beers produced from the same raw material in different breweries along Czech Republic (industrial and minibreweries) were collected for comparison.

Nuclear magnetic resonance (NMR) was chosen for analysis. Development of maltose and amino acid profile of each of the procedures were mapped. Even though both processes show deviations during mashing, resulting wort were nearly identical, with no statistically significant differences.

Method A seemed to be better for amylolytic enzymes function, consistently gave higher absolute values of maltose in the resulting wort, therefore obtaining beer with a higher volumetric yield of the same quality and save time and energy.

PCA analysis allowed a distinction between Ale and Lager beer type in the aromatic region and also beer from industrial and minibreweries in carbohydrate region. None of the analysis showed significant difference between our beers. PCA analysis did not reveal distinct differences between decoction mashing methods. The largest effect on NMR spectra had input materials.

These results were confirmed by sensory analysis where, using a triangular method, no difference between our samples was observed.

A significant difference between the Method A and Method B was not found using this methodology. Results showed no significant differences in the quality of beer.

**Keywords:** beer, mashing, decoction, quality, hops, barley, difference, NMR, sensory test

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce a vědecká hypotéza</b>	<b>8</b>
2.1	Cíl práce	8
2.2	Vědecká hypotéza	9
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>9</b>
3.1	Historie výroby piva	9
3.2	Suroviny pro výrobu piva	10
3.2.1	Voda	10
3.2.2	Slad	10
3.2.3	Chmel	11
3.2.4	Kvasnice	12
3.3	Výroba sladu	13
3.3.1	Máčení	13
3.3.2	Klíčení	13
3.3.3	Hvozdění	14
3.3.4	Druhy sladů	14
3.4	Výroba piva	16
3.4.1	Vystírání	17
3.4.2	Rmutování	17
3.4.3	Scezování a vyslazování	18
3.4.4	Chmelovar	18
3.4.5	Hlavní kvašení	18
3.4.6	Dokvašování a ležení	19
3.5	Rmutování	20
3.5.1	Infuzní rmutování	22
3.5.2	Dekokční rmutování	23
3.5.2.1	Jednormutový postup	23
3.5.2.2	Dvourmutový postup	23
3.5.2.3	Třírmutový postup	24
3.5.3	Srovnání rmutovacích postupů	24
3.6	Kvalitativně významné látky ve sladině	25
3.6.1	Sacharidy	26
3.6.2	Dusíkaté látky	27
3.6.3	Polyfenoly	27
3.7	Ekonomické aspekty výroby piva	28
3.8	Nukleární magnetická rezonance v analýze potravin	28

<b>4</b>	<b>Metodika práce.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Suroviny použité na výrobu.....</b>	<b>30</b>
4.1.1	Slad.....	30
4.1.2	Voda.....	30
4.1.3	Chmele.....	31
4.1.4	Kvasnice.....	31
<b>4.2</b>	<b>Varní proces.....</b>	<b>31</b>
4.2.1	Šrotování, vystírka a rmutování.....	32
4.2.1.1	Postup A (jedno rmutový).....	32
4.2.1.2	Postup B (dvou rmutový).....	33
4.2.2	Vyslazování.....	33
4.2.3	Chmelovar a chlazení.....	34
4.2.4	Kvašení, stáčení a ležení.....	34
<b>4.3</b>	<b>Analytické hodnocení obsahu látek.....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Odběr a příprava vzorků.....	34
<b>4.4</b>	<b>Senzorická analýza.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Výpočty a zpracování dat.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>36</b>
5.1	Měření hustoměrem.....	36
5.2	Analýza vzorků sladin.....	36
5.3	Analýza piva.....	43
5.4	Senzorická analýza.....	46
<b>6</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>53</b>

# 1 Úvod

Česká Republika historicky patří mezi pивní velmoci. V posledních letech jsme svědky pomalého proměňování české pивní kultury, a to především stagnace spotřeby piva na osobu a významného snížení zájmu o výčepní pivo konzumované v hostincích. Naopak roste spotřeba piva lahvového, spotřeba ležáků a speciálních piv. Zároveň zažíváme boom minipivovarů, jejichž počet dosahuje předválečných hodnot (ČSÚ, 2016).

Jde tedy o pozvolný trend upřednostnění kvality před kvantitou. Kvalita potravin je v poslední době významným celosvětovým tématem a dotýká se i oblasti pivovarnictví. Spatřujeme jakýsi návrat ke kořenům, do dob, kdy bylo české pivo nezpochybnitelnou světovou špičkou. Tento trend se dotýká i velkých průmyslových pivovarů.

Výrobci se tak snaží o dosažení co nejlepší kvality a zároveň o udržení nákladů na výrobu. Rmutování je proces při výrobě piva, který významně zasahuje jak do oblasti jeho kvality, tak i do oblasti ekonomické a do časové náročnosti na výrobu piva.

V Českých zemích bylo obvyklé náročné dekokční rmutování na dva až tři rmuty. Znamé bylo i infuzní rmutování, kdy se celé dílo zahřívало pouze v jediné nádobě a nebylo ani povařeno. Přestože posledně jmenovaný způsob předpokládal nejjednodušší manipulaci i ušetření na prostředcích, nepřinášel, zejména v případě sladů vedených českým způsobem, potřebnou výtěžnost (Bílek a kol., 1954).

Infuzní rmutování se používalo zejména na Britských ostrovech. Různorodost používaných sladů, jejichž vlastnosti se na kontinentě a v Anglii výrazným způsobem lišily, byla hlavním důvodem, proč na ostrovech postačila jednodušší infuze, oproti dekokci používané během 19. století v převážné části Evropy (Eßlinger a kol., 2009).

Postupem času docházelo k ústupu od třímutterového postupu. V dnešní době dochází k ústupu od postupu dvourmutového a mnoho pivovarů vaří české ležáky postupem jednourmutovým. To vyvolává řadu otázek ohledně kvality a tradiční výroby ležáku českého typu.



## **2 Cíl práce a vědecká hypotéza**

### **2.1 Cíl práce**

Cílem této práce je zhodnotit vliv jednormutového a dvourmutového varného postupu na výslednou kvalitu piva pomocí NMR spektroskopie a sensorického testu.

### **2.2 Vědecká hypotéza**

Není sensoricky rozlišitelný rozdíl mezi jednormutovým a dvourmutovým varným postupem. Lze využít jednormutový postup k úspoře nákladů a času na výrobu piva bez významného sensorického a kvalitativního rozdílu výsledného piva.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Historie výroby piva

Pivo je nejstarší kulturní nápoj lidstva a jeho výroba je nedílně spojena již se starověkými civilizacemi. Původní pivo nemělo s tím dnešním mnoho společného, neobsahovalo chmel ani slad, bylo vyráběno z tehdy dostupných surovin. Varní proces se léty zdokonaloval a přizpůsoboval novým trendům, takže již ve středověku vzniklo pivo, které je podobné dnešnímu, s použitím sladu a chmele (Novák, 2009).

Vývoj pivovarnictví se od primitivní domácí přípravy přes řemeslnou přípravu, až po současnou průmyslovou výrobu, změnil. Navzdory zlepšování techniky a technologií princip zůstal stejný (Robbins, 2009).

Pivovarnictví má v České republice dlouholetou tradici, která byla zpřetrhána až světovými válkami. V dnešní době však dochází k návratu k této tradici a české pivo se opět stává populární díky své kvalitě, a to i v zahraničí (Verhoef, 2004).

### 3.2 Suroviny pro výrobu piva

#### 3.2.1 Voda

Voda je v procesu výroby piva základní surovinou, na její kvalitu jsou kladeny velké nároky z hlediska chuťové a zdravotní nezávadnosti. Je nutné neustále dohlížet a dbát na jakost používané vody a kontrolovat její složení, což v pivovaru probíhá denně a voda je odborně degustována několika odborníky a chemicky kontrolována (Basařová a kol., 2010).

V několika oblastech Evropy se vyvinuly základní typy piv v podstatě na základě složení vod, které se k výrobě používaly. Dnes nejrozšířenějším a nejznámějším druhem je spodně kvašený světlý ležák vyráběný v Plzni při použití plzeňské velmi měkké vody ( $\text{CaO}$  0,7-1,4 mmol/l). Z technologického hlediska je tedy nutné hlídat tvrdost vody a její korozivitu, poškozující zařízení pivovaru (Kosař a kol., 2000).

Svým složením musí voda odpovídat normě Pitná voda ČSN 83 0611, ve které jsou uvedeny chemické požadavky na pitnou vodu. Kromě požadavku zdravotní nezávadnosti, který musí splňovat voda přicházející do styku s vyráběným nápojem i nepřímo, musí být splněny u jednotlivých typů vod speciální požadavky na jejich složení (Basařová a kol., 2010).

### 3.2.2 Slad

Slad se vyrábí z obilovin, jeho cílem je přeměnit obilovinu na slad bohatý na enzymy a extrakt důležitý pro samotné vaření piva ve varních postupech. K pivovarským účelům je nejvhodnější jarní sladovnický ječmen dvouřadý (Basařová a kol., 2010).

Zrna ječmene se skládají ze tří částí; obalu, zárodku a endospermu, jehož vnitřní část je tvořena tenkostěnnými buňkami se zásobním škrobem. Obilka jako celek je z 80–88 % tvořena sušinou, z toho škrob zahrnuje 60–65 % její hmotnosti. Další sacharidy se nacházejí v menším (pentosany 9 %,  $\beta$ -glukany 3,3–4,9 % a celulóza 4–7 %) až zanedbatelném množství (sacharosa 1–2 %) (Kosař a kol., 2000).

Vlastnosti odrůd ječmene výrazně ovlivňují kvalitu sladu i kvalitu vyrobeného piva. Slady z ozimých ječmenů mohou působit technologické problémy, proto se ozimé ječmeny používají spíše jako alternativa nebo doplněk potřeby sladu při nízké sklizni jarního ječmene. Každá odrůda postupně ztrácí během let své specifické genetické vlastnosti - výnos, klíčivost, chemické složení, odolnosti proti chorobám aj. Výsev takovéto odrůdy se postupně snižuje a následně se odrůda vyřadí. Každá nová odrůda ječmene musí být schválena k výsevu a registrována, až poté se postupně rozšíří její pěstování. Vlastnosti odrůd ječmene se tedy časem zlepšují (Basařová a kol., 2010).

Slad je vyráběn z kvalitních obilovin vhodných ke sladování. Obiloviny musí splňovat řadu parametrů a podle nich se posuzuje vhodnost použití. Technologie zpracování se liší způsobem výroby, především zvolenou teplotou, délkou sušení, požadovaným charakterem výsledného produktu a také druhem zpracovávané obiloviny a její odrůdou (Kosař a kol., 2000).

Požadavek:	Hodnota:
Výnos zrna	6,5 – 7 t/ha
Počet produktivních odnoží	2 – 2,5
Počet zrn v klasu	18 – 20
Hmotnost 1000 zrn	42 – 46 g
Výška rostliny	70 – 80 cm
Vegetační doba	95 – 105 dnů
Obsah škrobu	60 – 65 %
Obsah bílkovin	10 – 11 %

Tabulka 1 Požadavky na sladovnický ječmen (Kosař a kol., 2000)

### 3.2.3 Chmel

Český chmel je ve světě pojmem, je nazýván též zeleným zlatem, zejména Žatecký poloraný červeňák patří mezi nejlepší světové odrůdy chmele a je od 15. století brán jako standard kvality chmelů pro své charakteristicky jemné aroma a vyváženou hořkost, kterou pivu dodává. V Čechách jsou významnými pěstebními oblastmi Žatečko a Ústecko, na Moravě Tršicko. Pro pivovarské účely se využívá samičích neoplozených hlávek obsahujících technologicky významné látky - pryskyřice, polyfenoly a silice.

Pryskyřice jsou zdrojem hořké chuti piva. Měkké chmelové pryskyřice obsahující  $\alpha$ -hořké kyseliny, skládající se převážně z humulonu, kohumulonu a adhumulonu, a  $\beta$ -hořké kyseliny, hlavně z lupulonu, kolupulonu a adlupulonu. Tvrdé pryskyřice obsahují humulinové a hulupinové kyseliny.

Polyfenoly se významně podílejí na reakcích vzniku nerozpustných tríslo-bílkovinných komplexů při tvorbě lomu (srážení denaturovaných bílkovin do vloček během chmelovaru), na vylučování hořkých kalů a dále na řadě oxidačně-redukčních reakcí, uplatňujících se při vytváření barvy a koloidní stability piva. Polyfenoly jsou také přirozené antioxidanty.

Silice jsou směsí několika set organických látek různého chemického složení, fyzikálních vlastností a jsou nositelkami chmelového aroma (Basařová a kol., 2010).

Rozdělení odrůd chmele:

**Jemné aromatické chmele** – obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin se pohybuje mezi 3,5 až 4,0 hm % v sušině. Zástupci: Žatecký poloraný červeňák (ČR), Saaz (Německo) a Lublin (Polsko).

**Aromatické chmele** – obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin 3,5 až 6,5 hm %. Patří sem odrůdy jako Cascadela (USA), Sládek (ČR), Perle a Select (Bavorsko), Golding (Slovinsko) a další.

**Hořké chmele** - obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin okolo 8 hm %. Často označovány jako poloaromatické, dvouúčelové nebo také jemně hořké. Zástupci: Bor a Premiant (ČR), Northern Brewer (Německo) a mnohé další.

**Vysokoobsažené chmele** - obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin až 15 hm %. Jedná se o hybridní odrůdy chmele obvykle s horším aroma. Jsou vhodné na zpracování především na extrakty. Zástupci: Magnum (Německo), Nugget (Anglie) nebo Taurus (USA) (Zýbrt, 2005).

### 3.2.4 Kvasnice

Kvasnice jsou jednobuněčné mikroorganismy, pro pivovarství jsou důležité zejména z pohledu látkové výměny, kdy mají schopnost přeměnit jednoduché zkvasitelné cukry (glukosu, fruktózu), disacharidy (sacharosu, maltosu) a trisacharidy (rafinosu) na oxid uhličitý a alkohol (ethanol). Na metabolismus kvasinek má vliv složení mladiny, dále pak podmínky, během kterých kvasnice metabolizují a vlastnosti kvasnic samotných, daných jejím druhem. Taxonomie nerozlišuje, zda se jedná o kvasinky pivovarské (kulturní), či o kvasinky divoké, užívané pro spontánní kvašení zejména belgických piv typu lambic. Kulturní kvasnice rozeznáváme dle způsobů použití pro spodní kvašení *Saccharomyces cerevisiae* subs. *uvarum carlbengensis* a pro svrchní kvašení *Saccharomyces cerevisiae* subs. *Cerevisiae* (Kosař a kol., 2000).

## 3.3 Výroba sladu

Cílem sladování je vytvoření diastatických enzymů, které způsobují konverzi škrobu na jednoduché cukry. Diastatická mohutnost je vlastnost ječmene, která určuje míru potenciální disociace komplexního škrobu na jednodušší cukry. Vysoké nároky na kvalitu vstupního ječmene, jako například obsah proteinů, velikost zrn nebo obsah vody, zaručují bezproblémový varní proces (Reifenberger a kol., 1997).

Proces výroby sladu zahrnuje tři fáze: máčení, klíčení a hvozďení.

### 3.3.1 Máčení

V průběhu máčení se zvýší obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna. Dochází k hydrolýze  $\beta$ -glukanů a hemicelulos a také kontrolovanému štěpení škrobu (Prokeš, 2000).

Máčení ječmene trvá 38 – 46 hodin do té doby, dokud zrna neabsorbují vodu o hmotnosti téměř 50% své váhy. Zvýšení vlhkosti vede k začátku klíčení a také zbaví zrna zbylých nečistot (Ďopka a kol., 2000).

### 3.3.2 Klíčení

Klíčení je hlavní fáze výroby sladu, při které dochází k aktivaci a nové tvorbě enzymů. Příkladem jsou amylolytické enzymy, které se podílejí na hydrolýze škrobu, glykogenu a dalších polysacharidů, v nichž se vyskytují alfa-1,4-glykosidické vazby. Jsou to alfa-amylasa a beta-amylasa a mají zásadní význam především v procesu rmutování. Tyto enzymy štěpí škrob a tím se podílejí na obsahu zkvasitelných sacharidů ve sladině. Alfa-amylasa nebyla v ječmeni prokázána a vzniká teprve při klíčení. Beta-amylasa je v malém množství přítomna již v ječném zrně a při sladování se její obsah zvyšuje. Při hvozdění oba enzymy částečně denaturují, alfa-amylasa více vzhledem k značné citlivosti na teplotu (Benkovská a kol., 2011).

Pro úspěšné započetí klíčení jsou nezbytné enzymy přítomné v zárodku, aleuronové vrstvě a endospermu. Enzym  $\beta$ -glukanasa degraduje  $\beta$ -glukany při sladování a rmutování na oligosacharidy a glukosu. Při hvozdění se enzym inaktivuje (nad 50 °C). Amylolytické enzymy,  $\alpha$  a  $\beta$ -amylasa, hydrolyzují především škrob. Při hvozdění dochází k částečné denaturaci těchto enzymů. Oproti  $\alpha$ -amylase (teplotní optimum 70 °C, inaktivace 80 °C) je  $\beta$ -amylasa citlivější na teplotu (teplotní optimum 60–65 °C, inaktivace 70 °C). Cílem hvozdění je převést naklíčené obilky s vysokým obsahem vody do skladovatelného stavu jejich vysušením (předsušení 60 °C, dotažení 80–105 °C) (Ťopka a kol., 2000).

### 3.3.3 Hvozdění

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu, během které je zelený slad s vysokým obsahem vody převeden do skladovatelného a stabilního stavu. Zelený slad se nejprve předsuší na hvozdě při teplotách do 60 °C a následně se vyhřeje a dotahuje při 80 až 105 °C. Obsah vody je nutné snížit až pod 2%, tím se deaktivují veškeré enzymy, zastaví se klíčení a luštěcí pochody v zrně a vytvoří se aromatické a barevné látky, charakterizující dané druhy sladů. Celkový čas se pohybuje v rozmezí 12 až 24 hodin. Po hvozdění navazuje odkličování, čištění a šrotování sladu (Benkovská a kol., 2011).

### 3.3.4 Druhy sladů

Teploty hvozdění jsou definující pro různé typy sladů, například slad plzeňského typu se dotahuje při teplotě 85 °C, což vede k nižší produkci barevných a aromatických látek, než obsahuje například slad bavorského typu, který se dotahuje při teplotě až 105 °C. Vyššími teplotami lze docílit až karamelizace sladu a vytvoření sladu karamelového (Briggs, 1998).

- **Slad plzeňského typu (světlý slad, pils, bohemian)**

Jedná se o světlý slad hojně používaný pro výrobu světlých piv typu ležáků, dále konzumních piv a pro výrobu speciálních piv obsahující různou koncentraci původní mladiny. Surovinou pro tento typ sladů je sladovnický ječmen jarní. Díky přiměřenému proteolytickému rozluštění, dotahovacím teplotám okolo 80 až 85 °C vzniká optimální tvorba barevných a aromatických látek, což se projevuje na nízkých hodnotách barvy kongresní sladiny (3,0 až 4,2 jednotek EBC). Tyto světlé slady vykazují dostatečnou amylolytickou aktivitu, čímž zajišťují dokonalé zcukření rmutů. Díky přiměřené proteolytické aktivitě obsahují i optimální složení dusíkatých látek (Briggs, 1998).

- **Slad mnichovského typu (bavorský slad)**

Vysoká hodnota kongresní sladiny (11,0 až 17,3 jednotek EBC), vysoký obsah bílkovin, nižší extraktivnost, nižší aktivita sladových enzymů, výrazné aroma a především širší spektrum a vysoká koncentrace produktů Maillardovy reakce, to jsou typické znaky tmavého sladu mnichovského typu. Tyto slady vyrobené taktéž ze sladovnického ječmene jarního se používají hlavně pro výrobu tmavých piv. Při výrobě dochází k intenzivnějšímu rozluštění zrna během klíčení a při hvozdění se uplatňují mnohem vyšší teploty s dotahováním při 100 až 105 °C (Kosař a kol., 2000).

- **Vídeňský slad**

Slouží hlavně pro výrobu speciálních piv nebo ke zvýšení sytosti barvy piv světlých. Oproti světlému plzeňskému sladu má vídeňský vyšší hodnotu barvy a je označován jako přechod mezi plzeňským a bavorským tmavým sladem (Kosař a kol., 2000).

- **Karamelové slady**

Tento typ sladů je charakteristický vysokým obsahem cukrů, aromatických i barevných látek. Slad je enzymaticky inaktivní nebo obsahuje jen nepatrnou aktivitu, ovlivněnou intenzitou

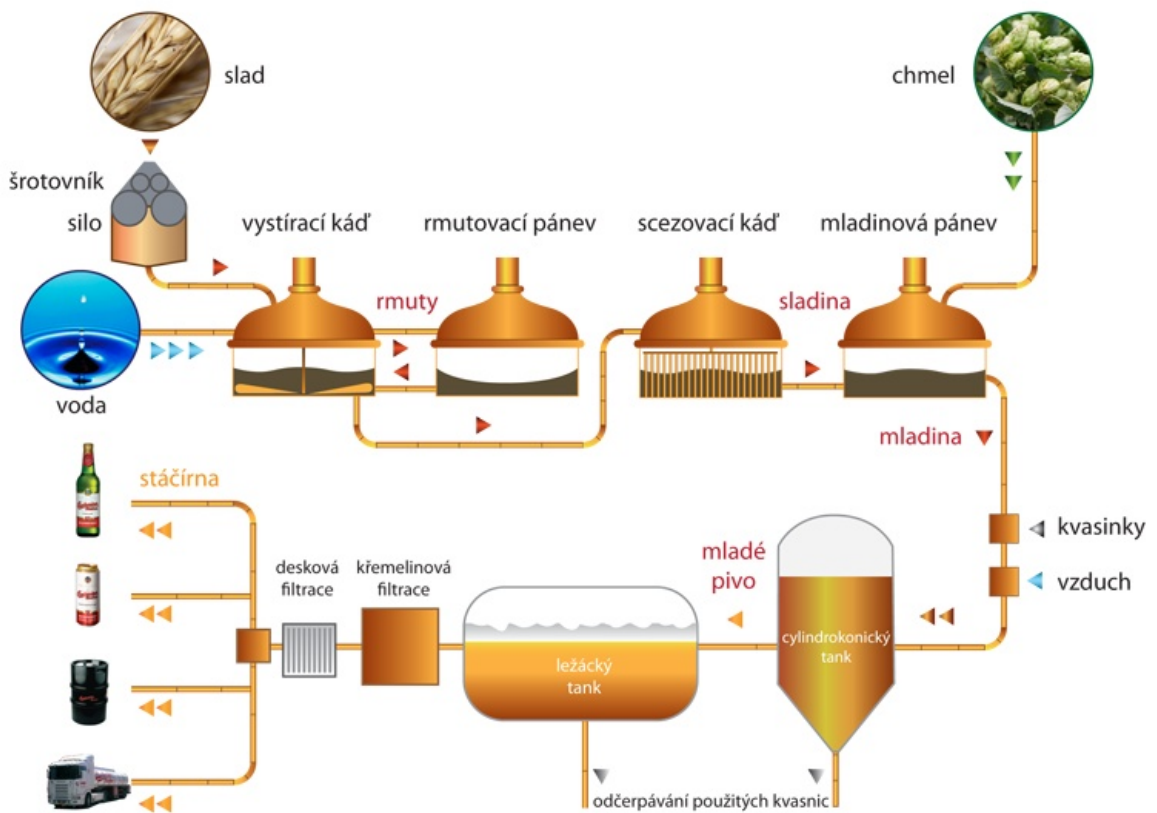
pražení. K výrobě se používá dobře rozluštěný zelený slad nebo navlhčený světlý slad. Pražení probíhá v bubnových rychlopražičích při konečných teplotách až 180 °C. Zapařením při teplotách kolem 70 °C se dosáhne dokonalého zcukření v obilce a následně se zcukřený slad vyhřeje na karamelizační teplotu. Před použitím je nutné nechat slad odležet alespoň 2 až 4 týdny z důvodu vytvoření příjemného aroma, které se výrazně projeví v hotovém výrobku (Kosař a kol., 2000).

- **Speciální slady (barvicí, diastatické, nakuřované atd.)**

Speciální slady se od běžných sladů odlišují jednak enzymovou aktivitou, dále barvou, vůní, kyselostí nebo redoxní kapacitou. Slouží k výrobě speciálních piv, přidávají se při použití náhražek sladů, nebo k úpravě určitých kritérií sladiny vyrobené ze sladů běžných. Jejich přídavkem k běžným sladům se dosáhne úprav po stránce sensorických vlastností, především úprav v chuti, barvě, aroma či pěnivosti vyrobeného piva (Briggs, 1998).



## 3.4 Výroba piva



Obrázek 1 Schéma výroby českého piva (zdroj: Budějovický Budvar, n.p.)

Proces výroby piva lze rozdělit do následujících fází:

### 3.4.1 Vystírání

Vystírání je proces, který následuje ihned po sešrotování sladu, jeho cílem je převést do roztoku co nejvíce rozpustných látek. Samotné vystírání lze popsat jako dvoufázové mísení čerstvého šrotu s ohřátou vodou ve vystírací pánvi, kde se šrot mísí s vodou o teplotě cca 45 °C. Pro světlá piva je vhodná vystírka řidší a pro tmavá piva vystírka hustší. Kvalita vystření ovlivňuje další procesy vaření piva (Basařová, 2010).

### **3.4.2 Rmutování**

Proces rmutování je podrobně rozebrán níže.

### **3.4.3 Scezování a vyslazování**

Cílem scezování je separace tekutiny od pevné části, tedy sladiny od mláta. Ke scezování se užívá speciální síto, které je umístěno na dně nádoby, na tomto sítu se vytvoří vrstva mláta, která slouží jako filtrační vložka. Výsledkem scezování je tzv. předeček – je to sladina s vysokou stupňovitostí (16 – 20% obsahu extraktu).

Mláto ale obsahuje stále mnoho využitelných cukrů a dalších látek, z tohoto důvodu se praktikuje tzv. vyslazování. Vyslazení spočívá v prolití mláta vodou o teplotě 78 °C. Výsledkem jsou tzv. výstřelky o stupňovitosti klesající podle toho, jak se ze sladu vymývají cukry (až 0,5 – 1% obsahu extraktu). Vyslazuje se obvykle na 1-3 dávky vody, následné výstřelky se nazývají patoky a vylévají se, protože by zhoršovaly kvalitu piva. Výsledkem je čirá sladina o požadované koncentraci (Birgss a kol., 2004).

### **3.4.4 Chmelovar**

V této fázi je sladina povařována s chmelem, probíhají v ní fyzikálně-chemické změny a vzniká mladina. Během povařování sladiny s chmelem dochází k odparu vody za účelem dosažení požadované koncentrace a ke sterilaci mladiny, inaktivaci enzymů a především k převedení hořkých látek z chmele do sladiny (Basařová, 2010).

Chmel přenáší do sladiny během chmelení aromatické látky obsažené v chmelových silicích a hořké látky prostřednictvím pryskyřic obsahujících alfa hořké kyseliny (humulony). Dávkování chmelu probíhá tak, že se první podíl čítající polovinu z celkového množství chmele aplikuje na začátku chmelovaru, druhý 50 minut před koncem chmelovaru a poslední dávka, která obsahuje nejkvalitnější aromatické chmele s alfa hořkými kyselinami, se přidá 20 minut před koncem chmelovaru. Tento postup je znám jako chmelení natřikrát a je typický pro piva vyráběná v ČR. Následně se mladina zbaví kalů a zbytků chmele ve vířivé kádi a zchladí na zákvasnou teplotu (Kosař a kol., 2000).

### 3.4.5 Hlavní kvašení

Zchlazená a provzdušněná mladina se musí rychle smístit s kvasnicemi, aby se redukovala možnost kolonizace bakteriemi. Kvašení probíhá v kvasných tancích nebo otevřených nádobách, kterým se říká spilka.

Cílem hlavního kvašení je přeměnit sacharidy na alkohol a oxid uhličitý za pomoci pivovarských kvasinek a nastolit a nadále udržovat vhodné podmínky pro tento proces. Během kvašení, v závislosti na metabolismu kvasnic, vznikají sensoricky aktivní látky jako např. vyšší alkoholy, diacetyl, estery, aldehydy aj. Kvašení lze rozdělit na spodní a svrchní.

Kvasinky určené pro spodní kvašení jsou hojně používány pro piva českého typu k výrobě ležáků, v tradiční výrobě se teplota kvašení u tzv. studeného vedení pohybuje v rozsahu 5 až 9 °C, u intenzifikovaných postupů spodního kvašení se jedná o teploty 12 až 16 °C. Spodní kvasnice zcela zkvašují rafinosu, mají oproti kvasnicím svrchního kvašení rozdílné složení genetického materiálu a rozdílné technologické vlastnosti důležité pro tvorbu sensorických látek. Na konci kvašení sedimentují na dno nádob (Basařová, 2010).

Kvasinky svrchního kvašení slouží pro výrobu piv typu Porter, Stout a Ale, teplota kvašení se pohybuje v rozmezí 12 – 16 °C. Kvasinky svrchního kvašení mají oproti kvasinkám spodního kvašení vyšší tepelnou odolnost, a jak již bylo zmíněno výše, mají i rozdílné složení genetického materiálu a technologicky významných látek majících vliv na tvorbu sensoricky významných látek. Na konci kvašení jsou bublinkami oxidu uhličitého vynášeny na povrch kvasící mladiny (Kosař a kol., 2000).

### 3.4.6 Dokvašování a ležení

Po vykvašení je mladé pivo převedeno do ležáckých tanků, v ležáckém sklepě při teplotách kolem 0 °C nastupuje fáze zrání piva. Mladé pivo má zbytkový obsah zkvasitelných cukrů 6 – 10%, podle typu piva. Tento zbytkový cukr se během několika týdnů přemění na CO<sub>2</sub>, které dodá pivu říz. Výsledný produkt již žádný zkvasitelný cukr neobsahuje. Během zrání piva dochází k množství procesů, nejvýznamnější z nich jsou vázání aldehydů a sirných komponent na CO<sub>2</sub>, degradaci alfa-acetolaktátu a diacetylu, sedimentaci kvasinek a čerění piva. Pivo se nechává zrát od jednoho do tří měsíců, podle typu piva, obsahu alkoholu a typu kvasinek (Bamforth, 2003).

### 3.5 Rmutování

Rmutování je důležitým krokem v procesu vaření piva a ovlivňuje typ a kvalitu vyráběného piva. Cílem rmutování je vytvořit sladinu obsahující vhodné zkvasitelné cukry, živiny pro kvasnice a sloučeniny podílející se na tvorbě aromatu. Konečné složení sladiny je závislé na zvoleném rmutovacím postupu, mění se podle typu a kvality hotového piva. Cílem při výběru varního postupu je vyprodukování sladiny s požadovanými vlastnostmi (Koljonen a kol., 1995).

Rmutování zahrnuje:

1. rozpuštění látek přímo ve vodě rozpustných;
2. enzymatické hydrolýzy následované rozpuštěním řady látek, důležitých pro daný typ a charakter piva;
3. oddělení rozpuštěných látek.

Výsledkem působení enzymatických změn při vaření piva je rozložit velké makromolekuly sladu na menší molekuly nezbytné pro růst kvasinek a kvašení. Ve skutečnosti se škrob rozloží na zkvasitelné cukry, které mohou být snadno přeměněny na alkohol pomocí kvasinek. Enzymy podílející se na hydrolýze látek zahrnují amylázy, proteázy, peptidázy, transglukosidázy a fosforylázy. Hlavní faktory, které regulují aktivity těchto enzymů, jsou teplota, hodnota pH, doba a koncentrace mladiny (Owuama, 1997).

Termostabilita hydrolytických enzymů škrobu je rozhodující pro výtěžek zkvasitelných cukru během rmutování. Profil teploty rmutování je rovnováhou mezi požadovanou teplotou pro tvorbu škrobového gelu, který je zapotřebí k efektivní hydrolýze a míře tepelné inaktivace těchto enzymů (Evans a kol., 2003).

Ze sladu jsou uvolněny dva hlavní hydrolytické enzymy – alfa a beta amyláza. Teplota 60-65 °C maximalizuje aktivitu beta-amylázy, 65-70 °C alfa-amylázy. Tyto dvě teploty jsou známy také jako nižší a vyšší cukrotravná teplota. Odpočívání rmutu při určité teplotě je důležité pro indukci některých enzymatických změn (Bamforth, 2000).

Technologické teploty, mezi kterými se zařazuje technologická pauza, známá jako „odpočívání díla“, jsou následující:

Optimální teplota	Název	Enzymy	Produkce
40 - 50 °C	Vystírací teplota	Aktivace enzymů	
50 - 55 °C	Peptonizační teplota	Proteázy a peptidázy	Aminokyseliny
60 - 65 °C	Nižší cukrotvorná teplota	Beta-amyláza	Maltóza
65 - 75 °C	Vyšší cukrotvorná teplota	Alfa-amyláza	Maltóza, Dextriny
78 °C	Odrmutovací teplota	Inaktivace enzymů	

**Tabulka 2** Optimální teploty pro odpočívání díla

Alfa-amyláza velmi rychle redukuje obsah nerozpustného a rozpustného škrobu rozkládáním jeho molekul do mnoha kratších řetězců (tj., částečně fermentovatelné polysacharidové frakce, dextrin a maltotriózu), které mohou být využity beta-amylasou. Zařazením dostatečně dlouhé technologické pauzy mezi teplotními stupni může alfa-amyláza rozložit všechny dextriny na maltózu, glukózu a malé rozvětvené "limitní dextriny". Nicméně konverze škrobu rychlejší beta-amylázou je účinnější. Beta-amyláza je selektivnější než alfa-amyláza, protože oddělí dva cukry najednou od škrobového řetězce. Beta-amyláza začne postupně štěpit jednotky maltózy od neredukujícího konce velkých dextrinů produkujících maltózu, nejběžnější cukr ve sladu. Celkově lze říci, že alfa a beta-amylázy jsou schopné přeměnit pouze 60 až 80% škrobu na zkvasitelné cukry.

Proteázy jsou skupinou enzymů, které redukují vysoko-molekulární proteiny na jednodušší složky aminokyselin štěpením peptidické vazby mezi proteiny. Proteázy a peptidázy jsou dva hlavní enzymy, které patří do této skupiny. Technologická pauza při peptonizační teplotě je zodpovědná za redukování délky vysoko-molekulárních proteinů ve rmutu, které způsobují nestabilitu pěny a zákal, na nízko-molekulární proteiny (MacGregor a kol., 1999).

Metody rmutování je možné rozdělit do dvou hlavních kategorií: infuzní rmutování a dekokční rmutování. Infúze je nejčastěji spojena s výrobou piva typu Ale a Stout, ale také některých Lagerů. Dekokční metoda se vyvinula do značné míry v důsledku použití málo rozluštěných nebo enzymaticky slabých sladů. Obecně se používá v oblasti výroby ležáku, tedy Lager a Pils. Tímto systémem se část sladiny (rmut) povaří v oddělené nádobě a poté se vrátí zpět pro zvýšení teploty. Dekokční rmutování zahrnuje jedno-, dvou- nebo tři-rmuty a dává původ jedno-, dvou- nebo tři-rmutování (Goldammer, 2000).

Současné používané způsoby vaření sladiny lze rozdělit do dvou základních skupin: Infúzní postupy, kdy se celý objem vaří najednou: rmutování infúzní, rmutování skokem Dekokční postupy, kdy se část objemu vaří ve zvláštní nádobě: I., II., III. rmutový postup

### **3.5.1 Infuzní rmutování**

Při těchto postupech se celá várka uvaří najednou v jedné nádobě. To přináší zásadní rozdíl v kvalitě ale i v ceně hotového piva.

Infúzní rmutování je nejméně náročným rmutovacím postupem, pro který postačuje jediná vyhřívaná nádoba. Vyloučením přečerpávání rmutů a vyloučením varu rmutů se dosahuje světlejší barvy a méně výrazné chuti piva než u dekokčních způsobů. Pro zajištění vysokého varního výtěžku je důležité zpracování dobře rozluštěného sladu.

Běžný infuzní postup pro zpracování dobře rozluštěných sladů je znázorněn na obrázku. Šrot se vystře podle vybrané technologie do vody o teplotě 48-50°C, alternativně při 60-62°C a ponechá se při této teplotě asi 30 min. Poté se přihřeje zapáčkou nebo ohřevem na 65°C s prodlevou opět 30 minut, dále se ohřívá na teplotu 72°C s prodlevou 20 min. Následně se dílo ohřeje na odrrmutovací teplotu 76°C, při které se ponechá opět 20 minut. Doba celého rmutování nepřesáhne 100 min.

Výhodou tohoto postupu jsou nižší investiční náklady na zařízení varny, krátká doba vlastního rmutování, jednoduchost a nižší energetická náročnost. Pro dosažení dobrých varních výsledků je předpokladem použití velmi dobře rozluštěných sladů (Kunze, 2011).

### 3.5.2 Dekokční rmutování

Jde o způsoby, při nichž k vaření dochází tepelným zpracováním ve rmutovací pánvi jedné, dvou nebo tří částí, tzv. „rmutů“, odebraných postupně z původního vystřeného objemu do další nádoby, tzv. „rmutovací kádě“. Energetická náročnost takových postupů je sice vyšší, ale vzrůstá též výtěžnost a především kvalita výrobku (Kunze, 2011).

#### 3.5.2.1 Jednormutový postup

Z hlediska délky a mechanického účinku se infúznímu postupu nejvíc přibližuje jednormutový postup. Oba se s výhodou používají u dobře rozluštěných sladů.

Vystírá se při teplotě 50°C, následuje 15 min odpočinek, dále ohřev párou nebo zapaření horkou vodou na teplotu 62°C, znovu odpočinek 15 min a odběr hustého rmutu. Ten se zcukří při vyšší cukrovarné teplotě 72°C, při níž se ponechá prodleva 20 min, po které se dílo dohřeje párou na odrmutovací teplotu 76°C. Celková doba obsazení rmutovací soupravy je cca 160 minut (Kosař a kol., 2000).

#### 3.5.2.2 Dvourmutový postup

Klasický dvourmutový postup je vhodný pro výrobu světlých piv plzeňského typu při zpracování středně rozluštěných sladů.

Vystírají se buď do vody o teplotě 37°C s následující zapárkou na 52°C, nebo přímo při této teplotě. První hustý rmut se spouští do rmutovací pánve a ohřívá s gradientem 1°C/min na teplotu 63°C, kde se zařazuje dle enzymatické aktivity sladu 10-20minutová prodleva. Následně se rmut zvolna vyhřeje (gradient 0,7°C/min) na teplotu 72-74°C, při které obvykle během 5-10 minut dokonale zcukří. Po zcukření se rmut co nejrychleji (gradient 1,5°C/min) uvede do varu a vaří se 15-20 min. Pomalým vracením povařeného rmutu do vystírací pánve při rychlém chodu míchadla se dosáhne v celém objemu pánve nižší cukrovarné teploty 62-64°C. Druhý, rovněž hustý rmut se zcukří při 72-74°C a povaří 15 min. Po jeho vrácení se dosáhne odrmutovací teploty 75-78°C. Pro podporu pěnivosti je možno snížit objem druhého rmutu tak, aby po jeho vrácení teplota vzrostla pouze na 70-71°C, při které se zařadí prodleva 20-30 min. Následně se parním ohřevem dílo dohřeje na odrmutovací teplotu.

Při zpracování vysoce rozluštěných sladů je pro zachování pěnovosti a plnosti chuti piva vhodnější zvolit buď jednormutový postup, nebo zkrácený dvourmutový postup, při kterém se vystírá při 60-62°C, a dvěma malými, hustými, krátce povařenými rmuty se teplota zvýší na 70-71°C a dále na 75-78°C. Podmínkou tohoto postupu je vhodné umístění topných zón rmutovací pánve (Kosař a kol, 2000).

### 3.5.2.3 Třírmutový postup

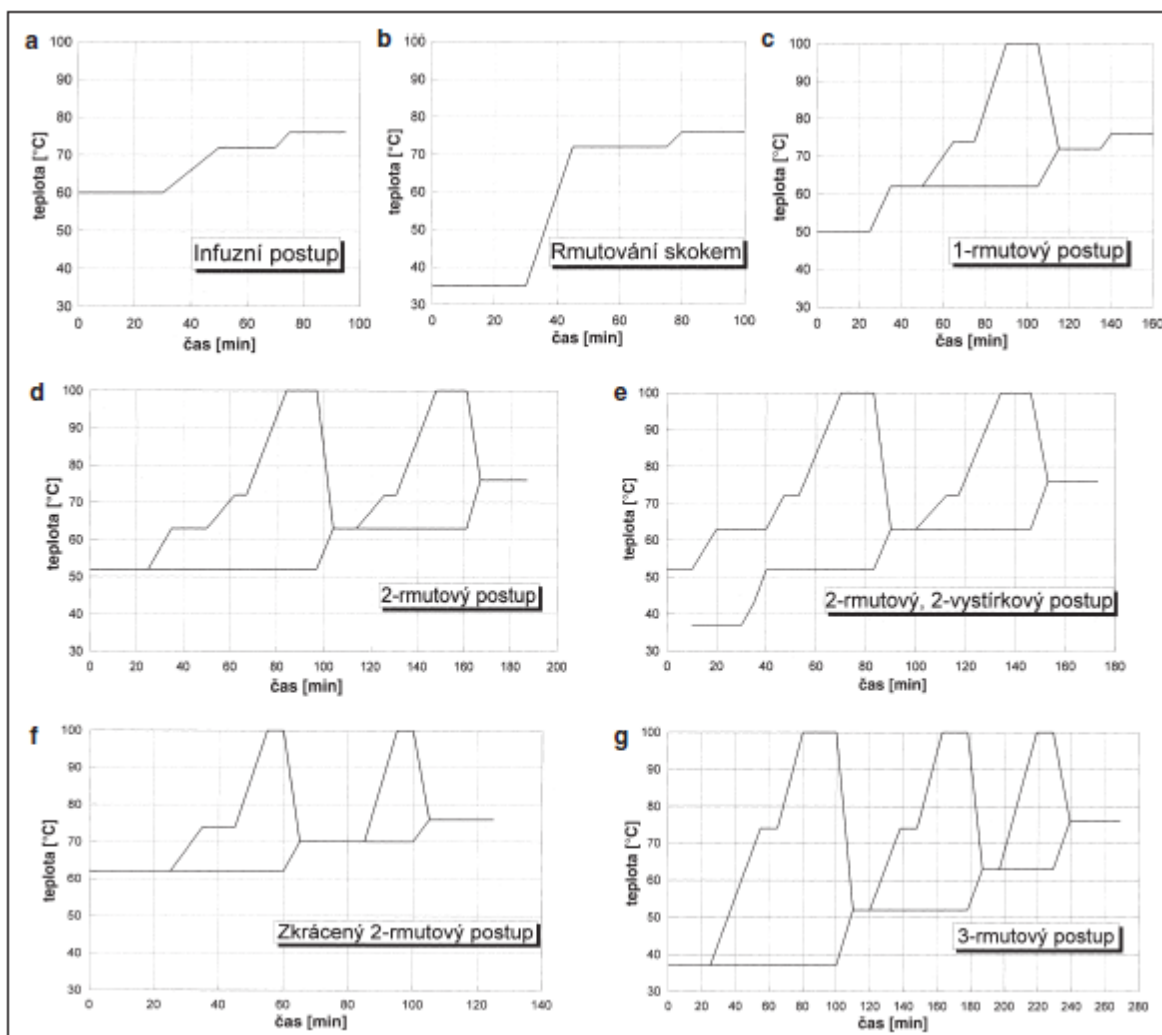
Třírmutový postup je klasickým postupem dekokčního rmutování. Vzhledem k pozvolnému zvyšování teploty a délce rmutování je možno s dobrým výsledkem zpracovat i hrubý šrot a hůře rozluštěné slady. Jeho nevýhodou je zdlouhavost a vysoká energetická náročnost. Při současné tendenci k dobře rozluštěným až přelučštěným sladům se proto používá jen zřídka, spíše u tmavých speciálních piv, kde je vyžadována výraznější sladová chuť.

Vystírá se obvykle při 37°C, odtahuje se první hustý rmut, po jehož vrácení vzroste teplota díla na 50-63°C. Rovněž druhý rmut je hustý a po jeho vrácení stoupne teplota na 62-65°C. Třetí rmut je již řídký, tzv. jalový, a vzhledem k nízkému podílu nezucukřeného škrobu se může v pánvi zahřívat rychleji a jen krátce (cca 10 min) povařit. Po jeho přečerpání do vystírací pánve se dosahuje odrmutovací teploty 75-78°C (Kosař a kol, 2000).

### **3.5.3 Srovnání rmutovacích postupů**

Vlastnosti hotového piva jsou výrazně ovlivněny rmutovacím procesem, a proto je pro udržení charakteru každého piva nutné zachovávat tradiční postup. Ačkoli je při rozdílných technologických postupech možno dosáhnout podobných analytických výsledků, je zřejmé, že výsledné působení jednotlivých složek piva zásadně ovlivní výsledek při degustaci. Zejména u českých piv, vyráběných dekokčním postupem, která mají vysokou pitelnost, může mít změna varního postupu fatální následky (Enge a kol., 2005).





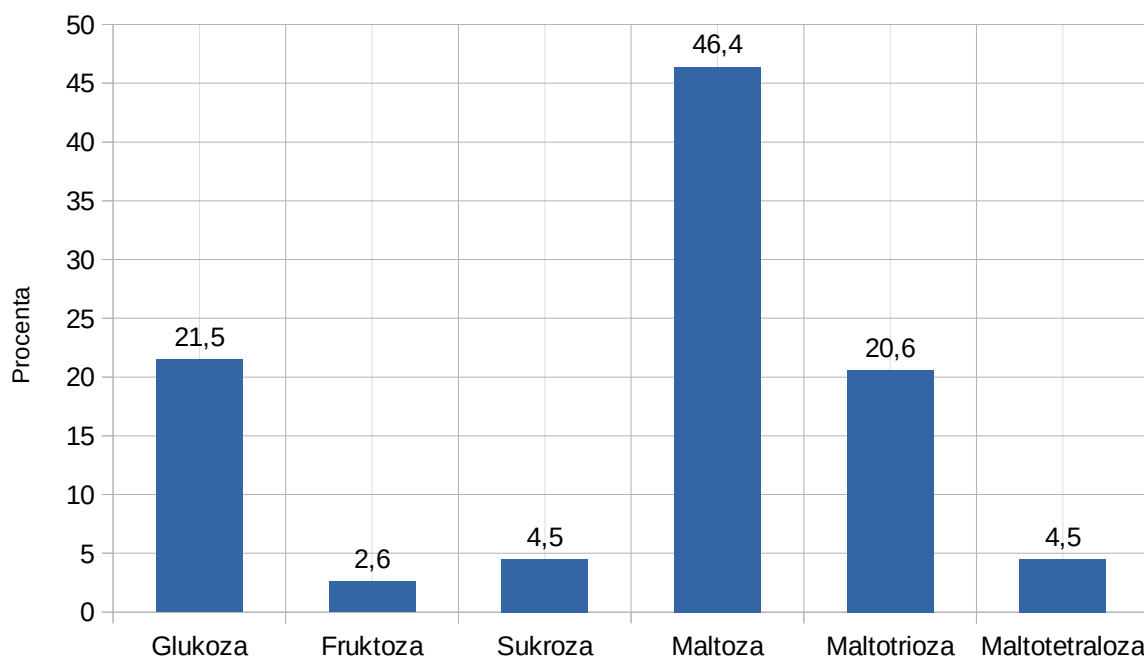
Obrázek 2 Srovnání rmutovacích postupů (Kosař a kol., 2000)

### 3.6 Kvalitativně významné látky ve sladinně

Sladina je viskózní, sladká, hustá, lepkavá a více či méně barevná kapalina. Její složení je velmi složité (pravděpodobně je přítomno tisíce složek). Žádná mladina nebyla nikdy kompletně analyzována. Mezi přítomné látky patří jednoduché cukry, dextriny, glukany, pentosany, fosfáty, rozpuštěné anorganické ionty, proteiny, peptidy a aminokyseliny, nukleové kyseliny, lipidy, růstové faktory, vitamíny, organické kyseliny, báze a fenolické látky. Typická sladina se skládá z asi 90 až 92% sacharidů, 4 až 5% dusíkaté látky a 1,5 – 2% popelovin. Z hlediska kvality a aromatu výsledného piva jsou nejdůležitějšími látkami sacharidy, dusíkaté látky a polyfenoly (Briggs, 1998).

### 3.6.1 Sacharidy

Sladina obsahuje komplexní směs sacharidů pohybující se kolem 90% obsahu. Mezi nejvýznamnější a nejvíce zastoupené patří monosacharidy glukóza a fruktóza, disacharidy sacharoza a malzóza, trisacharid maltotrióza a dextriny. Dále také obsahuje polysacharidy jako například cellobiosa a laminariboza. Ostatní sacharidy jsou z hlediska kvality výsledného piva nedůležité nebo jsou zastoupeny v nevýznamném množství (Boulton a kol., 2001).



**Tabulka 3** Průměrné složení 15ti sladín (Gjertsen, 1953)

Zkvasitelné sacharidy jsou hlavním zdrojem energie kvasinek, které se přemění na alkohol a oxid uhličitý jako hlavní metabolické produkty a tedy nejvýznamněji přispívají ke kvalitě výsledného produktu (Evans a kol. 2002).

Maltóza je nejhojnější cukru v mladině a je zcela fermentovaná kvasnicemi. Monosacharidy jsou fermentované nejrychleji, zatímco například maltotrióza pomalu a někdy neúplně, takže stopy mohou zůstat v pivu, což významně přispívá ke specifickým organoleptickým vlastnostem piva (Stewart, 2006).

Dextriny, pentosany a beta-glukany nejsou fermentovatelné, během vaření dochází k jejich redukci, ale dostávají se až do piva, kde významně přispívají k plnosti těla, pocitu v ústech a pitelnosti (Susan a kol., 1993).

Profil sacharidů závisí především na použitých surovinách (ječný slad nebo jeho náhražky) a také na rmutovacím postupu přípravy mladiny (Boulton a kol., 2001).

### 3.6.2 Dusíkaté látky

Ve sladince byly detekovány tisíce proteinů. Z pivovarského hlediska je obvykle nejvhodnější je dělit do skupin definovaných specifickou vlastností. Některé skupiny proteinů mají enzymatické schopnosti, váží se na jednotlivé cukry, na tuky, podílejí se na tvorbě pěny nebo jsou zapojeny do vazby na polyfenoly atp. (Briggs, 1992).

Dusíkaté sloučeniny dostupné pro fermentaci kvasinkami představují celkový obsah aminokyselin, amoniových iontů a peptidů. Relativní hodnoty těchto komponent závisí na vstupních surovinách a rmutovacím postupu. Nezáleží pouze na celkovém obsahu dusíkatých látek, ale i na zastoupení jednotlivých aminokyselin, které hrají důležitou roli při výživě kvasinek a tím významně přispívají ke složení piva, jeho aromatu a chuti (Lei a kol., 2013).

Proteiny a polypeptidy, které přečkají až do finálního piva, přispívají k plnosti chuti a vlastnostem pěny. Barva piva je ovlivněna přes Maillardovy reakce mezi cukry a amino-sloučeninami (včetně aminokyselin) během chmelovaru, který dá vzniknout barevným a chuťovým látkám. Proporce chuťových látek vyrobených kvasinkami jsou závislé na dusíkatých látkách. Obsah dusíkatých látek celkově přispívá k dobrému růstu a působení kvasinek (Briggs, 1992).

Vhodné je použít celkové množství rozpustného dusíku, které závisí na druhu sladu a typu rmutování. Velká část volného rozpustného dusíku je tvořena působením enzymů v průběhu rmutování. Směs enzymů sladu podílející se na hydrolytické rozložení bílkovin je velice komplexní (Lei a kol., 2013).

### 3.6.3 Polyfenoly

Slad obsahuje komplexní směs fenolů a polyfenolů. Sladové polyfenoly jsou částečně rozpuštěny a částečně zničeny během rmutování. Povaha fenolického materiálu v mladince je silně ovlivněna dostupností kyslíku při rmutování a procesem rmutování. Čím déle probíhá rmutování, tím více polyfenolů se do piva uvolní. Všechny fenoly se podílí na tvorbě chuti výsledného piva a to jak pozitivně, tak i negativně. Pozitivně se projevují na stabilitě chuti piva, svými antioxidačními a bakterie-inhibujícími vlastnostmi. Negativně se mohou projevit při reakcích s proteiny a vzniku zákalu piva nebo nežádoucí fenolickou pachutí (Whittle a kol., 1999).

### 3.7 Ekonomické aspekty výroby piva

Fixní náklady v pivovarech se týkají pracovní síly, inženýrských sítí, opravy a odpisy a další náklady, jako jsou sazeby a dalších místních daní. Variabilní náklady se vztahují k efektivitě při využívání materiálů a ztrát produktu vzniklých v průběhu zpracování.

Příprava mladiny při výrobě piva se může podílet na nákladech na výrobu až 30% v závislosti na pivovaru a použitých technologiích. Čím účinnější proces rmutování je zvolen, tím větší budou finanční a časové úspory na výrobu. Z finančního hlediska jde o vytěžení co největšího množství extraktu ze sladu za co nejkratší čas s vynaložením co nejméně energie při zachování stejné kvality piva (Malone, 2001).

### 3.8 Nukleární magnetická rezonance v analýze potravin

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je fyzikálním fenoménem, při kterém atomová jádra absorbují a zpětně emitují elektromagnetické záření. Tato energie je specifikována rezonanční frekvencí, která závisí na síle magnetického pole a magnetických vlastnostech isotopů. Všechny isotopy, které obsahují rozdílný počet protonů a neutronů mají nenulový spin ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), kdežto atomová jádra obsahující stejný počet protonů a neutronů mají spin nulový ( $^{18}\text{O}$ ). Jsou to právě přechody mezi nenulovými nukleárními spiny, které umožňují pozorování NMR absorpčního spektra (Rabi a kol., 1938).

NMR je uznávána jako jedna z hlavních analytických metod (Mannina a kol., 2012). Umožňuje rychlou a neinvazivní charakterizaci látek obsažených v potravinách s potenciálem poskytnout informace o velmi širokém spektru metabolitů a to s minimálními nároky na přípravu vzorků. V analýze potravin poskytuje relevantní výsledky v otázkách původu, variační rozdílnosti a kvality potravin (Duarte a kol., 2002).

Síla této metody tkví v kapacitě - možnost podívat se na komplexní soubor látek obsažených ve zkoumaném vzorku pomocí jedné analýzy, která po aplikaci chemometrických metod může identifikovat důležité spojitosti.

Další výhodou je, že tato metoda neupřednostňuje určité skupiny látek. Je také velmi nápomocná při zkoumání sekundárních metabolitů. Identifikace molekul je možná přímo ze spekter nebo za použití databází standardů látek. Umožňuje také klasifikaci potravin na základě jejich finger-printu bez nutnosti podrobné identifikace látek. Dále je možné postihnout problematiku falšování potravin - původ potravin a jejich složek, použití jiných

než deklarovaných látek, obsah látek, způsob zpracování nebo nahrazení jedné ze složek její levnější variantou.

Naproti tomu jsou  $^1\text{H}$  NMR spektra potravin nevyhnutelně překryta kvůli přítomnosti množství látek. Přesto je identifikace těchto látek klíčovým bodem analýzy, která je umožněna využitím 2D experimentů, selektivních 1D experimentů nebo knihovny spekter.

Senzitivita je jedním z hlavních limitujících faktorů této analýzy, i když se pravidelně zvyšuje. I přesto, že NMR analýza není schopna detekovat všechny minoritní látky, poskytuje NMR spektrum jasný obraz o obsahu majoritních látek zkoumaného vzorku (Mannina a kol., 2012).

NMR je nástrojem ke kvalitativní i kvantitativní analýze potravinářských výrobků a v poslední době bylo využito například k analýze vína, kávy, olejů nebo rajčat. NMR analýza je ideálním nástrojem ke zhodnocení obsahu látek v pivu jako například sacharidů, organických kyselin, aminokyselin nebo kontaminantů (DiCaprio a kol., 2014).

Pivo se skládá z více jak 100 komponent v různých koncentracích v řádech od setin po jednotky procent. Kromě vody a etanolu, sacharidy jsou hlavním komponentem. Další důležité látky zahrnují proteiny, organické kyseliny, aminokyseliny, komponenty chmele a soli. Koncentrace aminokyselin a organických kyselin může sloužit jako indikátor výkonnosti kvašení. Volné aminokyseliny ve sladidně jsou metabolizovány kvasnicemi v průběhu kvašení a účastní se biosyntetických pochodů, které vedou k tvorbě důležitých chuťových složek, jako například vyšších alkoholů, esterů a sirných komponent. Sladina obsahuje aminokyseliny a organické kyseliny pocházejí ze sladu. Profil aminokyselin je tedy obrazem použitého sladu ve sladidně a sladu v kombinaci s metabolismem kvasnic v hotovém pivu (Nord a kol., 2004).

V pivovarnictví byla analýza pomocí NMR aplikována na specifické problémy, jako například identifikace a kvantifikace sladů a chmelů, polyfenolů, aminokyselin nebo složení sladiny (Lachenmeier a kol., 2005).

## 4 Metodika práce

Za účelem experimentální části práce byla uvařena dvě piva metodou jedno a dvou rmutovou pro analytickou a senzorickou analýzu. Zvolený postup i suroviny odpovídaly výrobě českého ležáku. Cílem zvolené metodiky bylo dosáhnout naprosto stejného výrobního procesu za použití totožných vstupních surovin u obou vzorků s rozdílem druhého rmutu. Každá varianta byla vyrobena ve třech opakováních - celkem bylo provedeno 6 jednotlivých várek – 3 jednormutové a 3 dvourmutové. Výsledkem byly tedy 3x3 sladiny, které byly podrobeny analýze.

Z důvodu omezené skladovací kapacity a velikosti ležáckých tanků bylo nutné sladiny před chmelovarem pro každý postup smísit. Ve výsledku jsme tedy měli dvě piva vyrobená odlišným dekokčním rmutováním, která jsme následně srovnávali s podobnými pivy z produkce českých minipivovarů i průmyslové produkce, ale i několika vzorky vyrobených infuzní metodou a kvašených svrchně (Ale).

Pro zpřehlednění jsou postupy značeny jako postup A (jednormutový) se rmutem R a postup B (dvourmutový) s rmuty 1R a 2R.

### 4.1 Suroviny použité na výrobu

#### 4.1.1 Slad

Na výrobu experimentálních várek piva bylo využito běžně dostupného Plzeňského sladu, který je základem pro většinu piv vyráběných v ČR a jehož podíl většinou neklesá pod 50%, vyjma některých speciálních piv (Kosař a kol, 2000). Zakoupen byl ve sladovně Klusáček s.r.o. v balení 50kg. Na každou jednotlivou várku bylo použito 4 kg sladu, celkem tedy 12 kg pro každý postup.

#### 4.1.2 Voda

Voda byla využita studniční, která je svým nízkým obsahem minerálních látek velmi vhodná pro spodně kvašené ležáky plzeňského typu. Na vystírku bylo použito 13,3l vody na každou jednotlivou várku, celkem tedy 40l vystírací vody pro každý postup.

### 4.1.3 Chmele

Pro chmelení byly vybrány dvě odrůdy českého chmele - Premiant a Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), které jsou nejběžněji využívané chmele na našem území. Chmele byly zakoupeny od firmy Brelex s.r.o. v granulované formě, zabalené do inertního obalu po 50g. Premiant byl vybrán z důvodu vysokého obsahu alfa-hořkých kyselin na první chmelení, pro dodání hořké chuti, v množství 80g. Naopak ŽPC byl vybrán pro svůj vysoký obsah aromatických látek pro druhé a třetí chmelení v množství 80 gramů pro každé.

### 4.1.4 Kvasnice

Kvasnice byly vybrány od firmy Saflager kmene W-34/70 (*Saccharomyces cerevisiae*). Vyznačují se středním stupněm prokvašení, neutrálním aromatem a vysokou sedimentací. Jedná se o známý a velmi oblíbený kmen kvasnic spodní fermentace, pocházející z institutu Weihenstephan v Německu. Díky svým technologickým vlastnostem se stal kmenem průmyslovým a dnes se používá na výrobu pív typu Lager na celém světě. Nachází použití nejenom u malých pivovarů, ale také u velkých pivovarů na celém světě. Doporučená teplota kvašení je 9 – 15°C.

Kvasnice byly zakoupeny od firmy Brelex s.r.o., v sušené podobě v inertním obalu o hmotnosti 500g. Kvasnice byly před použitím rehydratovány dle návodu výrobce.

## 4.2 Varní proces

Vaření probíhalo na mikropivovaru o objemu 100 l s plynovým ohřevem. Díky jednoduchému ovládání lze dosáhnout stejných podmínek při výrobě. Na tomto pivovaru lze simulovat výrobu piva na větších zařízeních. Pivovar se skládal z více nádob - vystírací, scezovací, dvě rmutovací a jedna mladinová pánev. To umožnilo rychlé provedení pokusu. Sladina byla shromážděna v mladinové pánvi, kde byl po dosažení požadovaného objemu proveden chmelovar – celkem 60l pro každý postup.

Technologický postup, technika i vstupní suroviny byly pro všechny vzorky stejné. Rozdíl byl pouze ve druhém rmutu.

#### 4.2.1 Šrotování, vystírka a rmutování

Slad byl našrotován na elektrickém mlýnu vždy těsně před každou vystírkou. Vystírka byla zvolena řidší, o poměru 3.3l vody na 1kg sladu. Slad se smísil s vodou o teplotě 45°C a následně byla zařazena prodleva 10 minut.

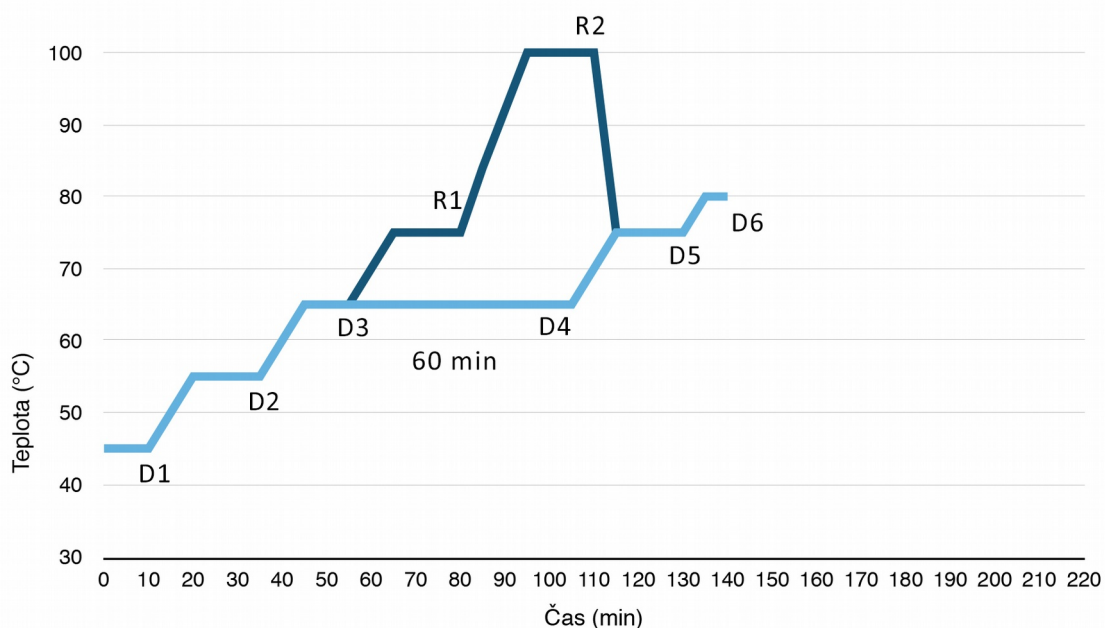
Následovalo přečerpání do rmutovací pánve, kde se proces lišil podle zvoleného postupu. Ve rmutovací pánvi docházelo ke stálému míchání automatickým míchadlem. Odpočívací přestávky byly stanoveny na 15 min pro všechny teploty u každého postupu z důvodu dosažení co nejpodobnějších podmínek.

##### 4.2.1.1 Postup A (jedno rmutový)

Dílo bylo ohřáto na teplotu 53°C a zařazena prodleva 15 minut. Následovalo ohřátí díla na teplotu 63°C a zařazena prodleva 15 min. Poté se odebrala 1/3 díla - rmut.

Rmut byl ohřát na teplotu 73°C, kde byl ponechán 15 min a následně přiveden k varu, který trval opět 15 min. Po povaření byl rmut vrácen k odpočívajícímu dílu.

Teplota díla stoupla na 73°C a byla zařazena prodleva 15 minut. Poté bylo dílo ohřáto na odrmutovací teplotu 78°C a přečerpáno do scezovací kádě.



**Graf 1** Průběh postupu A s vyznačeným odběrem vzorků.



#### 4.2.1.2 Postup B (dvou rmutový)

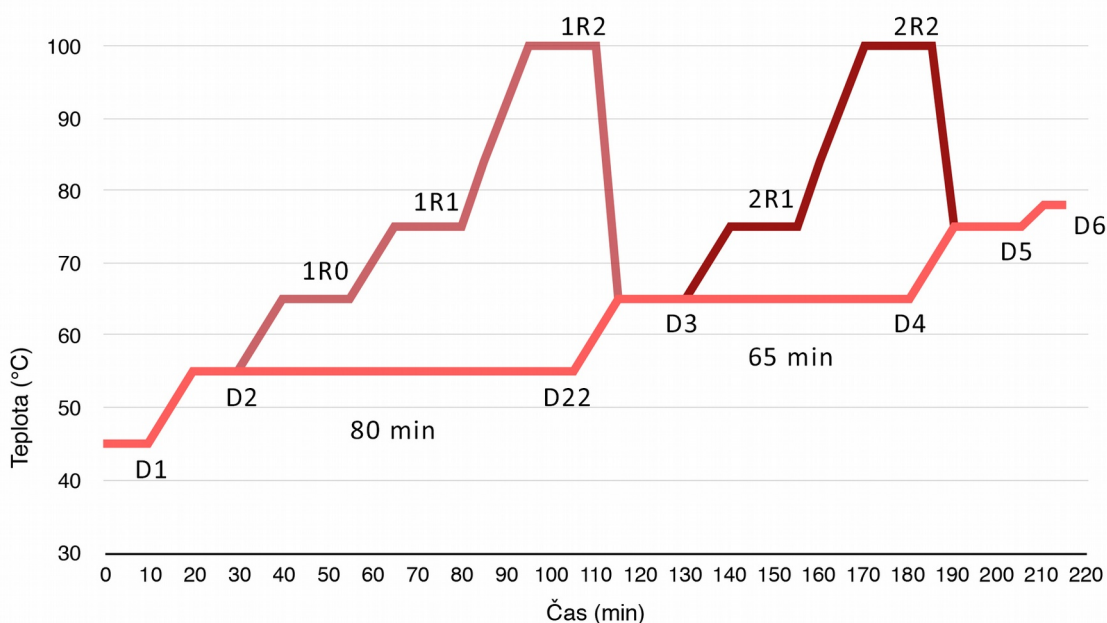
Dílo bylo ohřáto na teplotu 53°C a zařazena prodleva 15 minut. Následovalo odebrání 1/3 díla - první rmut.

První rmut byl ohřát na teplotu 63°C s prodlevou 15 min, další ohřátí na 73°C s prodlevou 15 min a nakonec povaření po dobu 15 minut. Následně byl rmut vrácen k odpočívajícímu dílu.

Teplota díla stoupla na 63°C, následovala prodleva 15 min a poté odebrání 1/3 díla - druhý rmut.

Druhý rmut byl ohřát na teplotu 73°C s prodlevou 15 min a poté povařen po dobu 15 minut. Následně byl rmut vrácen k odpočívajícímu dílu.

Teplota díla stoupla na 73°C a byla zařazena prodleva 15 minut. Poté bylo dílo ohřáto na odrmutovací teplotu 78°C a přečerpáno do scezovací kádě.



**Graf 2** Průběh postupu B s vyznačeným odběrem vzorků.

#### 4.2.2 Vyslazování

Vyslazování probíhalo opět stejně pro oba postupy a to vodou o teplotě 78°C na objem 20l pro každou jednotlivou várku. Na konci vyslazování byla každá sladina změřena hustoměrem.

#### 4.2.3 Chmelovar a chlazení

Chmelovar byl 90ti minutový, s přidáním chmele v 90., 60. a 30. minutě v pořadí Premiant, ŽPČ, ŽPČ. Následovalo zchlazení na zákvasnou teplotu (12°C) pomocí deskového chladiče a přečerpání do spilky.

#### 4.2.4 Kvašení, stáčení a ležení

Kvašení probíhalo v otevřené kvasné kádi, deka byla pravidelně sbírána. Hlavní kvašení trvalo 5 dní, poté byl tank zahražen po dobu dvou dnů a následovalo stočení do 11 plastových lahví. Většina kvasnic sedimentovala a nebyla stočena. Lahve byly uloženy do ležáckého sklepa s teplotou 2°C po dobu tří týdnů.

### 4.3 Analytické hodnocení obsahu látek

Při analýze byl zjišťován obsah sacharidů vztažených na maltózu a spektra aromatickým a alifatických aminokyselin.

Pro analytické hodnocení vzorku byla zvolena spektroskopická metoda nukleární magnetické rezonance (NMR).

<sup>1</sup>H NMR spektra byla získána na systému TopSpin s Bruker Avance III HDX 500MHz NMR Spectrometer vybaveného sondou SmartProbe za použití módu WATERSUPP při teplotě 25°C.

Sledované látky byly identifikovány pomocí knihovny spekter předešlých testů jednotlivých sacharidů, aminokyselin a organických kyselin na tomto přístroji dle odborné literatury.

#### 4.3.1 Odběr a příprava vzorků

Odběr vzorků byl proveden dle grafu č. 1 a 2. Celkem bylo odebráno 60 vzorků sladin. Vzorky byly odebrány do 10ml plastových zkumavek a ihned poté zamrazeny a transportovány do laboratoře. Vzorky byly postupně rozmrazovány a připravovány k analýze. Nejdříve byly homogenizovány za pomoci třepačky, poté bylo odpipetováno 2 ml suspenze do 2 ml kyvet a centrifugováno 5 minut při 5000 rpm. Supernatant byl zfiltrován pomocí jednorázového stříkačkového filtru. 400 ml filtrátu bylo odpipetováno do 5mm NMR kyvety a přidáno 400 ml D<sub>2</sub>O s 0,01% TSP.

Odběr a příprava vzorků pív probíhal obdobně jako u sladiny, kromě mražení. Vzorky piva však bylo nutné nejdříve odplynit pomocí sonifikace. Odběr byl proveden z lahevového piva, aby bylo dosaženo co největší podobnosti.

Vzorky pív byly vybrány tak, aby se svým stylem i vstupními surovinami co nejvíce podobaly našim vzorkům. Bylo vybráno pět ležáků z produkce českých mini pivovarů, tři ležáky z českých průmyslových pivovarů a pro odlišení tři vzorky pív typu Ale také z české produkce.

#### **4.4 Senzorická analýza**

Při senzorické analýze byly hodnoceny 2 vzorky námi vyrobeného piva postupem A a postupem B (výše popsáno).

Vzorky jsme testovali pomocí trojúhelníkové metody. Tento diskriminační test se používá v pivovarnictví k určení existence rozdílu u podobných vzorků bez zaměření na konkrétní odlišnosti (Masuoka a kol., 1995).

Panelu hodnotitelů bylo předkládáno námi vyrobené pivo v identické formě. Jako chuťový neutralizátor bylo použito bílé pečivo a čistá voda. Hodnotitelé měli určit, který ze tří vzorků je odlišný. Vzorky byly označeny třímístnými kódy a najednou předloženy hodnotitelům k ochutnávání zleva doprava. Panel byl složen z 35 školených hodnotitelů, 20 žen a 15 mužů. Všichni byli před provedením senzorického hodnocení seznámeni s průběhem analýzy, metodou hodnocení i s konkrétními vzorky.

#### **4.5 Výpočty a zpracování dat**

NMR spektra byla zpracována pomocí programu MestReNova. Bylo využito metod integrace identifikovaných signálů a analýzy hlavních komponent (Principal Component Analysis – PCA).

Dle Duarte a kol. (2002) byly potlačeny dva signály etanolu (1.18 a 3.65 ppm), aby byl eliminován rozdílný obsah alkoholu u vzorků pív. Potlačení bylo provedeno automaticky v programu MestReNova. Další silný signál vody, který se nacházel na 4.86 ppm byl potlačen pomocí zvoleného módu analýzy.

Oblast 3.2 – 5.5 ppm ukazuje silné signály sacharidů – cukrů, dextrinů. V oblasti 0.5 – 3.2 ppm nazvané také jako alifatická můžeme vidět slabší signály aminokyselin, organických sloučenin, mastných kyselin a vyšších alkoholů. Aromatická oblast 6.5 – 9 ppm obsahuje slabé signály vysokomolekulárních látek s aromatickým cyklem - aminokyselin, nukleosidů, aromatických alkoholů a fenolických sloučenin. (Nord a kol., 2004).

## 5 Výsledky

### 5.1 Měření hustoměrem

	Postup A	Postup B
1.	1050	1049
2.	1051	1049
3.	1050	1050
<b>Průměr</b>	1050,33	1049,33

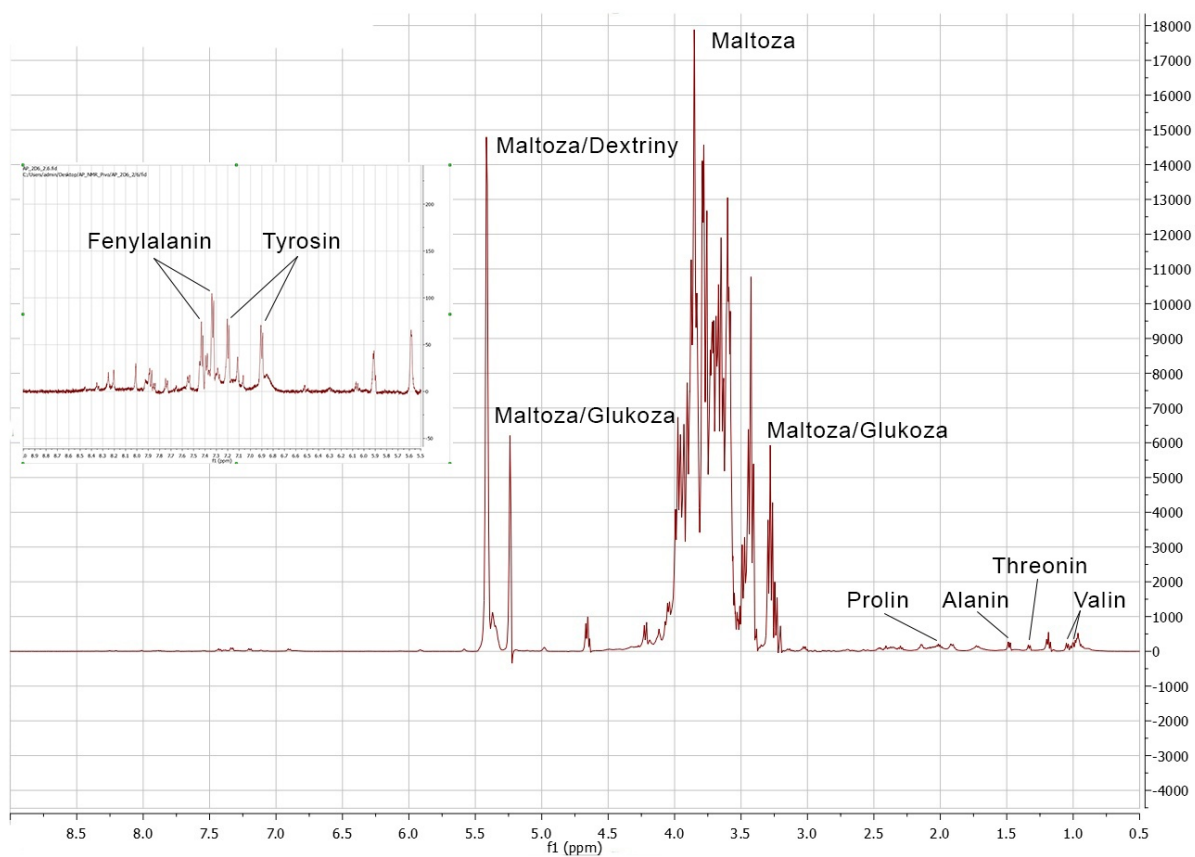
**Tabulka 1** Hustota výsledných sladin v kg/m<sup>3</sup>

Měření hustoměrem nevykazovala statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

### 5.2 Analýza vzorků sladin

Ve vzorcích sladin bylo zjišťováno relativní množství maltózy a součtu vybraných aminokyselin (alanin, valin, leucin, prolin, tyrosin, threonin, fenylalanin) pomocí integrace odpovídajících signálů na NMR spektru. Výsledky z každé jednotlivé várky byly zprůměrovány, přiřazeny k odpovídajícímu postupu a zaneseny do grafů pro srovnání vývoje látek.

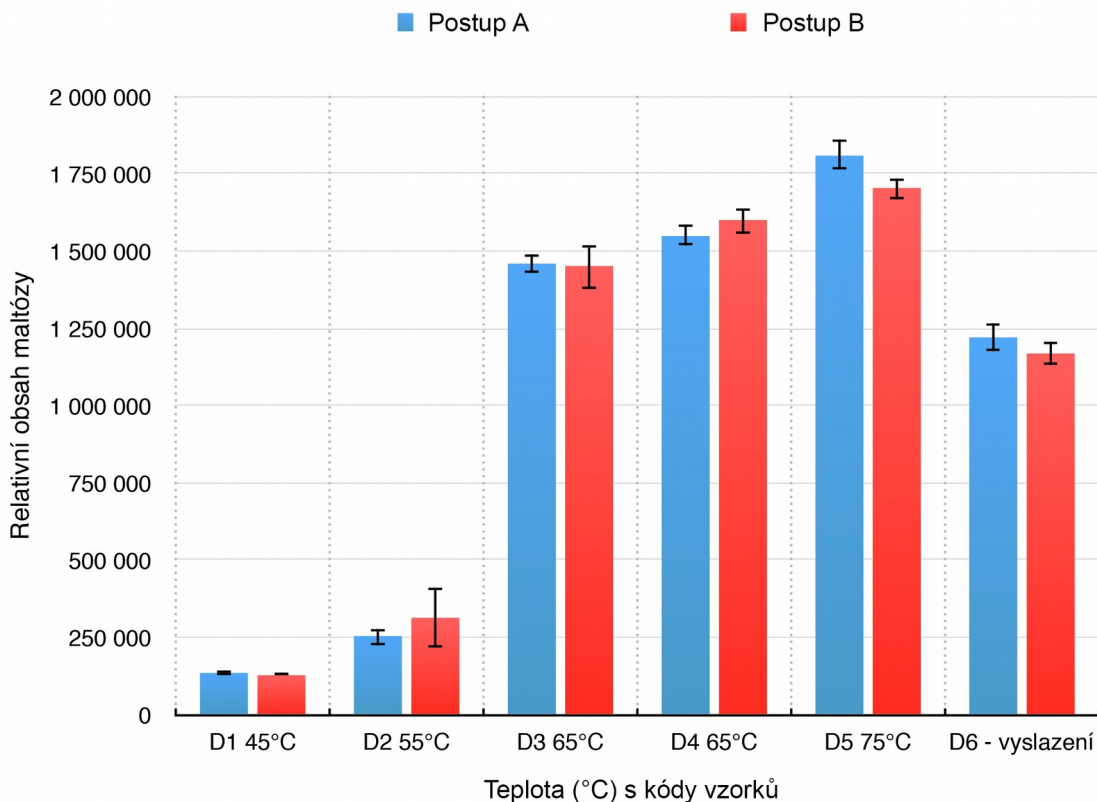
Integrace a PCA analýzy byly provedeny v programu MestReNova, statistické vyhodnocení v programu Statistica.



**Obrázek 1** Modelové NMR spektrum sladiny s výřezem aromatické oblasti a vyznačenými signály

Látka	Oblast (ppm)
Maltóza	5.435 – 5.405
Alanin	1.493 – 1.462
Valin	1.057 – 1.038 1.005 – 0.976
Leucin	0.974 – 0.946
Prolin	2.091 – 1.978
Threonin	1.344 – 1.320
Tyrosin	6.921 – 6.875 7.209 – 7.181
Fenylalanin	7.343 – 7.322 7.449 – 7.36

**Tabulka 2** Sledované látky a oblasti jejich integrací



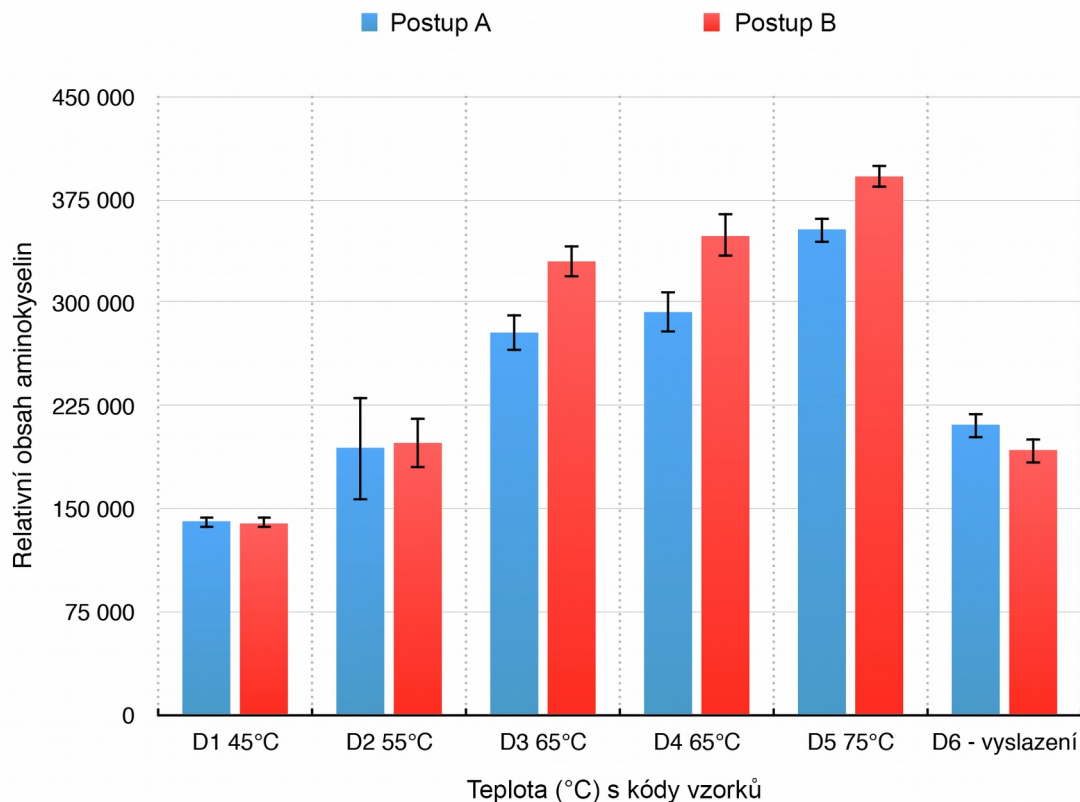
**Graf 1** Vývoj relativního množství maltózy v dílech postupů A a B na klíčových teplotách

U obou postupů je vývoj množství maltózy velmi podobný (Graf 1). Ke statisticky významné odchylce ( $p < 0,05$ ) došlo po přidání rmutu R do díla u postupu A (D5 75°C).

Nejpodstatnějšího nárůstu dosáhla maltóza při přechodu z teploty peptonizační (D2 55°C) na nižší cukrotrvornou teplotu (D3 65°C), kde působí beta-amyláza, jejímž hlavním produktem je právě maltóza. Nárůst činí 67% z maximálního obsahu a dosahuje hodnoty 85% z maximálního obsahu. Nárůst mezi ostatními teplotami činí v průměru 8%.

Přidání prvního rmutu 1R do díla u postupu B na nižší cukrotrvorné teplotě (D3 65°C) nevedlo k významnému nárůstu obsahu maltózy v porovnání s postupem A.

Tyto rozdíly se však značně vyrovnaly po scezení a vyslazení (D6). Rozdíl v absolutním obsahu maltózy po vyslazení (D6) byl vyšší u postupu A, čemuž odpovídají i měření hustoměrem, avšak nebyl statisticky významný.



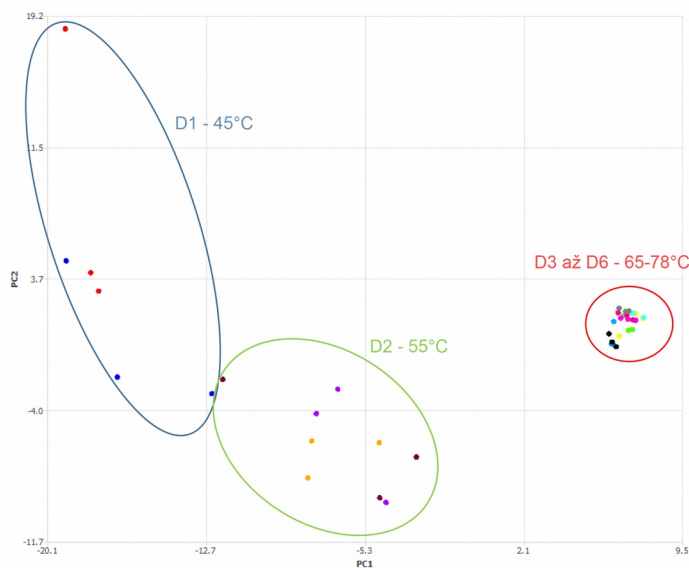
**Graf 2** Vývoj relativního množství aminokyselin v dílech na klíčových teplotách

Vývoj relativního množství si byl u všech aminokyselin velice podobný, lišilo se pouze celkové množství každé z nich, proto je tento graf dostatečně reprezentativní (Graf 2).

U postupu B dochází ke statisticky významnému nárůstu aminokyselin ( $p < 0,05$ ) od peptonizační teploty (D2 55°C) oproti postupu A. Dílo postupu B odpočívá na této teplotě o 60 minut déle a do sladiny se uvolní o 10% více aminokyselin než u postupu A. Tento rozdíl je statisticky významný až do odmrutování (D5 75°C).

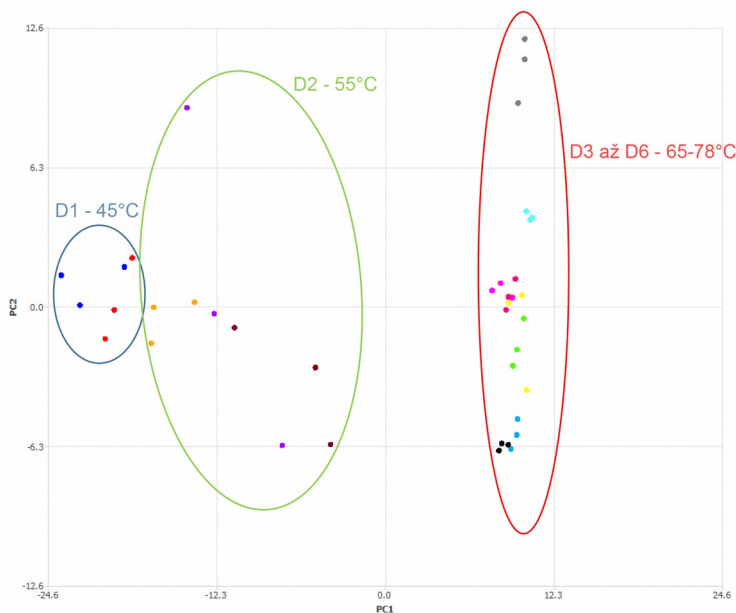
K nejvyššímu nárůstu dochází již při vystření (D1 45°C) a to o 38% z maximálního obsahu. Postup B poté dosahuje přírůstku 34% po přechodu na nižší cukrotvornou teplotu (D3 65°C), postup A v tomto případě zaostává o zmíněných 10%.

Nicméně po scezení a vyslazení (D6) opět došlo k vyrovnání obsahů u jednotlivých postupů. Podobně jako u maltózy byl i zde rozdíl v absolutních hodnotách ve prospěch postupu A, avšak opět statisticky nevýznamný. Největší odchylku zaznamenal obsah prolinu.



**Bodový diagram 1** – PCA - Díla oblast 10 – 0.5 ppm (celkové spektrum)

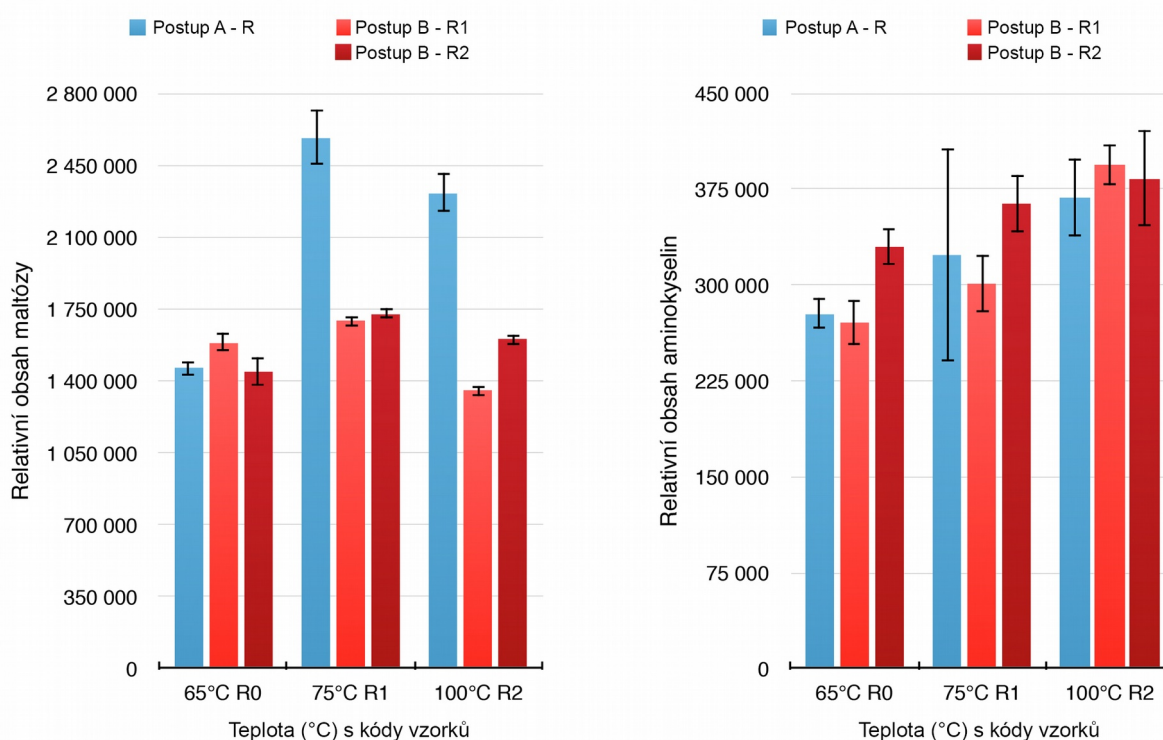
PCA analýza celkového NMR spektra děl ukázala jasné rozdělení po ohřátí na nižší cukrotvornou teplotu (D3 až D6 – 65-78°C), to bylo způsobeno především nárůstem obsahu sacharidů. Relativní rozdílnost D1 a D2 byla způsobena slabými signály v oblasti sacharidů. Došlo také ke značnému seskupení většiny vzorků D3 až D6, oblast sacharidů byla proto podrobena další PCA analýze.



**Bodový diagram 2** – PCA - Díla oblast 5.5 – 3.5 ppm (oblast sacharidů)



PCA Bodový diagram 2 ukazuje rozdělení v oblasti sacharidů. Došlo ke stejnému jevu jako v případě předchozího bodového diagramu. Vzorky děl D3 – D6 se však v této oblasti více rozdělili. Vzorky D5 se umístili v izolované oblasti v kladné části PC2 a také nejdále od sebe, to ukazuje na jejich relativní odlišnost v obsahu sacharidů, kterou jsme mohli vidět na Grafu 1, kde obsah maltózy dosáhl staticky významné odchylky. Naopak vzorky D6 se umístili na opačné straně s relativně malým rozestupem, což značí malou rozdílnost.



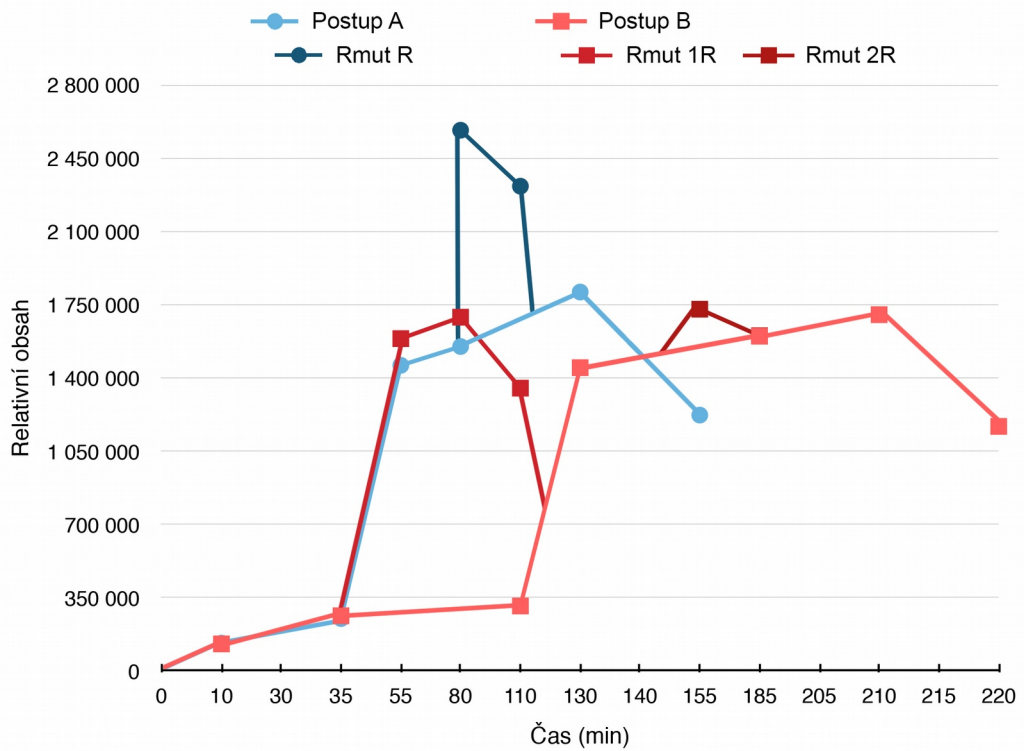
**Graf 3 a 4** Vývoj relativního množství maltózy a aminokyselin u rmutů na klíčových teplotách

Pozn.: Pro rmuty R a R2 byly použity vzorky D3 jako referenční namísto R0.

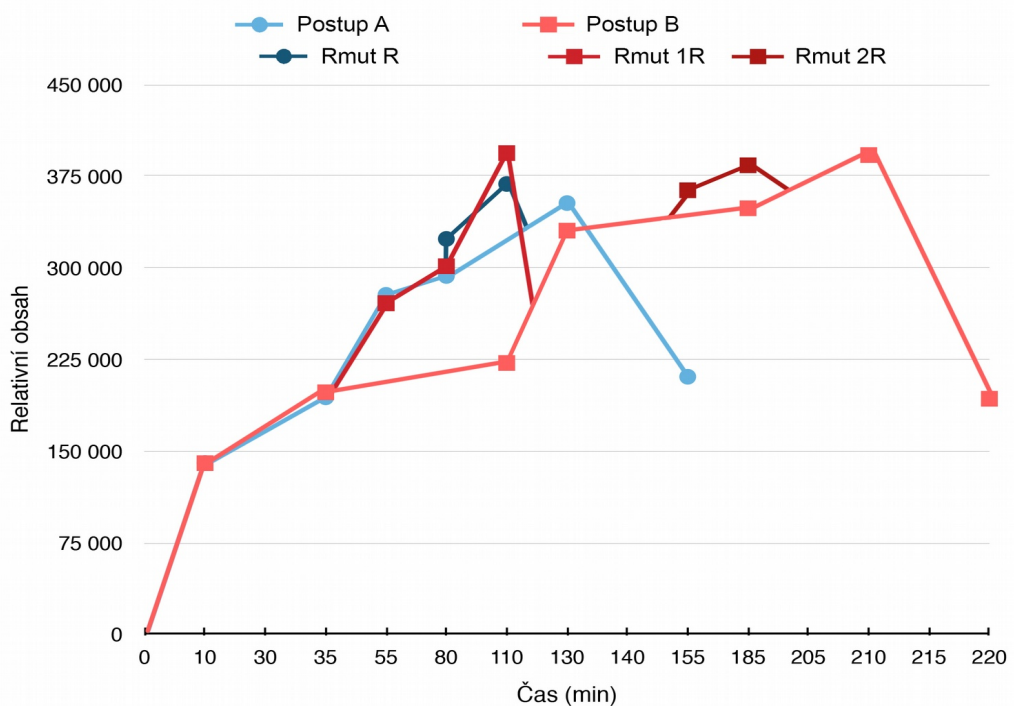
Analýza rmutů ukázala jasný nárůst obsahu maltózy u rmutu R oproti rmutům 1R a 2R (Graf 3). Tento úkaz vysvětluje statisticky významný rozdíl v obsahu maltózy u děl po přidání rmutu R k dílu postupu A (Graf 1). U všech rmutů došlo po povaření (100°C R2) k poklesu obsahu maltózy.

Relativní obsah aminokyselin rostl na všech teplotách (Graf 4). Statisticky významný rozdíl zaznamenal rmut 2R na prvních dvou teplotách (65°C R0 a 75°C R1).

PCA analýza rmutů nevedla k jejich jednoznačnému rozdělení (např. rmuty po povaření) a to ani v případě rmutu R. To ukazuje na jejich relativní shodnost.



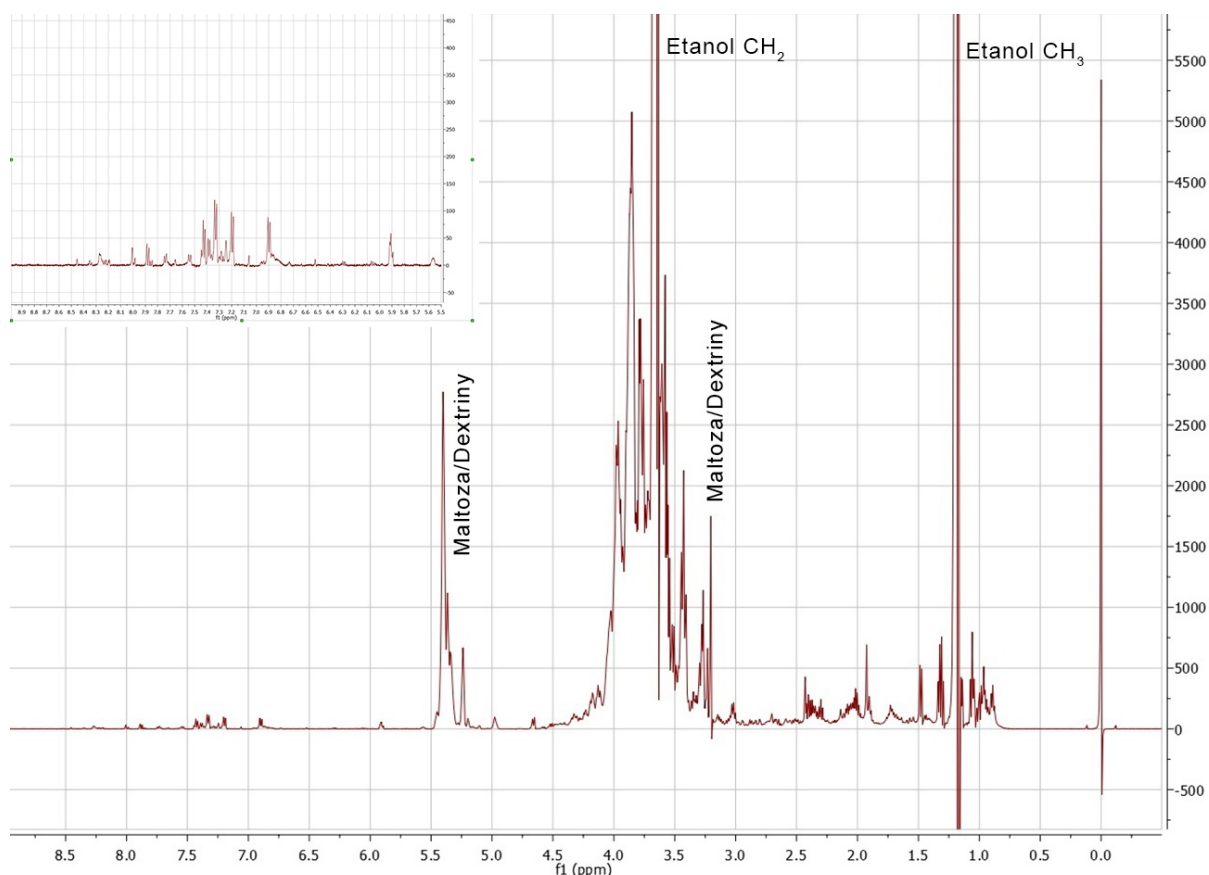
**Graf 5** Vývoj relativního obsahu maltózy obou postupů v čase



**Graf 6** Vývoj relativního obsahu aminokyselin obou postupů v čase

Grafy 5 a 6 byly vytvořeny pro lepší orientaci ve sledovaných procesech. Obsahují údaje z předešlých grafů zobrazené v čase, tím bohužel dochází k nutnému překrytí.

### 5.3 Analýza piva

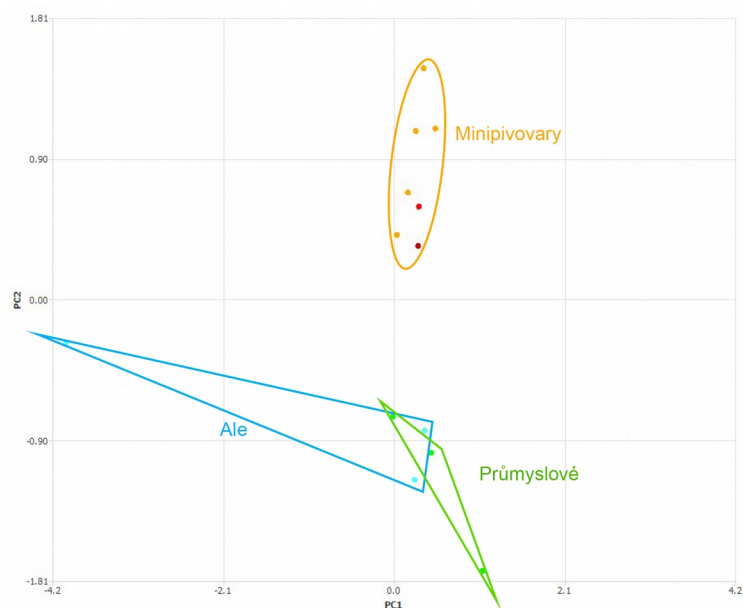


**Obrázek 2** Modelové NMR spektrum piva s vyznačenými signály a výsekem aromatické oblasti

Reprezentativní  $^1\text{H}$  NMR spektrum piva můžeme vidět na obrázku 2, nejsilnější signály se nacházejí na 1.18 a 3.65 ppm patřící etanolu byly pro analýzu potlačeny.

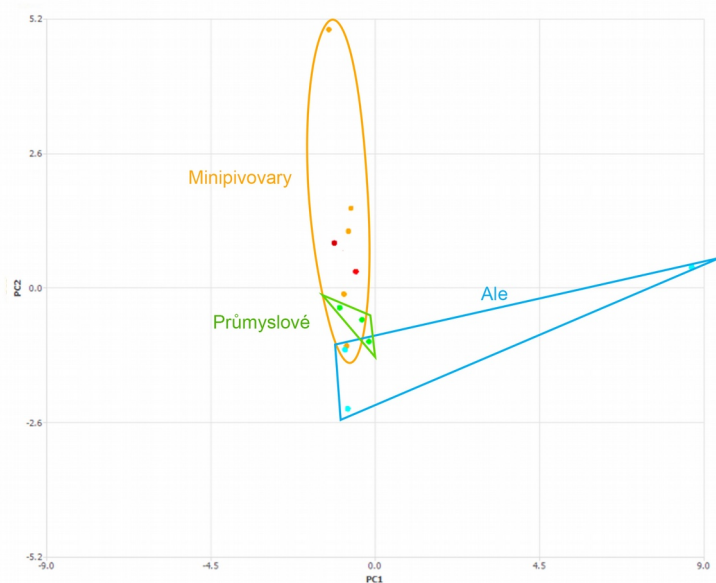
Všechna spektra byla normalizována dle referenčního signálu na 0.0 ppm (TSP). Žádné ze spekter nevykazovalo posun signálů.

Spektra byla rozdělena podle původu vzorků. Oranžové náleží minipivovarům, zelené průmyslovým pivovarům a modré náleží pivům typu Ale. V každém diagramu je toto rozdělení znázorněno.



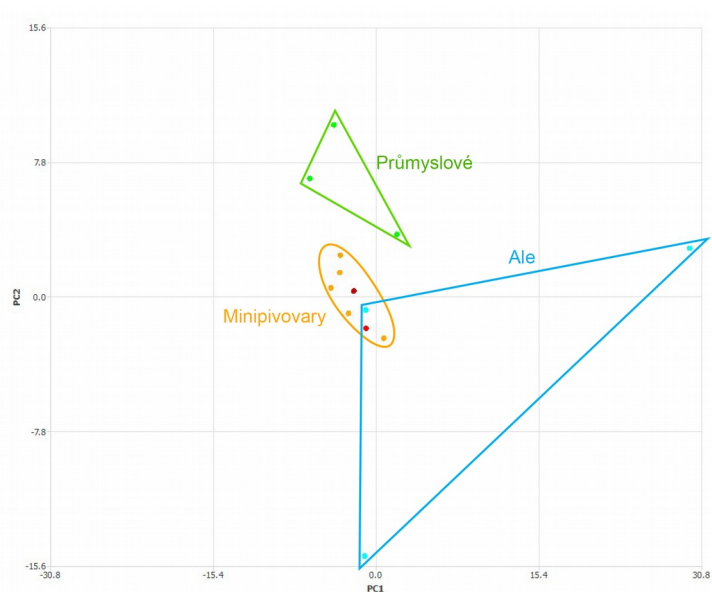
**Bodový diagram 3** – PCA Piva oblast 9 – 0.5 ppm (celkové spektrum)

PCA analýza celkového NMR spektra vzorků piv vedla k rozdělení vzorků z minipivovarů a průmyslové produkce, ke které se připojily i piva typu Ale. Největší vliv na rozdělení měla oblast silných signálů sacharidů (5.5 – 3.2 ppm).



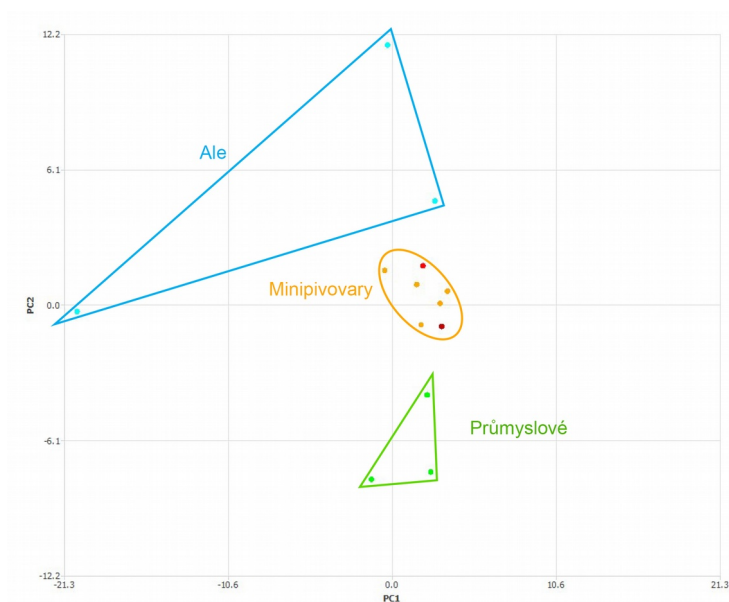
**Bodový diagram 4** – PCA Piva oblast 3.5 – 0.5 ppm (alifatická oblast)

PCA analýza alifatické oblasti nevedla k významnému rozdělení. Většina vzorků se seskupila kolem středu diagramu s rozdělením dle PC2 s odchylkou jednoho vzorku z minipivovaru.



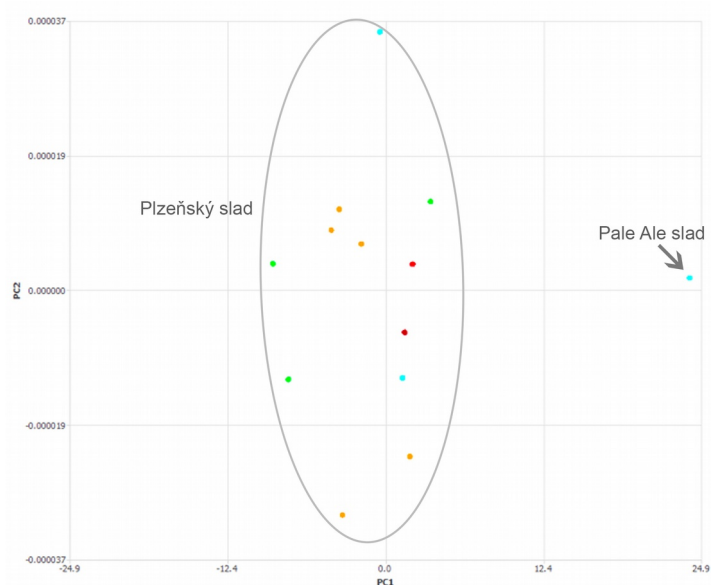
**Bodový diagram 5** – PCA Piva oblast 9 – 6.5 ppm (aromatická oblast)

PCA analýza aromatické oblasti vedla k oddělení průmyslových piv a piv z minipivovarů. Vzorky piva typu Ale vykazovaly největší odlišnost, přesto se jeden z těchto vzorků připojil do oblasti minipivovarů. Poloha skupin piv z průmyslových pivovarů a piv typu Ale je protilehlá.



**Bodový diagram 6** – PCA Piva oblast 9 – 8.1 ppm (část aromatické oblasti)

PCA analýza části aromatické oblasti vedla k jasnému oddělení jednotlivých skupin, největší odchylky dosáhla piva typu Ale. V této oblasti vykazují NMR spektra viditelně největší rozdílnost, bohužel síla signálů je velmi malá.



**Bodový diagram 7** – PCA Piva oblast 7.6 – 6.7 ppm (část aromatické oblasti)

Bodový diagram 6 ukazuje rozdělení piv podle druhu sladu. Rozdělení v ose PC2 je minimální oproti rozdělení v ose PC1.

## 5.4 Senzorická analýza

Dle Xu a kol. (2014) je pro vyhodnocení nutné stanovit hypotézy:

H0: Mezi vzorky není statisticky významný rozdíl

H1: Mezi vzorky je statisticky významný rozdíl

Na hladině významnosti 0,05

Z počtu 35 odpovědí bylo 8 správných, tedy 8 hodnotitelů určilo odlišný vzorek. Mezi vzorky tedy není statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

## 6 Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo najít rozdíl mezi jedno (postup A) a dvourmutovým (postup B) dekokčním postupem při výrobě piva. Z historického hlediska je postup B v Čechách tradičním pro výrobu piva plzeňského typu a to z důvodu nízké enzymatické aktivity českého sladu. Tento postup je však často nahrazován postupem A podobně jako postup B nahradil dříve používaný třířmutový postup (Basařová a kol., 2010) a to z důvodu jeho ekonomické náročnosti a relativně malému dopadu na kvalitu piva (Montanari a kol., 2004).

Dle Enge a kol. (2005) jsou informace v literatuře o rozdílech mezi jednotlivými dekokčními postupy a infuzí nedostatečné. Výzkumů zaměřených na tuto problematiku je malé množství. Zahraniční piva jsou vyráběna z lépe rozluštěných sladů především infuzním postupem, u kterého nedochází k odebrání a povaření části díla - rmutu. Dekokční rmutování je však charakteristické pro chuť a kvalitu českého piva.

Rozdíl byl hledán přímo v průběhu každého z postupů analýzou vzorků sladin a také ve výsledném pivu pomocí srovnání s pěti velmi podobnými vzorky z produkce českých minipivovarů a tří vzorků obdobných piv z českých průmyslových pivovarů (ležák - dekokční postup, spodní kvašení). Byly vybrány také tři vzorky piva typu Ale z české produkce pro odlišení od ostatních vzorků (infuzní postup, svrchní kvašení).

K analýze byla využita moderní technologie nukleární magnetické rezonance (NMR). Dle Lachenmeier a kol. (2005) dochází u vzorků piv analyzovaných NMR k překryvu signálů, který v některých případech není možné eliminovat ani za pomoci 2-D NMR analýz. I přesto, že jsou piva organolepticky významně odlišná, není žádná jednotlivá látka, které by bylo možné tyto atributy přiřadit. Při srovnání 1-D NMR spekter je možné vzorky odlišit a kvantifikovat hlavní látky. Překrytí signálů však znemožňuje úplnou interpretaci všech látek. Vlastnosti piv jako například rozdílný typ, proces výroby nebo původ surovin jsou ukryty v komplexitě spekter. Rozkrytí je možné pomocí multivariační statistické metody PCA. Tento přístup se ukázal být přínosný i v dalších odvětvích, jako například při výrobě jablečných šťáv, vína a dalších produktů (Mannina a kol., 2012). Dle Duarte a kol. (2002) je odlišení piv a jejich vlastností na základě PCA analýzy spekter z NMR možné. Nejnovější studie také dokazují, že je možné pomocí této metody rozeznat mezi nealkoholickými a alkoholickými pivy, pivními styly, druhy použitého sladu na výrobu, lokalitou pivovaru, značkou piva nebo zmapovat metabolické procesy odehrávající se při kvašení (Spevacek a kol., 2016), což se částečně prokázalo i v našem případě.

Dle Nord a kol. (2004) a na základě vlastní knihovny spekter byly pro analýzu sladin vybrány signály pro maltózu a souboru aminokyselin, provedena jejich integrace, průměrování a zanesení do grafů. Protože se většina sacharidů obsažených ve vzorcích (zkvasitelné cukry a dextriny) skládají z monomerů glukózy, je rozlišení mezi nimi extrémně náročné kvůli překryvu signálů. Signál v oblasti 5.4 ppm lze přisoudit především maltóze, ale podílí se na něm i dextriny (Duarte a kol., 2002). Vzorky pro NMR analýzu byly připraveny dle Duarte a kol. (2002), stejně jako nutné úpravy výsledných NMR spekter. Potlačeny byly silné signály vody (4.7 ppm) a etanolu (3.66 a 1.18) k eliminaci vlivu různého obsahu alkoholu u vzorků a ke zpřesnění senzitivity PCA analýz. Zbylé spektrum je možné rozdělit do třech oblastí podle obsahu látek a síly signálů - oblast sacharidů (6 - 3 ppm), alifatická oblast (3 - 0 ppm) a aromatická oblast (6 - 10 ppm). S těmito postupy se shodují i studie od Lachenmeier a kol. (2005) a Nord a kol. (2004).

Počáteční měření hustoměrem ukázala, že rozdíl v dopadu na celkový obsah sacharidů u obou postupů je statisticky nevýznamný. Je však podstatné poznamenat, že z hlediska rozdílu absolutního obsahu sacharidů vykazuje postup A vyšší hodnoty, což při výrobě tisíců až miliónů hektolitrů piva ročně hraje velmi významnou roli. K podobnému závěru dospěli i Montanari a kol. (2004).

Slack a kol. (1980) uvádí, že při rmutování jsou klíčové teploty nad 60°C, protože dochází k mazovatění škrobu, tedy k rozrušení jeho mezimolekulárních vazeb, které umožní jeho enzymatický rozklad. To potvrzují výsledky sledovaného obsahu maltózy ve sladinách (Graf 1), kde při přechodu z peptonizační teploty (D2 55°C) na nižší cukrotvornou teplotu (D3 65°C) došlo k největšímu nárůstu obsahu maltózy o 67% z maximálního obsahu. Nárůst v rámci ostatních teplot dosahoval v průměru pouhých 8%. PCA analýza celkového spektra děl potvrdila tyto výsledky (Bodový diagram 1), došlo k rozdělení na skupiny podle teplot 45°C (D1), 55°C (D2) a 65-78°C (D3-D6). Skupina 65-78°C dosahovala nejmenší relativní rozdílnosti mezi vzorky.

Statisticky významného nárůstu obsahu maltózy zaznamenal postup A pouze na odrmutovací teplotě (Graf 1 – D5 75°C). To bylo způsobeno významným nárůstem obsahu maltózy u jeho rmutu R (Graf 3). Dle Evans a kol. (2003) je to způsobeno zvolením optimálních časů na teplotách 65°C a 75°C, který vede k optimální aktivitě alfa- a beta-amylázy.



Obsah aminokyselin zaznamenal největší nárůst při vystření (D1 45°C) o 38% z maximálního obsahu (Graf 2). Další velký nárůst o 25 - 35% nastal po odpočinku děl na peptonizační teplotě (D2 55°C). Postup B zde začal vykazovat statisticky významný přírůstek, rozdíl činil 10% a to až do odrmutování. Dle Enge a kol. (2005) je to dáno dlouhou prodlevou postupu B na peptonizační teplotě.

Podle Briggs a kol. (2004) dochází při povaření rmutů k Maillardovým reakcím, což jsou reakce mezi sacharidy a bílkovinami, které vedou ke vzniku melanoidinů. Melanoidiny jsou považovány za významné látky z hlediska dopadu na chuť i barvu piva. Vznik melanoidinů je důležitý právě pro rmutování dekokčním postupem, protože u infuzního postupu nedochází k varu. Všechny rmuty vykazovaly pokles v obsahu maltózy po jejich povaření (Graf 3 – 100°C R2). V našem případě se melanoidiny nepodařilo pomocí NMR identifikovat a ani PCA analýzy rmutů nevedly k rozdělení (např. rmuty podle teploty), z toho vyplývá, že melanoidiny nemají významný vliv na obsah látek, resp. se vyskytují v minimálním množství.

Z celkového zhodnocení výsledků z oblasti analýzy sladín vyplývá, že jsou si oba postupy velmi podobné a vedou k téměř totožným výsledným sladínám a to i přes některé odchylky při průběhu rmutování. Postup A se ukazuje být příznivější pro funkci alfa- a beta-amylyázy a vykazuje tak vyšší hodnoty přírůstku maltózy - rmut R se v této oblasti zdá být klíčovým. Postup B naopak díky delšímu setrvání díla na peptonizační teplotě vedl k uvolnění vyššího množství aminokyselin ze sladu - rmuty 1R a 2R nevykazovaly tak významný nárůst obsahu maltózy jako rmut R. Je zajímavé, že po scezení a vyslazení dochází téměř ke srovnání hodnot obsahu maltózy i aminokyselin. To koresponduje s výsledky z měření hustoměrem. Briggs a kol. (2004) uvádí, že při řídké vystírce (3l vody a více/1kg sladu) dochází k uvolnění naprosté většiny látek ze sladového šrotu. Toto tvrzení naše studie vyvrací - vývoj obsahu maltózy (Graf 1) i PCA analýza oblasti sacharidů (Bodový diagram 2), kde se vzorky D6 u obou postupů sjednocují, ukazují, že sladový šrot ukrývá významné množství maltózy a aminokyselin k jejichž vyplavení dochází vyslazením a to i přes zvolení relativně řídké vystírky. Ukazuje se, že zvolení správného poměru vystírací a vyslazovací vody je klíčové k dosažení optimálních výsledků.

PCA analýza celkového spektra piv (Bodový diagram 3) ukázala zajímavý výsledek. K rozdělení došlo mezi pivy z minipivovarů a průmyslové produkce, ke které se přiřadila i piva typu Ale. Analýza Lachenmeier a kol. (2005) této oblasti ukázala rozdělení piv

mikrobiologicky kontaminovaných s vyšším obsahem kyseliny mléčné. Po bližším prozkoumání spekter našich vzorků nebyl zaznamenán vysoký obsah této kyseliny u žádného z nich. Rozdělení na základě mikrobiologické kontaminace bylo vyloučeno. Lze se domnívat, že spojitost vzorků Ale a průmyslových může být na základě jejich rmutovacího postupu, čemuž odpovídají silné signály na NMR spektru v oblasti sacharidů, které měly největší vliv na rozdělení v Bodovém diagramu 3. Dle Carrol a kol. (2000) se průmyslové pivovary snaží dosáhnout co nejvyšší ekonomické efektivity všech procesů. Výrobní proces v průmyslových pivovarech je vysoce optimalizovaný, tedy může docházet i k významnému zkrácení postupu A až na úroveň blížíci se infuznímu postupu. Naše analýza sladiv ukázala (Graf 1), že postup A vykazuje vyšší absolutní výtěžnost cukerných látek, které jsou pro velkovýrobu klíčové, Rozdělením vzorků piva pomocí PCA analýza na základě infuzního/dekokčního rmutování se prozatím nezabývala žádná studie. Přesto dle Spevacek a kol. (2016) může mít použití různých kmenů kvasinek za následek různý zůstatek zbytkových sacharidů a alifatických aminokyselin v pivu, kvůli jejich odlišnému metabolismu. Nord a kol. (2004) uvádí, že profil aminokyselin je obrazem složení sladiny v kombinaci s metabolismem kvasnic. Naše PCA analýza v alifatické oblasti (Bodový diagram 4) nevedla k významnému odlišení žádné ze skupin.

Duarte a kol. (2002) byli schopni rozlišit vzorky piv na základě jejich typu - Ale a Lager. K rozdělení dospěli PCA analýzou aromatické oblasti a to kvůli předpokládanému obsahu polyfenolů a aromatických látek. Naše PCA analýza v této oblasti (Bodový diagram 5) ukázala opět oddělení vzorků z minipivovarů a průmyslové produkce. Největší rozdíly však vykazovaly vzorky typu Ale. Dle Briggs a kol. (2004) to může být způsobeno použitou odrůdou chmele nebo celkovým množstvím použitého chmele. Piva typu Ale jsou zpravidla velmi hořká a používají i dvojnásobné množství chmele. Tomu nasvědčuje i protilehlá poloha skupin vzorků z průmyslových pivovarů a vzorků typu Ale. Při našich pozorováních dosahovaly vzorky viditelně největších rozdílů v signálech v části aromatické oblasti 9–8.1 ppm, PCA analýza (Bodový diagram 6) ukázala jasné rozdělení jednotlivých skupin. Skupina vzorků typu Ale opět vykazovala největší odlišení a vzájemnou rozdílnost. Naopak vzorky z minipivovarů a průmyslové se seskupily do svých oblastí, vykazovaly menší vzájemnou rozdílnost.

V žádné z našich PCA analýz nedocházelo k významnému rozdělení námi uvařených vzorků piv ani k seskupování vzorků kolem jednoho z nich. Naopak rozdělení v rámci

izolovaných oblastí minipivovarů bylo náhodné. To svědčí o malém vlivu rozdílných výrobních postupů.

Jasně největší odlišnost vykazoval jeden vzorek piva typu Ale, u kterého bylo jisté, že je vyroben z anglického sladu a chmele infuzním postupem a je svrchně kvašený (odlišoval se ve všech PCA analýzách a vždy obsazoval krajní hodnoty). To potvrdilo oddělení tohoto vzorku od všech ostatních v Bodovém diagramu 7 - Lachenmeier a kol. (2005) v této oblasti oddělili vzorky na základě typu sladu. Z toho vyplývá, že největší dopad na rozdílnost NMR spekter mají vstupní suroviny. PCA analýzou lze vzorky rozdělit i na základě dalších vlastností (styl – Ale, Lager, původ - minipivovar, průmyslový pivovar), tyto rozdíly jsou však menší než dopad vstupních surovin. I v případě studie od Lachenmeier a kol. (2005) došlo v PCA analýze pro rozlišení piv typu Ale a Lager k překryvu vzorků v jednom ze segmentů jejich bodového diagramu. Na základě našich poznatků se lze domnívat, že jsou tyto překryvy způsobeny použitím totožných vstupních surovin.

Dle Enge a kol. (2005) je při rozdílných rmutovacích postupech možné dosáhnout podobných analytických výsledků, výsledné působení jednotlivých složek piva však zásadně ovlivní výsledek při degustaci. Sensorickým hodnocením došli k závěru, že zvolený rmutovací postup může významně ovlivnit vlastnosti hotového piva. Při detailním pohledu na jejich výsledky je však patrné, že mezi postupem A a B nebyly fatální rozdíly v základních sensorických vlastnostech (říz, hořkost, sladová a chmelové chuť a vůně) ani v cizích vůních a chutích piva. A to ani přesto, že byl postup A zkrácen. V některých případech postup A předčil postup B. K tomuto závěru došli především na základě rozdílu v pitelnosti piva, který byl ve prospěch postupu B. Dle Čejka a kol. (2011) je pitelnost komplexní vlastností piva, která zahrnuje mnoho faktorů – od sensorických přes vnějších a kognitivních až po fyziologické. Mattos a kol. (2005) uvádí, že jednotná definice pitelnosti piva nebyla dosud ani formulována, ani přijata. Naše trojúhelníková sensorická analýza nevykázala rozdíl mezi námi uvařenými pivy ani preferenci jednoho z nich. Žádný významný rozdíl v sensorické kvalitě piva nebyl nalezen. Ohledně pitelnosti piv vyrobených postupy A nebo B je zapotřebí dalších analýz.

## 7 Závěr

Zvolenou metodikou nebylo možné najít významný rozdíl mezi postupem A a postupem B. To potvrdila i senzorická analýza vzorků. Pokud existují rozdíly mezi postupy, nachází se pravděpodobně ve stopových látkách, které nebylo možné detekovat pomocí NMR nebo rozlišit na PCA bodových diagramech.

NMR analýzou bylo zjištěno, že největší dopad na složení sladiny a piva mají suroviny, ze kterých jsou vyrobeny. Rozdílný dekokční rmutovací postup nemá fatální dopad na složení sladin nebo piva. Oba postupy poskytly téměř totožné sladiny a to i přesto, že při průběhu rmutování docházelo k odchýlkám. Tyto odchylky se značně vyrovnaly po scezení a vyslazení.

Podářilo se oddělit piva vyrobená v minipivovarech a v průmyslových pivovarech. Toto rozdělení nebylo možné uspokojivě vysvětlit především kvůli absenci obdobných studií na toto téma. K rozdělení na základě poznatků z literatury došlo mezi pivy typu Lager a Ale v aromatické oblasti spekter.

Postup A vykazoval vyšší hodnoty celkového obsahu maltózy, které byly sice statisticky nevýznamné, přesto mohou být velmi důležité pro výrobu piva v průmyslových pivovarech nebo minipivovarech s větším výstavem. Tento postup se jeví jako optimálnější pro působení amylolytických enzymů.

Lze tedy tvrdit, že dopad na výslednou kvalitu piva je minimální. Postupy nevykázaly jasné rozlišení. Přesto že je postup B delší a ekonomicky náročnější, neposkytuje významné kvalitativní benefity v žádné ze zkoumaných oblastí.

K potvrzení tohoto výsledku je zapotřebí dalších analýz.

## 8 Seznam literatury

Bamforth, C.W. 2000. Brewing: an ancient yet modern biotechnology. *Chemical Educator*, 5, 102-112

Bamforth, C.W. 2003. *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*, Oxford University Press, New York

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T., 2010. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT Praha, Praha, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.

Benkovská, D., Flodrová, D., Psota, V., Bobál'ová, J. 2011. Vliv pivovarského procesu na profil proteinů ječmene. *Kvasny Prum.* 57, č. 7–8, s. 260–265.

Bílek, V. et al., 1954. *Technologie sladu a piva. Díl I*

Boulton, C., and Quain, D. 2001. *Brewing Yeast and Fermentation*, 1st ed., Blackwell Science, Oxford.

Briggs, D. E. 1992. in *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology, and biotechnology*. (Shewry, P. R. ed.) p. 361. Wallingford. C.A.B. International.

Briggs, D.E., 1998. *Malts and Malting*, Blackie Academic & Professional, London, 796 pp.

Birggs, D.E., 2004. *Brewing: Science and practice*. Woodhead, Cambridge, UK.

Carroll, G., & Swaminathan, A. (2000). Why the Microbrewery Movement? Organizational Dynamics of Resource Partitioning in the U.S. Brewing Industry. *American Journal of Sociology*, 106(3), 715-762.

Čejka, P., Dvořák, J., Kellner, V., Čulík, J., Olšovská, J. 2011. Pitelnost piva a metoda jejího stanovení. *Kvasny Prum.* 57, č. 11–12, s. 406–412.

Český statistický úřad, 2016. Spotřeba potravin v roce 2015. Retrieved January 12, 2016, from <<https://www.czso.cz/documents/10180/32782524/2701391604g.pdf/>>.

Duarte I., Barros A., Belton P., Righelato R., Spraul M., Humpfer E., and Gil A., 2002. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (9), pp 2475–2481.

DiCaprio A., Edwards J., 2014. Application of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to biological acidification of barley mashes. *Journal of The Institute of Brewing*, Vol. 120, Issue 3, p. 207-211.

Engan, S. 1972. Wort composition and beer flavor. II. The influence of different carbohydrates on the formation of some flavor components during fermentation, *J. Inst. Brew.* 78, 169–173.

Enge J., Šemík P., Korbel J., Šrogl J., Sekora M. 2005 Technologické aspekty infuzních a dekokčních způsobů rmutování. *Kvasný průmysl* 51/5. Plzeň.

Eßlinger, H. M. et al., 2009: *Handbook of Brewing, Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN 978-3-527-31674-8.

Evans, E., Ma, Y., Eglinton, J., Langridge, P., Logue, S. and Barr, A. 2002. The relationship between malt performance, beta-amylase, diastatic power and fermentability *Proc. Congr. Inst. Brew. (Asia Pacific Sect.)*, Adelaide, CD No. 12.

Evans E, van Wegen B, Ma Y, Eglinton J 2003. The Impact of the Thermostability of Alpha-Amylase, Beta-Amylase, and Limit Dextrinase on Potential Wort Fermentability1 *J Am Soc Brew Chem* 61:210–218.

Goldammer T., 2000. *The Brewers' Handbook*. Apex, Clifton, VA.

Gjertsen, P. 1953. CARBOHYDRATE COMPOSITION OF WORT AND BEER. *Journal of the Institute of Brewing*, 59: 296–306.

Koljonen T, Hämäläinen JJ, Sjöholm K, Pietilä K 1995 A model for the prediction of fermentable sugar concentrations during mashings. *J. Food Eng.* 26: 329–350.

Kosař K., Procházka S., 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.

Kunze, W.: *Technology Brewing and Malting*. VLB, Berlin, 2011. ISBN 13: 978-3-921690-65-9 .

Lachenmeier, D.W., Frank, W., Humpfer, E. et al. 2005. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis, *Eur Food Res Technol* 220: 215.

Lei, H., Zheng, L., Wang, C., Zhao, H., and Zhao, M. 2013. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast, *Int. J. Food Microbiol.* 161, 76–83.

MacGregor AW, Bazin SL, Macri LJ, Babb JC 1999. Modeling the contribution of alpha amylase, beta amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing, *Journal of Cereal Science* 29:161–169.

Malone, R. 2001. *Brewers' Guard.*, 130 (9), 24.

Masouka, S., Hatjopoulos, D., & O'mahony, M. 1995. Beer bitterness detection: Testing Thurstonian and sequential sensitivity analysis models for triad and tetrad methods. *Journal of Sensory Studies*, 10(3), 295-306.

Mattos R., Moretti R. 2005. Beer drinkability – a review. *MBAA Tech Quarterly* 42, 12-15.

Nord L. I., Vaag P. and Duus J. Ø., 2004. Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2004, 76 (16), pp 4790–4798.

Novák, J., 2009. *Dějiny piva: Od zrození po konec středověku*. Brno: Computer Press, a. s., 144s. ISBN 978-80-251-2019-4.

Owuama C.I., 1997. Sorghum: A cereal with lager beer brewing potential, *World Journal of Microbiol Biotechnology*, vol 13, 253–260s.

Peppard, T. 1988. The use of principal component analysis in monitoring the quality of beer. *Linkens HF Beer analysis* 264-279.

Prokeš, J. 2000. Klíčení ječmene. in *Technologie výroby sladu a piva* (eds. Kosař, K. & Procházka, S.) 84-96 (Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha).

Rabi, I.I., Zacharias, J.R., Millman, S., Kusch, P. 1938. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment". *Physical Review*. 53 (4): 318–327.

Reifenberger, E. et al. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *S. cerevisiae* and their relation to the triggering mechanism of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, 245, 324 – 33.

Robbins, T. 2009. *B is for beer*. USA: Oldcastle Books Ltd, 125s. ISBN 978-0-06-176836-1.

Slack, P. T., and Wainwright, T. 1980. Amylosis of large starch granules from barleys in relation to their gelatinization temperatures. *J. Inst. Brew.* 86:74-77.

Spevacek A. R., Benson K. H., Bamforth Ch. W., Slupsky M. C., 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*, Vol. 122, Issue 1, p. 21-28.

Susan, A. L., and Lewis, M. J. 1993. The mouthfeel of beer – A review, *J. Inst. Brew.* 99, 31-37.

Ťopka, P. & Ťopka, P.m. 2000. Čištění a šrotování sladu. in *Technologie výroby sladu a piva* (eds. Kosař, K. & Procházka, S.) 154-164 (Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha).

Verhoef, B. 2004. *Kompletní encyklopedie piva: Podrobný průvodce světem lahodného pěnívého moku*. Dobřeovice: Productions CZ, s. r. o., 304s. ISBN 80-7234-116-2.



Whittle, N., Eldrige, H., Bartley, J. Organ, G. 1999. J. Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection. *Inst. Brewing*, Vol. 105, Issue 2, p. 89-99.

Xu, Y. , Li, X. and Xie, J. 2014. Methods for Statistical Inference of Triangle Taste Tests Data and Their Applications. *Open Journal of Business and Management*, 2, 79-84.

Zýbrt V., 2005. *Velká kniha piva: vše o pivu*. Rubico, Olomouc, 287 s. ISBN 80-7346-054-8.