

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra Analytické chemie



ANALÝZA MALTOLU V PIVU

Vypracovala: Nela Rotterová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Studijní obor: Analytická chemie

Rok a místo odevzdání: 2017 Olomouc

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D. s použitím seznamu literatury, ve kterém jsem uvedla všechny použité zdroje.

V Olomouci dne

Nela Rotterová.....

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za pomoc při vedení diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu při studiu.

Tato práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2016_016, IGA_PrF_2017_020).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Nela Rotterová

Název práce: Analýza maltolu v pivu

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2017

Abstrakt: Tato diplomová práce se zabývá stanovením koncentrace maltolu u různých druhů pív, pořízených zejména z lokálního Rožnovského pivovaru. Maltol a isomaltol byl ze vzorku piva extrahován ethylacetátem, extrakt byl odpařen, derivatizován hexamethyldisilazanem a analyzován plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Během vývoje metody byla sledována zejména volba vhodného rozpouštědla pro extrakci, počet extrakcí, vliv pH a vliv vysolení chloridem sodným. Pro kvantifikaci maltolu byla testována metoda kalibrační závislosti, metoda vnitřního standardu a metoda standardního přídatku.

Klíčová slova: maltol, isomaltol, pivo, plynová chromatografie, Maillardova reakce

Počet stran: 53

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical Identification

Author's First name and Surname: Nela Rotterová

Title: Analysis maltol in beer

Type of thesis: Diploma thesis

Department: Department of analytical chemistry, UP Olomouc

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: This diploma thesis deals with the determination of maltol in different kinds of beers. These beers have been bought in local brewery in Rožnov city. Maltol and isomaltol were extracted with ethyl acetate from sample of beer. Extract was evaporated, derivatized with hexamethyldisilazane and analyzed by gas chromatography in connection with mass spectrometry. Selection of suitable extraction solvent, number of extraction steps, influence of pH and influence of salting with sodium chloride was tested during the method development. Calibration curve method, internal standard method and standard addition method were compared for maltol quantification.

Keywords: maltol, isomaltol, beer, gas chromatography, Maillard reaction

Number of page: 53

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 7 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 1. Pivo | 8 |
| 1.1. Druhy piv | 8 |
| 1.2. Aromatické látky vyskytující se v pivu..... | 9 |
| 1.3. Maltol | 12 |
| 1.3.1. Vznik maltolu | 13 |
| 1.4. Maillardova reakce | 14 |
| 1.4.1. Faktory působící na průběh reakce | 17 |
| 2. Výroba piva | 18 |
| 2.1. Ingredience používané při výrobě piva | 18 |
| 2.1.1. Slad | 18 |
| 2.1.1.1. Výroba sladu | 20 |
| 2.1.1.1.1. Máčení | 20 |
| 2.1.1.1.2. Klíčení | 20 |
| 2.1.1.1.3. Hvozďení | 21 |
| 2.1.2. Chmel | 21 |
| 2.1.2.1. Chemické složení chmele | 21 |
| 2.1.3. Voda | 22 |
| 2.1.3.1. Druhy pivovarských vod | 23 |
| 2.1.4. Pivovarské kvasinky | 24 |
| 2.1.4.1. Druhy pivovarských kvasinek | 24 |
| 2.1.4.2. Tvorba metabolitů během kvašení | 25 |
| 2.2. Příprava mladiny | 25 |
| 2.2.1. Šrotování | 26 |
| 2.2.2. Rmutování | 26 |
| 2.2.3. Scezování | 28 |
| 2.2.4. Chmelovar | 28 |
| 2.3. Kvašení | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1. Hlavní kvašení | 31 |
| 2.3.2. Dokvašování a zrání piva | 33 |
| 2.4. Filtrace, pasterizace a stáčení piva | 33 |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 35 |
| 3. METODY A VYBAVENÍ | 35 |
| 3.1. Chemikálie | 35 |
| 3.2. Přístroje a zařízení | 35 |
| 3.3. Volba rozpouštědla | 35 |
| 3.4. Opakovaná extrakce | 36 |
| 3.5. Extrakce s přidavkem soli | 36 |
| 3.6. Volba pH piva | 36 |
| 3.7. Přídavek vnitřního standardu a standardu maltolu..... | 37 |
| 3.8. Kalibrace | 37 |
| 3.9. Vzorky | 38 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUZE | 38 |
| 4.1. Volba rozpouštědla | 38 |
| 4.2. Opakovaná extrakce | 39 |
| 4.3. Opakovaná extrakce s přidavkem soli | 40 |
| 4.4. Volba pH | 40 |
| 4.5. Metody kvantifikace | 41 |
| 4.6. Reálné vzorky | 45 |
| 5. ZÁVĚR | 46 |
| SEZNAM LITERATURY | 47 |

ÚVOD

Aromatické látky patří k základním složkám potravin, které se musí pravidelně kontrolovat v technologických procesech. Zajišťují totiž celkové organoleptické vlastnosti výsledného produktu, což výrazně ovlivňuje konečného spotřebitele. Tyto látky se dají stanovit různými instrumentálními technikami jako jsou separační analytické, optické a spektrální a elektroanalytické metody. V těchto metodách pro stanovení těkavých sloučenin je zahrnuta vysokoúčinná kapalinová chromatografie, spektrofotometrie, ampérometrická detekce, chemiluminiscence či elektronický nos. Avšak jedna z neúčinnějších technik se ukázala separační metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Tato metoda je rychlá, jednoduchá a dostupná, proto je vhodná pro potravinářské laboratoře. Hmotnostní detekce je využívána ve sledování kvality v mnoha různých odvětvích, například ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství a zemědělství. Poskytuje informace o elementárním složení vzorku, struktuře sloučenin, kvalitativním a kvantitativním složení, izotopických poměrech atomů a o molekulové hmotnosti. Výhodné spojení plynové chromatografie s hmotnostním detektorem s označením GC/MS je jedinečné pro svou přesnost a reprodukovatelnost.

Pivo je nejoblíbenější a nadmíru konzumovaný alkoholický nápoj v České Republice. Tento mírně alkoholický mok obsahuje širokou škálu těkavých sloučenin, které zajišťují celkový aromatický profil piva. Koncentrace těchto látek je závislá na jednotlivých krocích technologického procesu výroby piva. Hlavními sensoricky aktivními látkami nacházejícími se v pivu jsou estery, vyšší alkoholy, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, terpenoidy a iso- α -hořké kyseliny zodpovědné za charakteristické chmelové aroma a hořkou příchuť. Důležitou aromatickou složkou je také maltol. Jeho přítomnost je příčinou karamelového aroma v závislosti na jeho koncentraci. Vzniká především jako produkt Maillardovy reakce, kde se tvoří zejména z disacharidů. Maltol je potřeba monitorovat, protože při vyšších koncentracích může mít toxické vlastnosti nebo může zvyšovat biologickou dostupnost a toxicitu hliníku.

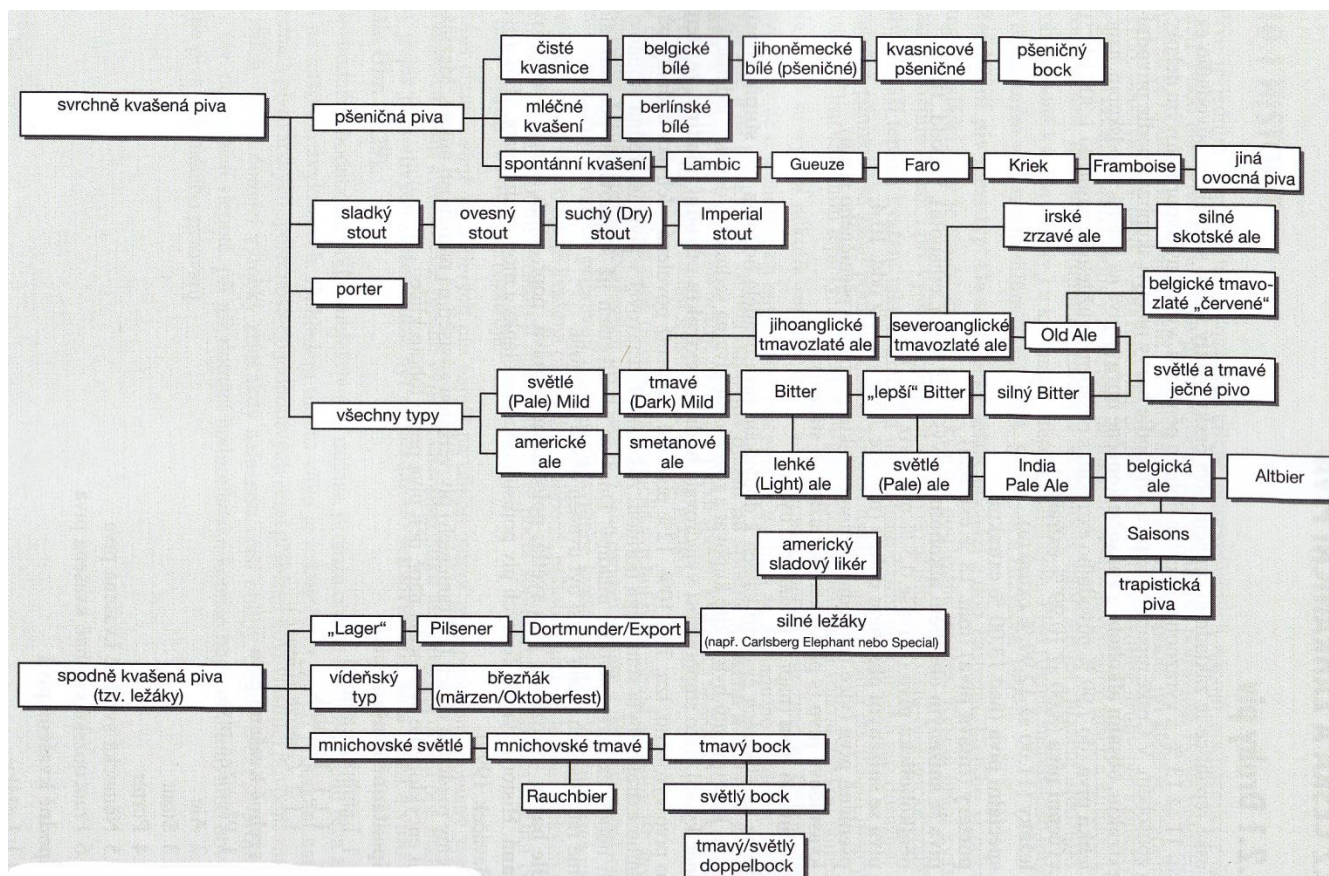
TEORETICKÁ ČÁST

1. PIVO

Pivo je jedním z nejrozšířenějších alkoholických nápojů na světě, jehož celková výroba činí zhruba 1,7 miliardy litrů ročně. Tento alkoholický nápoj je konzumován již více jak 8000 let po celém světě. [22] Jedná se o komplexní směs obsahující velké množství chuťově aktivních látek lišících se svou koncentrací a charakterem. Chuť a vůně piva je dána rovnováhou všech těchto aromatických látek. Dnes již máme k dispozici širokou škálu druhů piv od alkoholických piv, piv s nízkým obsahem alkoholu po nealkoholická piva různého charakteru. [5] [6] [7]

1.1. Druhy piv

Piva můžeme dělit na spontánně, svrchně a spodně kvašená. Spontánně kvašená piva jsou typická pro belgická piva typu Lambic (Gueze), která jsou produkována spontánním kvašením s pomocí směsi mléčných bakterií a kvasinek. Pšeničná piva, piva typu Ale, Stout a Porter se řadí mezi svrchně zkvašená piva. Piva typu Ale, Stout a Porter jsou velmi oblíbená v Anglii a Irsku. Zatímco Porter a Stout jsou výrazná tmavá piva, Ale může mít tmavé i světlé zbarvení. Posledním druhem jsou spodně kvašená piva, do kterých se řadí ležáky. Velký podíl ležáků je založen na plzeňském typu piv, která se vyznačují světlou barvou a plností s obsahem alkoholu 3-6%. Charakteristickým typem světlého ležáku je Pilsner Urquell, která se primárně vyznačuje svým chmelovým aroma. [23] [39]



Obr. 1: Přehled druhů pív [23]

1.2. Aromatické látky vyskytující se v pivu

Aromatický profil piva je složen z mnoha těkavých organických látek, které jsou zodpovědné za jedinečnou chuť a vůni. [10] Aromatické látky obsažené v pivu jsou velmi důležité, protože přispívají ke kvalitě výsledného produktu a také jejich stabilita hraje v jakosti svou roli. Důležité jsou také z toho důvodu, že jsou jedním z rozhodujících parametrů ovlivňujících spotřebitele. [6] [9] Těkavé aromatické látky byly identifikovány u různých druhů pív a jejich celkový obsah je velmi rozmanitý, udává se dokonce více než 1000 sensoricky aktivních sloučenin [5] [6] [12] Tyto látky mohou ovlivňovat chuť a vůni piva buď samostatně nebo mohou působit společně jako komplex. [6] Celkový aromatický profil závisí na typu piva a změn během skladování, při kterém hlavně dochází k tvorbě karamelového a chlebového aroma a může také docházet ke značnému zhoršení kvality. [12] [4] Při výrobě nealkoholických pív většina sensoricky aktivních látek zanikne během tepelných procesů, tudíž je poškozen aromatický profil a mohou se objevit jiné nepříjemné zápachy. [10]

Aroma piva se dělí do 8 skupin podle určité skupiny aromatických těkavých látek nacházejících se v pivu [13]:

1. Aromatické, vonné, ovocné a květinové
2. Pryskyřicové, oříškové a travnaté
3. Obilné
4. Karamelové a pražené
5. Fenolické
6. Sirné
7. Oxidační, zatuchlé a plesnivé

Vyvážená chuť piva je výsledkem harmonizace mezi těkavými a netěkavými sloučeninami, které pocházejí buď ze surového materiálu jako je chmel nebo jsou produkovány během zpracování a to zejména v průběhu procesu kvašení. [6] [8] [15] V pivu se nacházejí různorodé aromatické těkavé složky patřící do řady chemických skupin zajišťující celkové organoleptické vlastnosti piva. Jsou to zejména alkoholy, estery, organické kyseliny, aldehydy, ketony, terpenoidy, sloučeniny síry a fenoly. [6] [8] Tyto látky mají odlišnou těkavost i polaritu a v pivu je můžeme nalézt ve variabilním intervalu koncentrací řádově od ng/l až po mg/l. [8] Mezi nimi estery a alkoholy jsou hlavní složky aromatických látek. Zatímco sladké a ovocné aroma vykazují estery, alkoholy přidělují pivu alkoholovou, ovocnou a nezralou příchuť. [10]

Do další škály těkavých látek v pivu patří ethylestery a acetáty. Důležité ethylestery (odvozené od ethanolu) a acetáty (odvozené od kyseliny octové) se tvoří z dvouuhlíkatého ethanolu jako hlavního alkoholu a dvouuhlíkaté kyseliny octové, která je od ethanolu odvozená a přes acetyl-CoA má mimořádný biochemický význam. Estery vyvolávají ovocnou a květinovou charakteristickou vůni piva. Mezi nejvýznamnější patří ethyldekanoát s květinovou, ethylacetát a ethyloktanoát s ovocnou, isoamylacetát s banánovou a 2-fenylethylacetát s medovou, ovocnou a květinovou vůní kvašených nápojů. [14]

Dalšími látkami podílejícími se na sensorických vlastnostech piva jsou směsi vyšších alkoholů, které přispívají k základní chuti a vůni kvašených nápojů i potravin. Zahrnují zejména tyrosol,

isoamylalkohol, amylalkohol, isobutanol a 2-fenylethylalkohol. Mohou mít pozitivní i negativní efekt na aromatický profil piva. Jejich ideální koncentrace je do 300 mg/l, kde se projevuje převážně ovocné aroma, nicméně překročení této hodnoty může mít za následek silný štiplavý zápach. Ale i malá koncentrace nebo úplná nepřítomnost základních sensoricky aktivních látek má na svědomí jistý nedostatek v chuti či vůni. Tyto sloučeniny jsou nejzastoupenější těkavé složky vyprodukované během procesu kvašení. [4] [8] [14]

Negativní dopad na pивní aroma mohou mít mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou produktem kvašení, jako jsou kyselina octová (ocet), butanová (zkažené máslo) nebo propanová (kozí). [8]

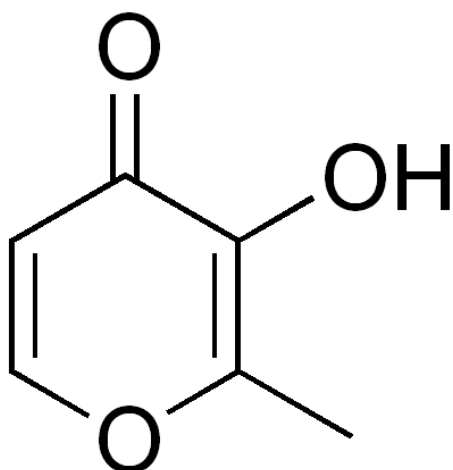
Diacetyl je charakterizován karamelovým a ořechovým aroma, ale při vysokých koncentracích má zápach žluklého másla. Může být syntetizován během fermentace buňkami kvasinek, avšak převážně je produkován bakterií mléčného kvašení. [14]

Velmi nízký práh smyslové detekce mají sloučeniny obsahující síru, jejich zápach připomíná zkažená vejce či cibulové aroma. Je zde 5 základních kategorií sirných sloučenin a ty zahrnují heterocyklické sloučeniny, sulfidy, polysulfidy, thioly a thioestery. Thioly mají příjemné aroma připomínající grapefruit, mučenku či černý rybíz na rozdíl od jiných sirných sloučenin. Tyto látky pocházejí z fungicidů obsahujících síru či z degradace sirných aminokyselin během procesu kvašení. [14]

Další skupinou aromatických složek piva jsou látky patřící do třídy terpenoidů. Představují hlavní sensorické složky u mnoha komerčně dostupných produktů, jako jsou pivo, víno, kosmetika parfémy a také aditivní potravinářské látky. Terpenoidy mají květinové aroma, nejčastěji označované jako vůně růže. [14]

1.3. Maltol

Maltol je další složka zajišťující organoleptické vlastnosti piva. 3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-on též známý jako maltol je přirozeně se vyskytující organická sloučenina patřící do skupiny pyranů, jedná se tedy o látku heterocyklické povahy obsahující ketonovou skupinu. [17]



Obr. 2: Strukturální vzorec maltolu

Je to bílý krystalický prášek rozpustný v horké vodě, chloroformu nebo v dalších organických rozpouštědlech s teplotou tání 161°C. [16] Maltol se přirozeně vyskytuje v některých jehličnanech, kávě, čekance, sójových bobech, praženém sladu, kakau, uzeném vepřovém mase, pražených arašídech a oříšcích, pečených cereáliích, chlebové kůrce a v karamelizovaných a pečených potravinách. Pro představu se maltol nachází například ve sladové kávě v koncentraci zhruba 300 mg/kg, v čokoládě 3 mg/kg a v tmavých pivech 0-3 mg/kg. [20] Poprvé byl extrahován z kůry modřínu. Maltol se běžně využívá jako látka zvýrazňující chuť a vůni a je zodpovědná za karamelové a sladké aroma nápojů a potravin pod označením E636. Dochucovadla jsou důležitá z pohledu smyslového vnímání. Ve velmi malých koncentracích nemá maltol žádnou příchut, ale přidává se k potravinám k doslazení či k maskování sensorických tónů umělých sladidel. Maltol však může mít i špatný dopad na sensorickou kvalitu výrobků. Dle evropského zákona nesmí přesahovat hodnotu 200 mg/kg, protože při vyšších hodnotách může způsobovat bolesti hlavy, nevolnost, zvracení a u dětí je podezřelý na potenciální nepříznivé následky jako jsou poškození funkce

mozku, jater, ledvin a sleziny. Z tohoto důvodu je u nás zakázáno maltol používat jako aditivum v potravinách. Jinde se maltol do potravin a nápojů přidává v nepatrném množství od 50 do 200 mg/kg. Dle zákona přídavek maltolu nesmí překročit hodnotu 200 mg/kg. Ke stejným účelům může být také použit ethylmaltol, který má tu výhodu, že vykazuje zlepšení chuťových vlastností při daleko nižších koncentracích v rozmezí 1-50 mg/kg. Kromě těchto skutečností může maltol vázat hliník za vzniku stabilního a neutrálního komplexu, který významně zvyšuje biologickou dostupnost a tedy i toxicitu hliníku. Neurotoxicita komplexu hliník-maltol je 20x vyšší než komplexu hliník-laktát. Z tohoto důvodu je limitní přijatelné množství maltolu pro člověka 2 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Tudíž by měl být maltol pravidelně monitorován v potravinářských produktech za účelem ochrany zdraví veřejnosti. [1] [2] [3] [17] [18] [19]

1.3.1. Vznik maltolu

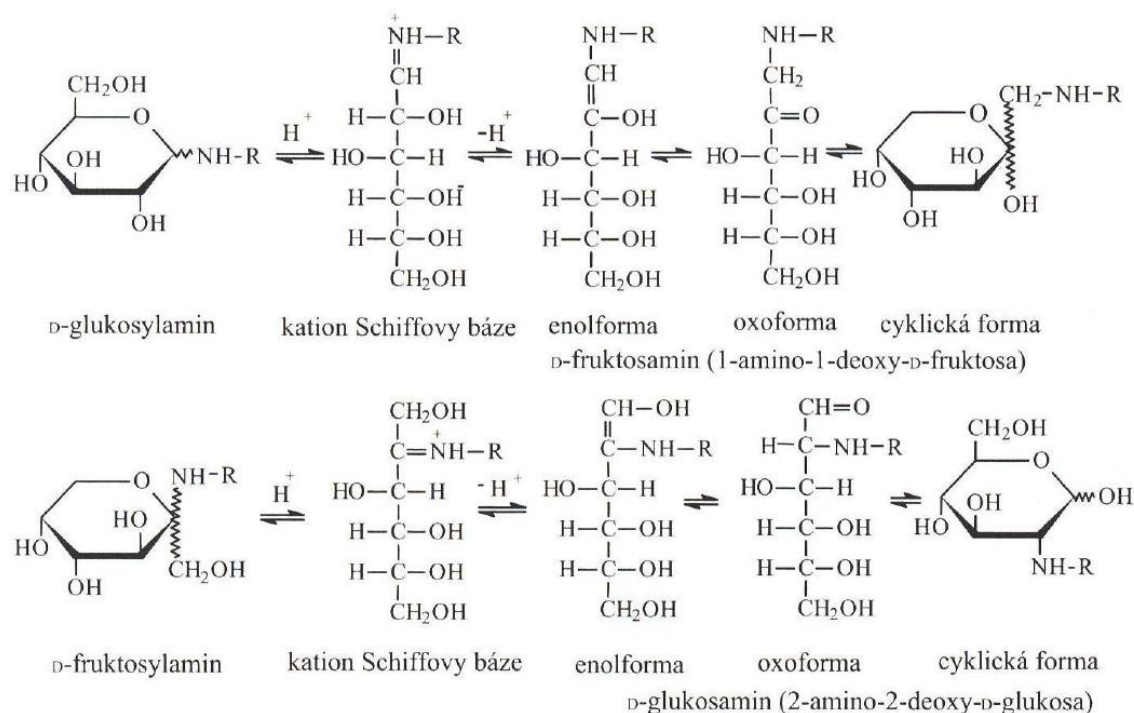
Maltol vzniká nejčastěji z 4-O-substituovaných derivátů glukosy, například z laktosy a maltosy. Ve velké míře se tvoří také z hexos, například z fruktosy, jak můžeme vidět na obrázku 6. Prekurzor maltolu včetně spousty podstatných pyranonů a furanonů vznikajících převážně v neutrálním či slabě kyselém prostředí je 1-Deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulosa. Maltol i isomaltol může vznikat z disacharidů degradací 1-deoxyglykodiulos nebo odlišným mechanismem degradace 1-deoxyglykodiulos, které se tvoří z monosacharidů. Z cyklické formy diulosy eliminací hydroxylové skupiny vzniká pyran-3-on, který je důležitým meziproduktem mechanismu degradace disacharidů. Charakter glykosidově vázaného sacharidu řídí další reakční mechanismy tohoto meziprojektu. Tento sacharid je buď glukosa, s jehož přítomností se tvoří maltol a glukosylisomaltol je možné nalézt pouze ve stopových koncentracích. V případě, kdy je tento sacharid β -galaktosa, tak je hlavním produktem galaktosylisomaltol. [20] Maltol ve spojení s pivem vzniká převážně Maillardovou reakcí.

1.4. Maillardova reakce

Procesy zodpovědné za změny v průběhu tepelného zpracování potravin jsou známy jako Maillardovy reakce. [21] Schéma Maillardovy reakce, které poprvé popsal J. E. Hodge v roce 1953, je i po tolika letech nejpřesnějším popisem těchto reakcí. Doplnění tohoto popisu provedl R. Tressl až po 40 letech. Jsou to nejrozšířenější a nejdůležitější chemické reakce, které se odehrávají v průběhu zpracování a skladování potravin. Při tomto ději dochází k interakci mezi aminokyselinou a redukcujícím cukrem jako je například glukosa. Označuje se jako reakce neenzymového hnědnutí, protože v průběhu reakcí vznikají charakteristické žlutohnědé pigmenty nazývané melanoidiny. Nastávají zde i jiné reakce jako je karamelizace sacharidů či reakce proteinů s lipidy. [20]

Je to řada po sobě jdoucích reakcí rozdělených do tří fází:

Počáteční fáze: V prvním kroku se tvoří glykosylaminy. Tyto nestabilní deriváty se přeskupí v případě aldóz Amadoriho přesmykem na 1-amino-1-deoxy-ketózy a v případě ketóz Heynsovým přesmykem na 2-amino-2-deoxy-aldózy, jak je zřejmé z obrázku 3. [20] [21]



Obr. 3: Schéma Amadoriho a Heynsova přesmyku

Střední fáze: V tomto pokročilém stádiu Amadoriho a Heynsovy produkty degradují. Vznikají α -dikarbonylové sloučeniny, furany, furanony a pyranony. Probíhá zde Streckerova degradace aminokyselin i dehydratace a fragmentace sacharidů. [20] [21]

Konečná fáze: V této fázi se tvoří heterocyklické sloučeniny, které představují klíčové látky pro výsledný sensorický profil. Je to způsobeno reakcemi meziproductů vzniklých v předchozích fázích Maillardovy reakce. Zároveň se zde ještě tvoří vysokomolekulární složky odpovědné za hnědé zbarvení konečného produktu nazývané melanoidiny. [20] [21] [37]

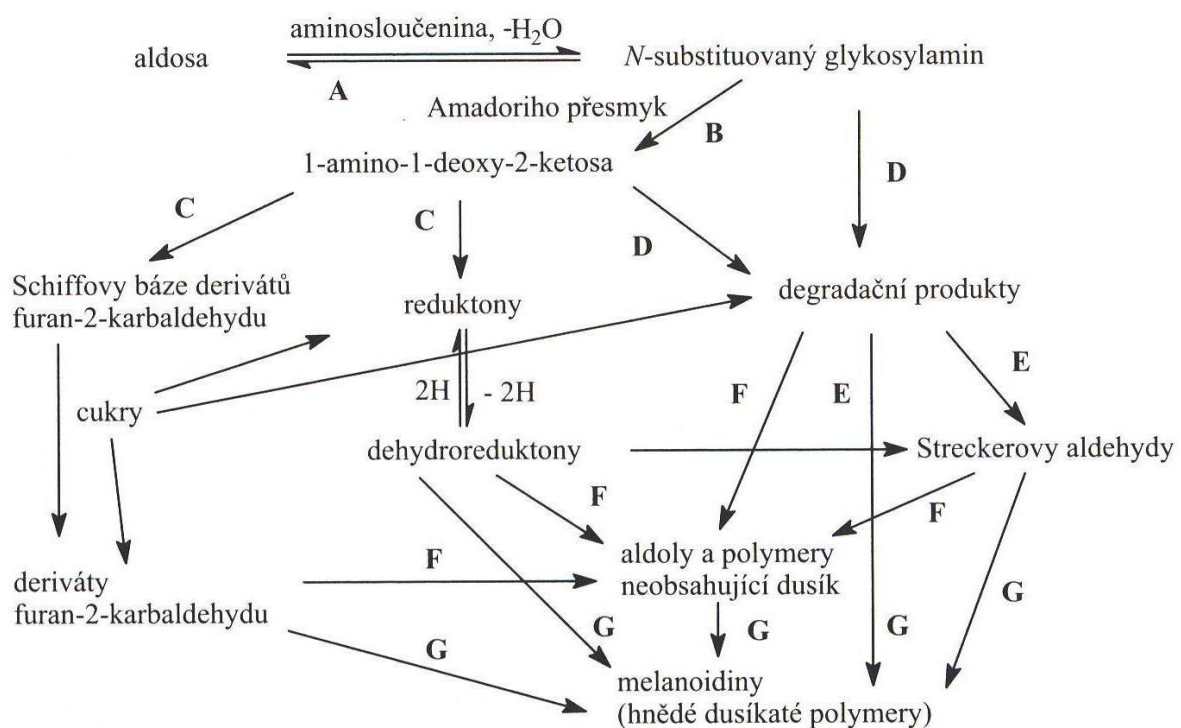


schéma podle Hodge

Obr. 4: Schéma Maillardovy reakce podle J. E. Hodge [20]

Reakce A, B spadají do počáteční fáze

Reakce C, D, E spadají do střední fáze

Reakce F, G spadají do konečné fáze

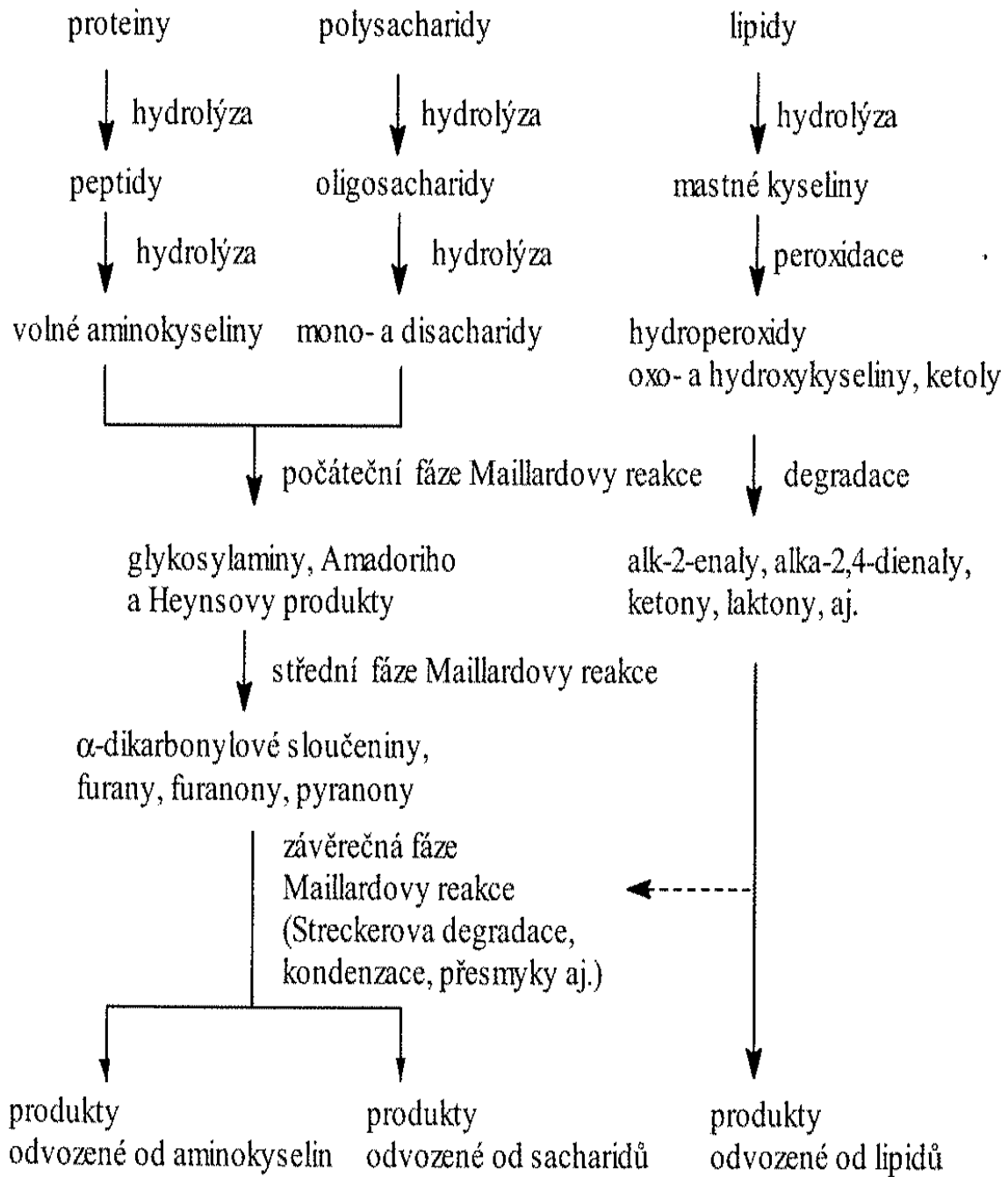
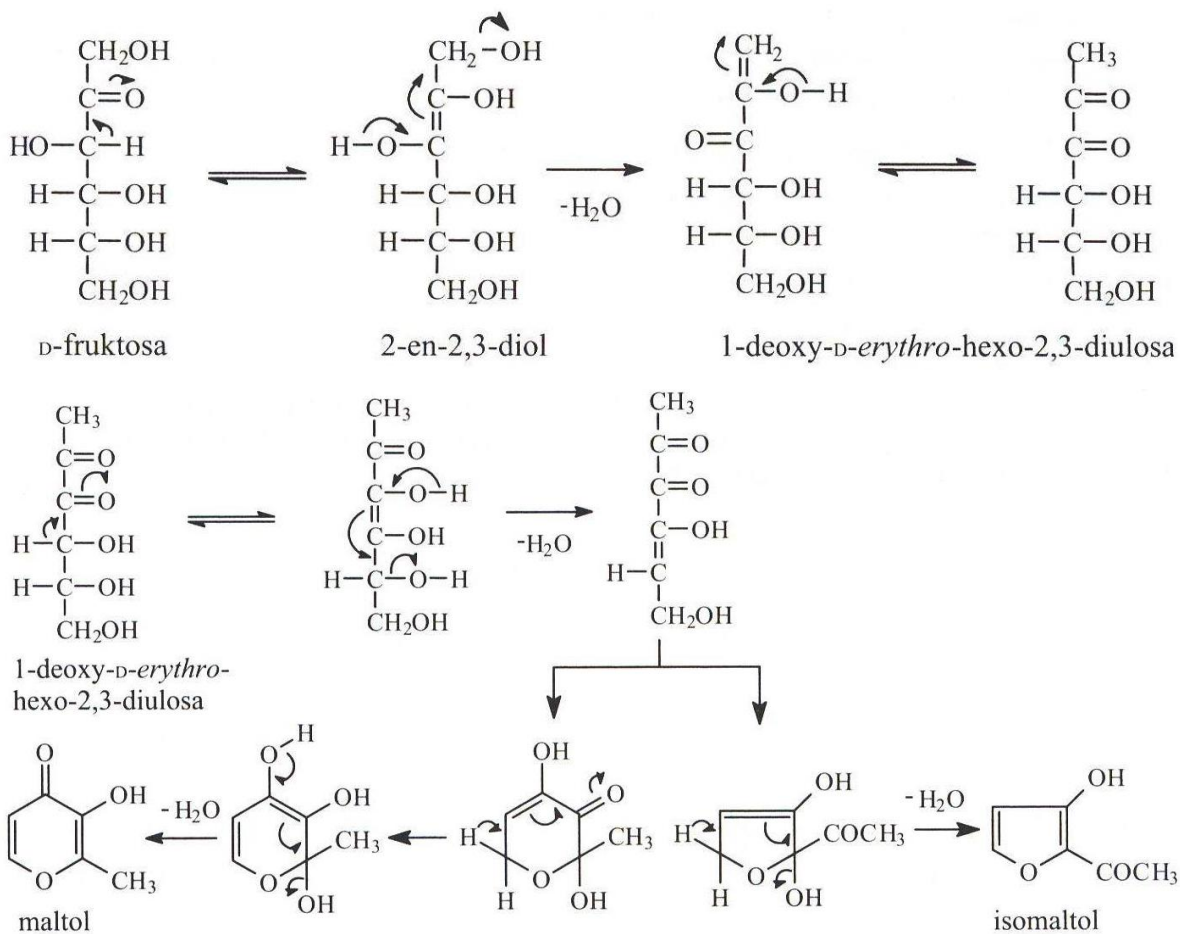


schéma podle Tressla

Obr. 5: Schéma Maillardovy reakce podle R. Tressla [20]



Obr. 6: Dehydratace sacharidů – vznik maltolu a isomaltolu [20]

1.4.1. Faktory působící na průběh reakce

Potřebné projevy reakce musí být zdůrazněny a ty nežádoucí potlačeny, proto musíme kontrolovat faktory, které ji ovlivňují v průběhu zpracování potravin. Jsou to zejména pH, teplota, typ a koncentrace reaktantů, čas reakce a aktivita vody. Maillardovy reakce jsou velmi složité, a proto optimalizace během tohoto procesu je nadměru komplikovaná. To ztěžuje i skutečnost, že jednotlivé faktory se navzájem ovlivňují a neúčinkují tedy odděleně. Na produkci hnědého zbarvení má významný vliv aktivita vody. Když je její hodnota příliš nízká, může dojít až k zastavení reakce. Na aktivitě vody je velmi závislá aktivační energie, jejíž hodnoty se pohybují v rozsáhlém intervalu od 10 do 160 kJ/mol u Maillardovy reakce. Tato aktivační energie je podřízena i hodnotě pH prostředí a to především při tvorbě

hnědých pigmentů. Teplota má vliv na rychlost reakce i na reakční mechanismy, které přispívají k výslednému produktu. Zvýšená teplota všeobecně přispívá k širší fragmentaci reaktantů a tedy k hojnějšímu počtu produktů. A změna teploty při Maillardově reakci je odpovědná za získání různých aromatických látek rozdílného sensorického vjemu z identické reakční suroviny. I vliv pH prostředí je jedním z kritérií průběhu Maillardovy reakce, jejíž rychlost vzrůstá se zvyšováním hodnoty pH. Při nižších hodnotách pH se tvoří různorodé karboxylové kyseliny. [20] [38]

2. VÝROBA PIVA

Vaření piva je několikastupňový proces obsahující několik dílčích postupů. [7] [26] Pivo obsahuje širokou škálu chemických sloučenin, které budou vzájemně reagovat ve všech fázích vaření piva. [6] Proto každý druh tohoto mírně alkoholického nápoje má jiné chemické složení. [5]

2.1. Ingredience používané při výrobě piva

Pivo se vyrábí ze čtyř hlavních surovin a to jsou voda, obilný slad, chmel a pivovarské kvasinky. [6] [11]

2.1.1. Slad

Slad je jednou z výchozích a základních surovin pro výrobu piva. I z hlediska aromatického profilu piva je tato surovina velmi významná. [9] Počáteční surovina pro produkci sladu je obilovina, u nás je to především ječmen setý. [23] [24] Například při vaření bezlepkového piva se používá kukuřice, rýže, čirok či proso. [22]

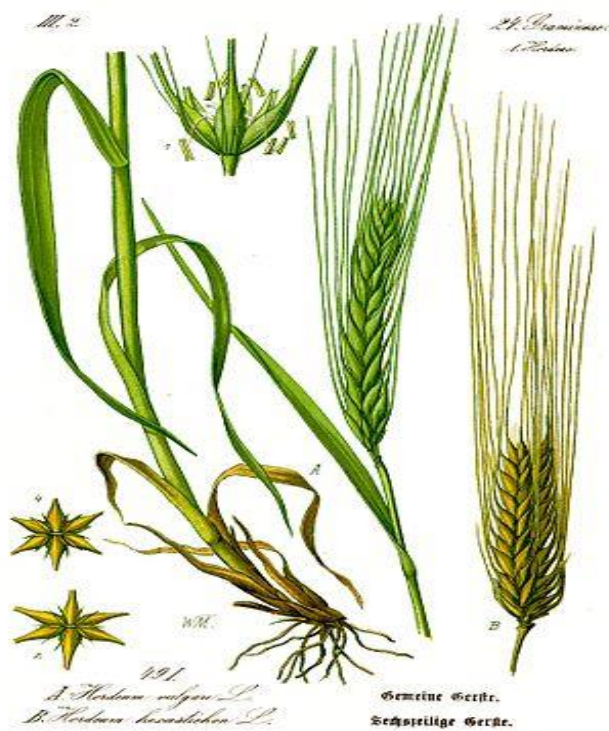
Dva druhy sladů, které se produkují po celém světě, jsou světlé slady plzeňského typu používané pro světlá piva a tmavé slady mnichovského typu používané pro tmavá piva. Existují i jiné druhy specifických sladů, využívající se jen na zvýraznění určité charakteristiky piva jako například karamelové, barvicí či nakuřované slady. [23] Nahrazením ječného sladu alespoň 50% pšeničným sladem se vyrábí pšeničné pivo a tyto slady z pšenice seté napomáhají stabilizovat pěnu piva. [23] [26]

Slad obsahuje řadu sacharidů, které se skládají z nerozpustné celulózy a hemicelulózy a také z rozpustného dextrinu, škrobu a jednoduchých cukrů. Škrob se skládá z amylozy a amylopektinu a představuje 50-60% celkové hmotnosti sladu. [7] Ve sladu se dále vyskytují dusíkaté látky, kromě samotných bílkovin to jsou fragmentační části proteinů jako jsou aminokyseliny, polypeptidy, makropeptidy a nižší peptidy produkující se ve zrně v průběhu klíčení ječmene. [23]

Další podstatnou složkou sladu jsou lipidy, z nichž nejvýznamnější vzhledem k jakosti piva jsou mastné kyseliny a to především kyselina linolová. Do těchto látek dále patří acylglyceroly, lipoproteiny, fosfolipidy a lipopolysacharidy. Zrno sladu je tvořeno až 4,5% lipidy. [24] [28] [29]

Dalšími sloučeninami jsou fenoly nacházející se v první řadě v obalu zrna. Rozdělují se na dvě základní kategorie a to flavonoidy a fenolové kyseliny. Patří sem bezbarvé a barevné flavonoidy, fenolové kyseliny a jednoduché fenoly, chinony, kumariny a kondenzované a další polymerní polyfenoly. [24] [28] [29]

Slad by neměl ve velké míře obsahovat látky, jako jsou dimethylsulfid a jeho prekurzory, N,N-dialkylnitrosaminy, mykotoxiny, těžké kovy či polycyklické aromatické uhlovodíky. Tyto sloučeniny mohou mít nepříjemný dopad na sensorický charakter piva nebo mohou být toxické, karcinogenní či mutagenní a tudíž by mohly mít špatný vliv na zdraví člověka. [24] [28] [29]



Obr. 7: Ječmen setý

(https://cs.wikipedia.org/wiki/Je%C4%8Dmen_set%C3%BD)

2.1.1.1. Výroba sladu

Výroba sladu se dělí do 3 procesů [29]:

- Máčení
- Klíčení
- Hvozďení

2.1.1.1.1. Máčení

Cílem máčení je zvýšit obsah vody v ječném zrně asi na 40 – 47%. Zvýšení obsahu vody vede k aktivaci enzymů, které zajišťují klíčení semena. [24] [28] [29]

2.1.1.1.2. Klíčení

Při procesu klíčení je úkolem aktivovaných enzymů rozštěpit vysokomolekulární látky na nízkomolekulární sloučeniny. Probíhá zde také syntéza ostatních enzymů i růstových

hormonů. Všechny tyto látky se podílejí na organoleptických vlastnostech konečného produktu. [24] [28] [29]

2.1.1.1.3. Hvozdění

Při tomto kroku vzniká zelený slad a je to konečný proces při výrobě sladu. Zde se naklíčený ječmen vysuší nejprve při teplotě 60° C a poté se dosuší při teplotě 80 - 105° C. Účelem je zajistit, aby se vlhkost zrna snížila pod 4% a tím pádem aby se zastavilo klíčení ječmene. Jelikož se při hvozdění uplatňují různé chemické či fyzikální přeměny látek, dochází zde k tvorbě velkého množství sensoricky aktivních či barevných sloučenin typických pro určitý typ piva. [24] [28] [29]

2.1.2. Chmel

Na tuto velmi významnou surovinu pro výrobu piva se používají samičí rostliny rodu *Humulus lupulus*, jinak chmel otáčivý.[27] Na rozdíl od jiných alkoholických nápojů dodává chmel pivu charakteristickou hořkost a aroma. Hlavním zdrojem této hořkosti a aroma jsou chmelové pryskyřice nacházející se uvnitř žláz samičích květů chmele.[11] Další významné součásti chmele jsou polyfenoly, silice i některé jiné sloučeniny podstatné pro technologický proces. Odrůdy chmele můžeme dělit buď na zeleňáky a červeňáky dle barvy chmelu nebo na rané, polorané a pozdní dle doby zrání chmele. Chmel se také může dělit z hlediska obsahu chmelových pryskyřic a to buď na jemné aromatické chmele, kde je obsah α -hořkých kyselin v rozmezí 3 – 7% hmotnosti nebo na vysokoobsažné hořké chmele s obsahem až 15% α -hořkých kyselin. [23]

2.1.2.1. Chemické složení chmele

Obsah vody v chmelu po vysušení je důležitý, protože má vliv především na hořké látky a jejich vlastnosti v průběhu skladování chmelu. Z toho důvodu by měl být ideální obsah vody v rozmezí vlhkosti 10 – 11%. Nejvýznamnější složky chmelových pryskyřic jsou α -hořké kyseliny zodpovědné za intenzitu a charakter hořkosti výsledného produktu.[23] Při procesu varu piva dochází k tepelné izomeraci α -hořkých kyselin na iso- α -hořké kyseliny, což jsou nejvýznamnější produkty, které obstarávají až 85% hořkosti piva. [11] [23] Čím vyšší je

hodnota iso- α -hořkých kyselin, tím intenzivněji je vnímána hořkost produktu. Zdrojem příznivého chmelového aroma jsou těkavé aromatické složky obsažené v chmelových silicích a obvykle jsou vnímány jako květinové, ovocné či dřevnaté vůně. [11] V chmelu se objevují i β -hořké kyseliny a množství záleží na odrůdě chmele. Obvykle to bývá kolem 3-5% hmotnosti chmele. Dále se v chmelu vyskytují polyfenolové látky jako jsou flavonoly a glykosidy flavonolů, katechiny, fenolové kyseliny a jejich deriváty a kumariny, které mohou mít pozitivní i negativní účinky stejně jako u polyfenolů ve sladu. V sušeném chmelu můžeme nalézt také sacharidy, nejčastěji jednoduché cukry, které mohou reagovat s aminosloučeninami v průběhu Maillardovy reakce, ale jinak nemají technologické využití při vaření piva. Chmel obsahuje rovněž dusíkaté látky, prenylované flavonoidy a v malém množství i lipidy. Z biologického pohledu jsou důležité minerální látky, zejména draslík, vápník, hořčík, železo, měď, zinek a mangan. V chmelu se vyskytují i některá barviva jako je chlorofyl. [23]



Obr. 8: Chmel otáčivý

(<http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=2641>)

2.1.3. Voda

Průmyslové odvětví jako je pivovarství se řadí mezi největší odběratele vody s množstvím 10 – 15 hl vody na 100 kg sladu. Pivo je tvořeno z 85-95% svého objemu vodou. [29] Zdroje přírodních vod využívané v pivovarství se dělí na spodní a povrchové vody. Ve spodních

vodách je nižší koncentrace organických látek, zatímco povrchová voda bývá významněji znečištěná. [23] [29]

Velmi důležité jsou ionty obsažené ve vodách používaných při výrobě piva. Ty nejdůležitější jsou [30]:

Kationty: H^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} .

Anionty: OH^- , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SiO_3^{2-} .

Významným kritériem pro vyhodnocení kvality vody je její tvrdost. Tvrdost vody je obsah rozpuštěných solí a to převážně vápenatých a hořečnatých. Soli hořčíku a vápníku, převážně sírany, chloridy a křemičitany tvoří stálou tvrdost vody neboli tvrdost nekarbonátovou. Kdežto tvrdost přechodná neboli karbonátová, která se při varu z části či úplně rozkládá, je tvořena hydrogenuhličitany vápníku a hořčíku. [23, 31]

Rozdělení tvrdosti (koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} ve vodě)[23]:

- Měkká – 1,4 mmol/l
- Středně tvrdá – 2,1 mmol/l
- Tvrdá - 5,3 mmol/l
- Velmi tvrdá – více než 5,3 mmol/l

2.1.3.1. Druhy pivovarských vod

Plzeňská voda je měkká, má nízký obsah anorganických látek a pro výrobu piva je vhodná pro silně chmelená spodně kvašená piva. [32]

Mnichovská voda je střední až tvrdá, má nízkou koncentraci síranů a chloridů, zato ale větší koncentraci vápníku a uhličitánů. [32]

Dortmundská voda je velmi tvrdá a převažuje neuhličitánová tvrdost. [32]

Vídeňská voda je velmi tvrdá a převažuje uhličitánová tvrdost, je vhodná pro produkci polotmavých piv. [32]

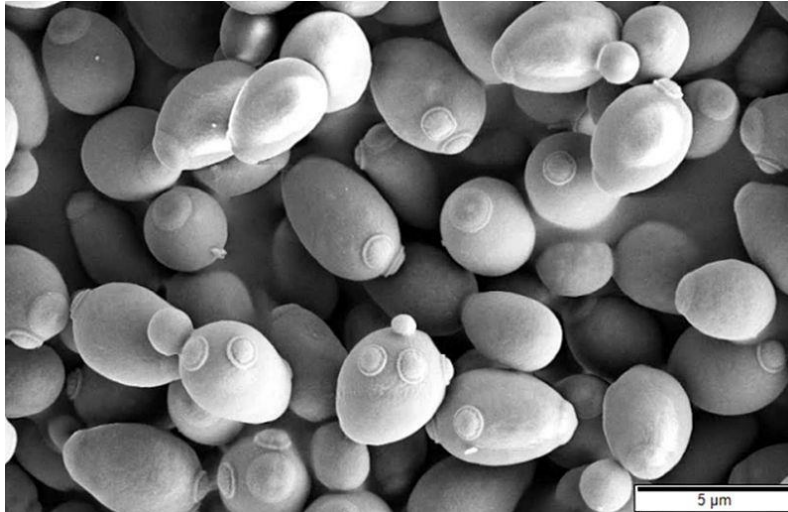
Dále se v přírodních vodách vyskytují rozpuštěné plyny a to hlavně sulfan, kyslík, oxid uhličitý a chlor. Přírodní vody obsahují také organické látky, z nichž se nejvíce vyskytují huminové látky či chlorované uhlovodíky jako například bromoform, trichlorethylen, trichlormethan nebo bromodichlormethan. Díky přítomnosti nežádoucích látek je potřeba vodu přefiltrat a to pomocí chemických, fyzikálních, mechanických či biologických postupů. [23]

2.1.4. Pivovarské kvasinky

Tyto jednobuněčné organismy jsou jednou z klíčových ingrediencí pro výrobu kvalitního piva. V pivovarství, ale i v jiném odvětví potravinářské technologie, jsou nejvyužívanější druhy kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*. [34] První, kdo upozoroval, že kvasinky se chovají jako živé organismy, byl Antonie van Leeuwenhoek. [23] Tyto kvasinky hrají hlavní roli v procesu kvašení a to tak, že přeměňují zkvasitelné sacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Mimo to také syntetizují vedlejší produkty, které jsou klíčové pro aromatické složky finálního piva. [35]

2.1.4.1. Druhy pivovarských kvasinek

Pivovarské kvasinky patří do říše hub a rozdělujeme je na spodní a svrchní pivovarské kvasinky. Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se využívají v teplotním intervalu od 7 do 15° C. Dochází k sedimentaci kvasnic na dno kvasné nádoby a tento typ kvasinek se používá pro piva typu ležáku. Svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se využívají v intervalu teplot od 18 do 22° C a kvasnice jsou vynášeny do kvasničné deky. Využívají se na vaření piva typu Ale či dalších druhů. [23]



Obr. 9: Snímek z elektronového mikroskopu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.4.2. Tvorba metabolitů během kvašení

Kvašení se děje za anaerobních podmínek, tedy bez přítomnosti kyslíku. Když sacharidy oxidují v bezkyslíkatém prostředí, dodávají tak buňkám kvasinek energii, kterou buňka potřebuje ke stavbě svých elementárních součástí. Hlavní metabolity kvašení jsou ethanol a oxid uhličitý. Například z jedné molekuly hexosy vzniknou dvě molekuly ethanolu, dvě molekuly oxidu uhličitého, nějaké vedlejší produkty a teplo. [23] Při výrobě piva během kvašení se uvolní 140 milionů tun CO₂ ročně a jeho čistota je 99%. [36] Dále se zde tvoří všechny aromatické látky jako jsou vyšší alkoholy, estery, karbonylové sloučeniny, siřné produkty a organické kyseliny jak již bylo zmíněno dříve. [23]

2.2. Příprava mladiny

Mladinu lze připravit ve 4 následujících základních krocích:

1. Šrotování sladu
2. Rmutování
3. Zcezování
4. Chmelovar

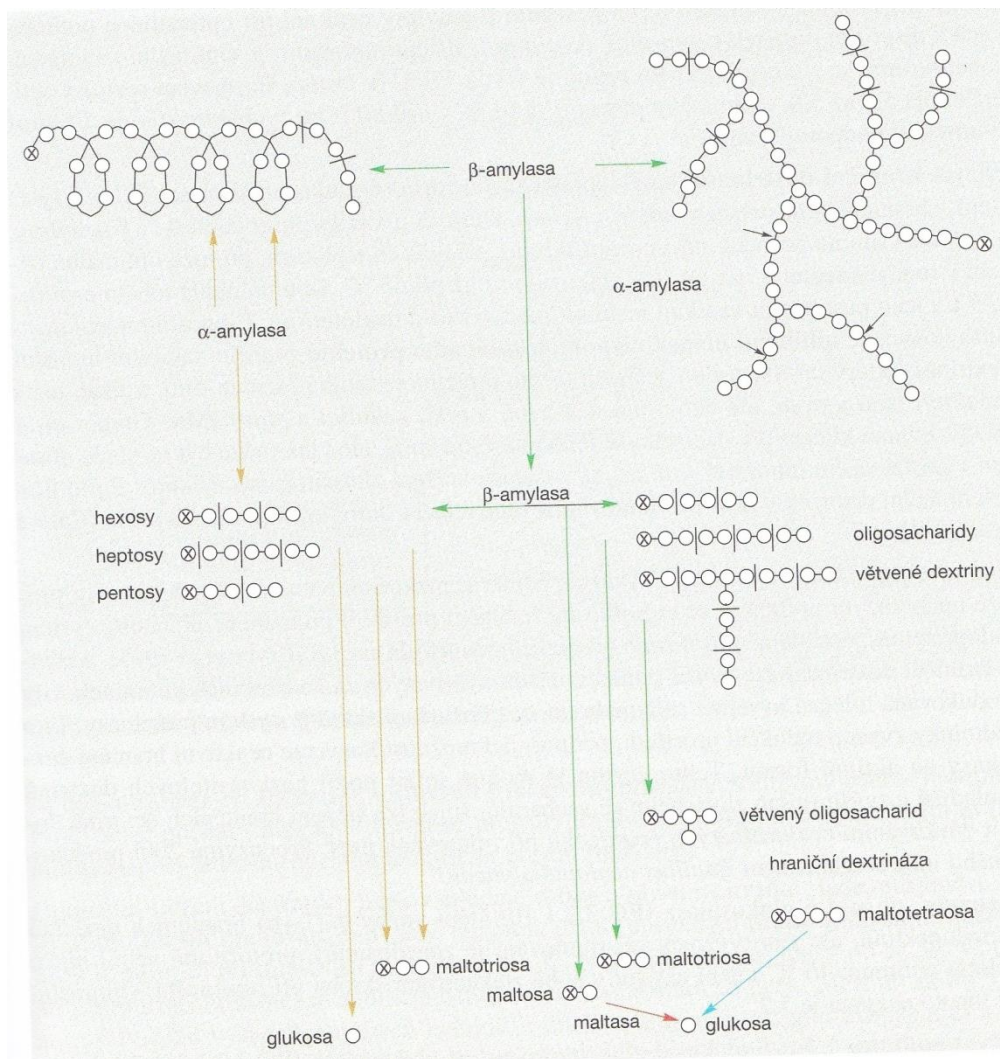
2.2.1. Šrotování

Vyrobený slad je třeba rozdrtit a to nejčastěji mechanickým procesem zajišťujícím dostupnost endospermu, který je potřebný pro pozdější enzymové a fyzikálně-chemické reakce. Endosperm je zdroj polysacharidu škrobu, který musí být převeden do roztoku a využit při procesu kvašení. Všechna zrna musí být precizně rozdrčena, přičemž se musí zachovat celistvé slupky zrna zvané pluchy, protože ty jsou později potřebné jako filtrační materiál sladiny a jsou z velké části tvořeny nerozpustnou celulosou. Pro extrakt sladiny nemají pluchy žádný podstatný význam. Slad se může mlít buď za sucha a nebo se navlhčí, aby nedošlo k poškození pluch. Tímto procesem vzniká **sladový šrot**. Tento šrot se musí dobře promíchat s teplou vodou, aby se dosáhlo předpokládaného složení sladiny. Výsledkem tohoto vystírání je vznik kašovitě konzistence sladového šrotu a vody, kterou označujeme jako rmut. Je potřeba, aby se co nejvíce látek převedlo ze sladu do vodného roztoku. Ovšem ve vodě rozpustných látek není mnoho a tak se do vody převedou hlavně sacharidy, nízkomolekulární látky a v podstatě všechny anorganické složky. [23] [27] [40]

2.2.2. Rmutování

Hlavním úkolem rmutovacího postupu je rozštěpit škrob na jednodušší zkvasitelné cukry za přítomnosti amylolytických enzymů. Tyto enzymy mohou štěpit škrob přímo na maltosu nebo přes α -glukany (dextriny) spolu s nimi vzniká i široká škála monosacharidů jako jsou glukosa a fruktosa, di a trisacharidů či oligosacharidů.

Škrob je štěpen ve třech krocích – bobtnání, zmazovatění a ztekucení. Bobtnání a zmazovatění škrobu je fyzikálně-chemický děj, závisící zejména na rychlosti a teplotě zahřívání a na tom, jaký druh ječmene byl použit na výrobu sladu. Škrob sladu mazovatí při teplotách od 50 do 57° C, závisí na místě vegetace a druhu ječmene. Když se v roztoku vyskytují jen fragmentační produkty škrobu, dochází ke zcukření. Je to fáze postupného zkracování řetězců molekul amylosy a amylopektinu působením enzymů nazývaných se ztekucení. Tento proces je nejideálnější pokud se teplota zvyšuje pomalu a vaření rmutu je intenzivní. Tak dochází k ideálnímu přecházení škrobu ze sladového zrna do roztoku.



Obr. 10: Schéma štěpení škrobu [23]

Dalším cílem rmutování je štěpení proteinů a polypeptidů na produkty s nižší molekulovou hmotností. Za tímto štěpením stojí proteolytické enzymy aminopeptidasy, endopeptidasy, karboxypeptidasa a dipeptidasa. Při tomto ději stoupá procento rozpuštěného dusíku.

Při rmutování také probíhá štěpení neškrobových polysacharidů a lipidů. Změny lipidů během rmutování provádí enzymy lipasy a lipoxygenasy. Obsah lipidů ve sladu je až 4,5% a z toho největší část tvoří kyselina linolová. Mění se také pH při rmutování a to do kyslejší oblasti až o hodnotu 0,15 - 0,30. Tímto procesem vzniká sladina. [23]

2.2.3. Scezování

Následuje scezení vzniklé sladiny ve scezovací kádi. Z tohoto pracného fyzikálně – chemického procesu dostaneme čirý extrakt sladiny obsahující všechny potřebné látky. Čiřost sladiny se odvíjí od podílu lipidů. Při tomto filtračním ději dojde nejprve k oddělení extrakčního roztoku sladu zvaného předeček. V kádi zůstane pevný podíl nazývaný se mláto. Ten se promyje horkou vodou a získají se výstřelky, které se přidají k extrakčnímu roztoku sladu. Scezování je ovlivněno kvalitou a složením sladového šrotu, stupněm štěpení výšemolekulárních složek, teplotou a typem zařízení pro scezování. [23] [41]



Obr. 11: Scezovací kád'

(<http://pivni.info/galerie/371-exkurze-ve-vyskovskem-pivovaru.html>)

2.2.4. Chmelovar

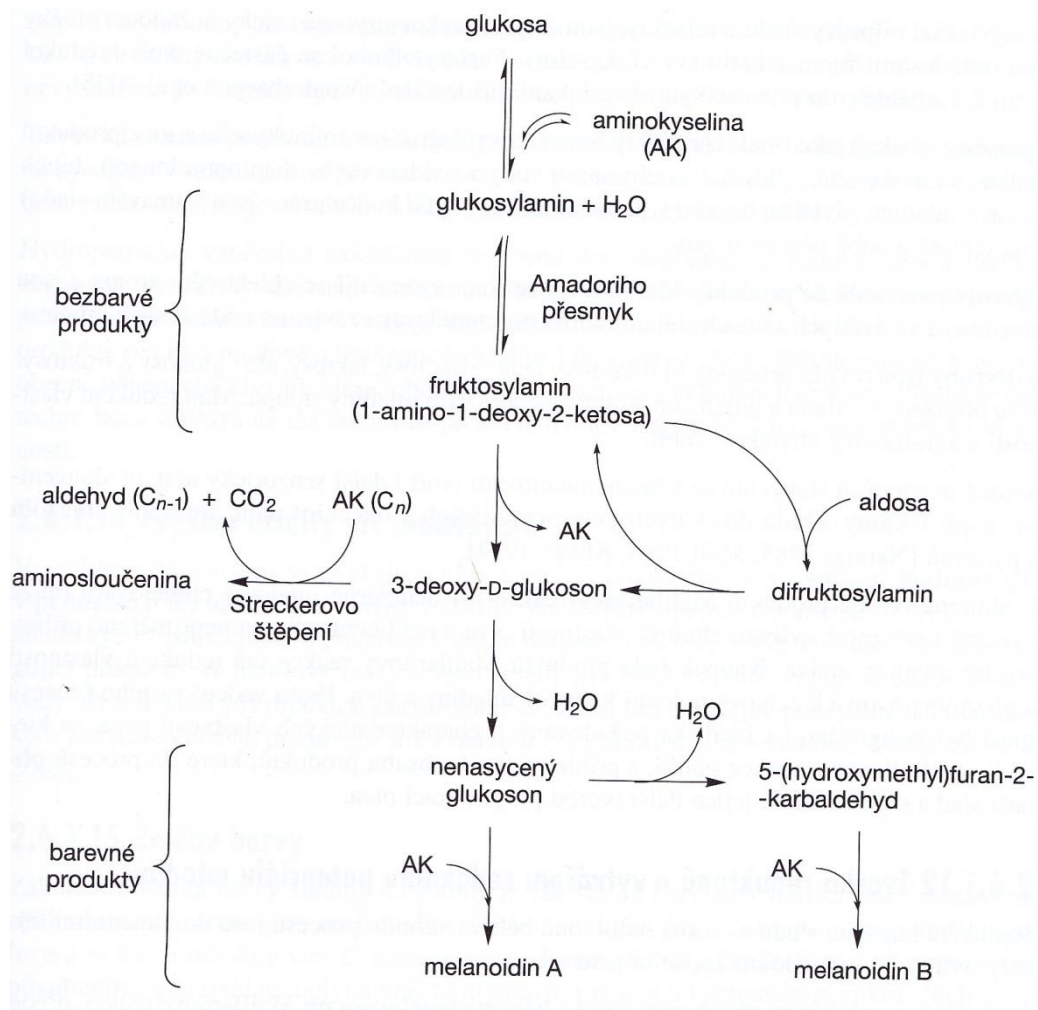
Tímto procesem označujeme smíchání a vaření vzniklé sladiny s chmelem po dobu 60 až 90 minut při teplotě 100° C. Působí zde mechanické pohyby ve spolupráci se škálou reakcí fyzikálních, chemických i biochemických. Výsledným produktem je mladina, jejíž výsledné složení bude mít vliv na následující technologický proces. [40] [42]

Účel chmelovaru [23]:

- *V odpaření přebytku vody, aby se dosáhlo vyhovující koncentrace extraktu mladiny pro daný druh piva. Při varu dojde k odparu těkavých sloučenin jako jsou chmelové silice, oxidační produkty či dimethylsulfid, ale jiné těkavé látky zase vzniknou. Jaké množství látek se odpaří záleží hlavně na teplotě, tlaku a na čase chmelového varu.*

[23] Intenzivnější a delší chmelovar má za následek lepší odpařování karbonylových složek, přičemž se směs zbaví veškerého (2E)-non-2-enalu se současným vyloučením kalů a vytvořením nových karbonylových sloučenin. [43] [44]

- *V inaktivaci enzymů*, které byly zachovány z procesu přípravy sladiny. Činnost těchto enzymů se zastavuje už při začátku ohřevu mladiny. Tyto enzymy jsou obvykle bakteriálního nebo plísňového původu a jejich kompletní aktivita je zastavena v teplotách kolem 95° C.
- *Ve sterilizaci mladiny a inhibici reziduální mikroflóry*, která probíhá během varu za sníženého pH v doprovodu hořkých složek chmele. Ty zabíjí plísně, kvasinky a bakterie pocházející z ingrediencí používaných při předchozích technologických postupech.
- *V koagulaci proteinů*, ke které dochází v izoelektrickém bodě. Tento fyzikálně – chemický děj ovlivňuje teplota, doba varu, pH, tlak, složení mladiny a pohyb. [23]
- *V rozpustnosti a izomeraci chmelových hořkých látek*, které závisejí na hodnotě pH mladiny. Nejpodstatnější složky jsou α -hořké kyseliny neboli humulony, které se při chmelovaru izomerují na iso- α -hořké kyseliny čili isohumulony. Tyto látky jsou nejvýznamnější pro typickou hořkost výsledného piva. Na izomeraci má vliv zejména množství a rozpustnost α -hořkých kyselin, která klesá se snižující se hodnotou pH, dále stáří chmele, složení mladiny a doba chmelovaru s ideální délkou 90 až 120 minut. Z původního počtu α -humulonů se izomeruje při chmelovaru 40 až 60 % a 5 až 15 % je ponecháno v prvotní podobě.
- *V rozpuštění a upravení dalších složek chmele a jeho produktů* a to hlavně polyfenolů, dusičnanů, dusíkatých sloučenin a lipidů.
- *Ve tvorbě produktů Maillardovy reakce*



Obr. 12: Tvorba melanoidinů při Maillardově reakci [23]

- *Ve tvorbě reduktonů a v ustavení redoxního potenciálu mladiny*
- *V zajištění oxidační reakce a to hlavně polyfenolových sloučenin.*
- *Ve zvýšení acidity při chmelovaru, tedy snížení hodnoty pH asi o 0,1 až 0,2.*

V poslední fázi přípravy mladiny se musí vyrobená mladina zchladit z teploty asi 100° C na zákvasnou teplotu 5 až 6° C. Z mladiny se musí také vyřadit jemné a hrubé kaly a nasytí se kyslíkem. [23]

2.3. Kvašení

Kvašení rozdělujeme na 2 stupně fermentace a to na hlavní kvašení a na dokvašování a zrání piva. [40]

2.3.1. Hlavní kvašení

Kvašení je nezbytná operace při výrobě piva. Do kvasných kádí se přidává 10 až 20 milionů kvasinkových buněk na 1 ml vychlazené mladiny. [45] Nejdůležitější reakcí je přeměna zkvasitelných jednoduchých cukrů na oxid uhličitý a ethanol. V hlavním kvašení vzniká zejména velké množství ethanolu a oxid uhličitý uniká. [40] Dochází i k tvorbě jiných těkavých sloučenin, jejichž koncentrace a povaha bude na závěr určovat organoleptické atributy celého komplexu. [47]

Faktory, které ovlivňují proces hlavního kvašení [23]:

- *Složení a množství mladiny*, která musí obsahovat dost zkvasitelných cukrů a dusíkaté sloučeniny, jež kvasinky lehce vstřebají. [46] Dextriny, polyfenolové, hořké a vysokomolekulární dusíkaté sloučeniny neovlivňují toto kvašení. Sirné sloučeniny, jako přirozený antioxidant oxid siřičitý, se při vaření mladiny odstraní. Růstové hormony a vitamíny jsou původem z mladiny, zejména ze sladu, kde je jich dostatek pro proces kvašení.
- *Teplota a regulace kvašení*
- *Charakter kvasinek*
- *Doba kvašení*
- *Stupeň provzdušnění mladiny a kvasnic*
- *Množství kvasnic a způsob zakvašování*
- *Stádium homogenizace směsi mladiny a kvasnic*
- *Typ a geometrie fermentoru*
- *Způsob a intenzita cirkulace*
- *Tlakové podmínky – kvašení za atmosférického tlaku či s mírným přetlakem*

Změny odehrávající se během kvašení [23] :

- *Sníží se obsah extraktu mladiny*
- *Zkvašování sacharidů.* V průběhu kvašení ubývá sacharidů a s největší rychlostí kvasí glukosa a sacharóza, která vstupuje do kvasnic v podobě glukosy a fruktosy. Když se sníží úroveň glukosy ve směsi asi o 60 %, tak je na řadě zkvašení maltosy, základního pivovarského sacharidu. [48] Fruktosa kvasí pomaleji, tím pádem může mít pivo nasládlou chuť.
- *Tvorba ethanolu a oxidu uhličitého,* tedy hlavních produktů kvašení. Část tohoto oxidu uhličitého je rozpuštěna v kvasící směsi dle Henryho zákona.
- *Změna kyselosti*
- *Změna barvy*
- *Vyvíjení redoxní kapacity*
- *Snížení obsahu dusíkatých sloučenin.* Látky s nízkou molekulovou hmotností jsou vstřebávány do kvasinek, kdežto látky s vysokou molekulovou hmotností se účinkem klesání pH odstraňují z roztoku.
- *Změny hořkých chmelových látek.* Se snížením hodnoty pH na 5 dojde prakticky k vysrážení zejména α -hořkých kyselin, poněvadž se sníží jejich rozpustnost.
- *Změny polyfenolů.* V průběhu hlavního kvašení dochází k odstranění asi 20 až 30% obsahu polyfenolových látek, zejména kondenzovaných. [46] [49]
- *Tvorba vedlejších produktů kvašení.* Produkují se především vyšší alkoholy jako jsou v první řadě isobutanol a isoamylalkohol. Dále karbonylové sloučeniny, tedy aldehydy a ketony, které mají velký význam pro sensorické vlastosti finálního produktu. Například acetaldehyd v hodnotách vyšších jak 20 mg/l přiděluje pivu sklepní či zeleninovou chuť a nepříjemné aroma. Jako další vedlejší produkty vznikající při kvašení můžeme označit Volné mastné kyseliny, organické těkavé, hůře těkavé a netěkavé kyseliny, glycerol, oxid siřičitý, dimethylsulfid a methional.

2.3.2. Dokvašování a zrání piva

Při dokvašování dochází k mírnému a pomalému zkvašování cukrů, tudíž dochází k sycení oxidem uhličitým a zároveň k číření piva. Pivo zraje v ležáckých nádobách či moderně ve velkoobjemových izolovaných nádobách, kde mění koncentraci svých aromatických těkavých látek a pivo dostává svou charakteristickou chuť a vůni.



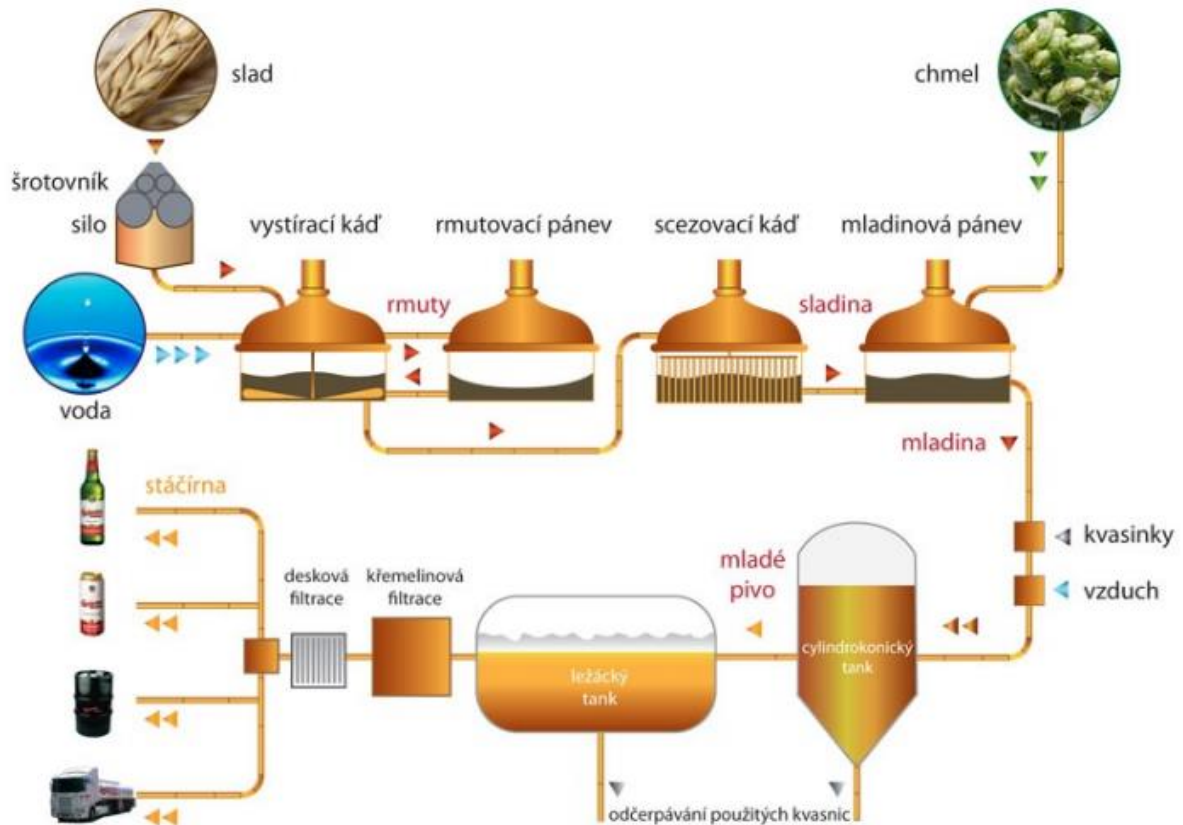
Obr. 13: Cylindrokonické tanky [23]

2.4. Filtrace, pasterizace a stáčení piva

Pivo se musí zfiltrvat kvůli odstranění kalů, dosažení požadované čirosti a stability výsledného produktu. Neobsahuje potom mikroorganismy a zákalotvorné částice, které by mohly měnit jeho složení. Filtry mohou být vláknité, pórovié nebo zrnité a práškovité. Mohou se použít filtry o různých rozměrech pórů, aby mohlo dojít k separaci odlišně velkých částic. [23]

Úkolem pasterizace je zabránit aktivitě mikroorganismů tepelnou úpravou, aby se pivo nemohlo zkazit a aby byla zaručena jeho stabilita neboli trvanlivost. [23]

Poté se musí pivo stočit do obalových materiálů, což jsou nejčastěji skleněné a plastové láhve, plechovky, sudy či tanky. Nesmí přitom docházet k únikům oxidu uhličitého nebo dalších charakteristických těkavých sloučenin a také zde nesmí být přítomen kyslík, který má negativní vliv na organoleptické vlastnosti a na trvanlivost piva. [23]



Obr. 14: Schéma výroby piva Budvar

(<http://ceskepivo-ceskezlato.cz/piva.php?on=opivu&pg=opivu18>)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. METODY A VYBAVENÍ

3.1. Chemikálie

Na přípravu standardu maltolu se použil maltol (p.a., Sigma-Aldrich) rozpuštěný v methanolu o koncentraci 1 g/l (p.a., Lach-Ner). Při volbě rozpouštědla pro extrakci byl použit ethylacetát (p.a., Lach-Ner), diethylether (p.a., Lach-Ner), hexan (p.a., Lach-Ner), tetrahydrofuran (p.a., Sigma-Aldrich), dichlormethan (p.a., Lach-Ner), chloroform (p.a., Lach-Ner), tetrachlormethan (p.a., Lach-Ner), tetrachlorethylen (p.a., Lach-Ner), terc-butyl-methyl-ether (p.a., Sigma-Aldrich), toluen (p.a., Lach-Ner). Na vysolení roztoku se využil chlorid sodný (p.a., Lach-Ner) a následná derivatizace se provedla s pomocí hexamethyldisilazanu (p.a., Lach-Ner). Jako vnitřní standard se využil m-nitrofenol (p.a., Loba – chemie, Wien – Fischamend), α -naftol (p.a., Penta), 3-bromfenol (p.a., Sigma – Aldrich) a 3,5-dibromfenol (p.a., Sigma – Aldrich)

3.2. Přístroje a zařízení

Plynový chromatograf Aglient 7890A (Aglient Technologies, Palo Alto, USA) s hmotnostním spektrometrem 5975C inert (Aglient Technologies, Palo Alto, USA) a kapilární kolonou 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Aglient Technologies, Palo Alto, USA), nosný plyn Helium 4,8 (SIAD, Bergamo, Itálie), blokový termostat SBH130 (Stuart), Centrifuga 5702 (Eppendorf).

3.3. Volba rozpouštědla

Do každé z 10 zkumavek se přidalo 9 ml odplyněného piva obsahujícího 90 μ l standardu maltolu ($c = 1$ g/l) a 2 ml rozpouštědla. Extrakční směs se důkladně protřepala a vložila se do centrifugačního zařízení dvakrát po jedné minutě a následně jednou na 4 minuty, mezi jednotlivými stáčeními se směs vždy důkladně protřepala. Po posledním stočení se odebral extrakt do čistých vialek. Vialky se vložily do blokového termostatu vytemperovaného na 60°C a rozpouštědlo se odpařilo mírným proudem dusíku. Výjimku tvořila zkumavka

obsahující tetrahydrofuran, jelikož rozpouštědlo s pivem netvořilo fázové rozhraní. Do této zkumavky se přidal 1 g síranu hořečnatého, který váže vodu a tak vyplaví na povrch THF s kterým se dále pracuje jako s ostatními extrakty. Po vysušení se do každé vialky přidá nejdříve 60 μ l piridinu a následně 60 μ l derivatizačního činidla hexamethyldisilazanu (HMDS). Vialky se zavíčkují a vloží se do termostatu vytemperovaného na 80°C, kde se maltol po dobu 30 minut derivatizuje. Poté se vialky vyjmou, nechají se ochladit a přidá se 880 μ l hexanu. Vzniklý roztok se nastříkuje do plynového chromatografu.

3.4. Opakovaná extrakce

Postupovalo se obdobně jako při volbě rozpouštědla: Do 25 ml odměrné baňky se napipetovalo 250 μ l standardu maltolu ($c = 1 \text{ g/l}$) a doplnila se po rysku odplyněným pivem. Do dvou zkumavek se přidal 10 ml vzorku piva se standardem a 2 ml rozpouštědla (EtAc, TBME). Zkumavky se protřepaly, vložily do centrifugačního zařízení 2x na 1 minutu a poté 1x na 4 minuty. Po stočení se extrakt odebral do čistých vialek a nechal se opět odpařit a profoukat dusíkem v termostatu. Do zkumavek se opět přidaly 2 ml čistého rozpouštědla a dále se postupovalo stejně. Každý extrakt byl odebrán do čisté vialky. Tento postup se opakoval ještě 2x, celkem se tedy provedly 4 extrakce. K odparku opět přidáme 60 μ l pyridinu a 60 μ l HMDS, ponechá se temperovat 30 minut při 80°C. Po ochlazení se přidá 880 μ l hexanu a roztok se nastříkuje do GC/MS.

3.5. Opakovaná extrakce s přídavkem soli

Postup je stejný jako v předchozím experimentu (5.4). Jedinou výjimku tvoří přídavek 1 g chloridu sodného (kuchyňské soli) do jedné zkumavky, druhá zkumavka zůstává bez vysolení pro porovnání výsledku experimentu.

3.6. Volba pH piva

Do šesti zkumavek se napipetovalo 10 ml piva o různém pH = 1,6; 3; 5; 7; 9 a 11. pH piva se upravovalo do alkalické oblasti hydroxidem sodným a do kyselé oblasti kyselinou chlorovodíkovou. A další postup byl opět identický s předešlým postupem (5.4).

3.7. Přídavek vnitřního standardu a standardu maltolu

Nejprve byly připraveny roztoky vnitřních standardů m-nitrofenolu (NF), α -naftolu (NAF), 3-bromfenolu (Br) a 3,5-dibromfenolu (DiBr) o koncentraci 1 g/l. Poté se do šesti jednotlivých zkumavek míchaly následující směsi:

- 1) 10 ml odplyněného piva + 100 μ l standardu maltolu + 100 μ l roztoku NF + 100 μ l roztoku NAF
- 2) 10 ml odplyněného piva + 100 μ l roztoku NF + 100 μ l roztoku NAF
- 3) 10 ml odplyněného piva + 100 μ l standardu maltolu + 100 μ l roztoku Br + 100 μ l roztoku DiBr
- 4) 10 ml odplyněného piva + 100 μ l roztoku Br + 100 μ l roztoku DiBr
- 5) 10 ml Britton-Robinsonova pufru (pH = 4,8) + 100 μ l standardu maltolu + 100 μ l roztoku Br + 100 μ l roztoku DiBr
- 6) 10 ml Britton-Robinsonova pufru (pH = 4,8) + 100 μ l standardu maltolu + 100 μ l roztoku NF + 100 μ l roztoku NAF

Poté se do všech zkumavek přidaly 2 ml ethylacetátu a opět se postupovalo podle předchozího postupu (5.4).

3.8. Kalibrace

Pro určení přesného obsahu maltolu byla použita metoda kalibrační závislosti. Koncentrace standardu maltolu v Britton-Robinsonově pufru (pH = 4,8) činila: 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 a 10 μ g/ml. Koncentrace standardu maltolu v pivu činila: 0; 0,2; 0,4 a 0,6 μ g/ml.

Poté se do všech zkumavek přidaly 2 ml ethylacetátu a 10 μ l standardního roztoku m-nitrofenolu ($c = 1$ g/l) a opět se postupovalo podle předchozího postupu (5.4).

Metoda kalibrační závislosti: Z rovnice kalibrační závislosti se vypočítal obsah maltolu v pivu.

Metoda vnitřního standardu: K 10 ml odplyněného piva ve zkumavce se přidalo 10 μ l roztoku nitrofenolu ($c = 1$ g/l) a dále se postupovalo podle postupu 5.4.

3.9. Vzorky

Vzorky piva byly pořízeny především v lokálním Rožnovském pivovaru. Z pivovaru pocházela piva polotmavý speciál Rothschild 13°, světlý ležák Radhošť 11°, světlý speciál Rožnov 13°, tmavý ležák Čert 12° a světlý speciál Baron Armín Popper 16°. V supermarketu byl koupen Zlatopramen Nealko NA, Klasik světlé výčepní 10° a Bertold světlé výčepní 10°.

Vzorky byly analyzovány metodou kalibrační závislosti a metodou vnitřního standardu.

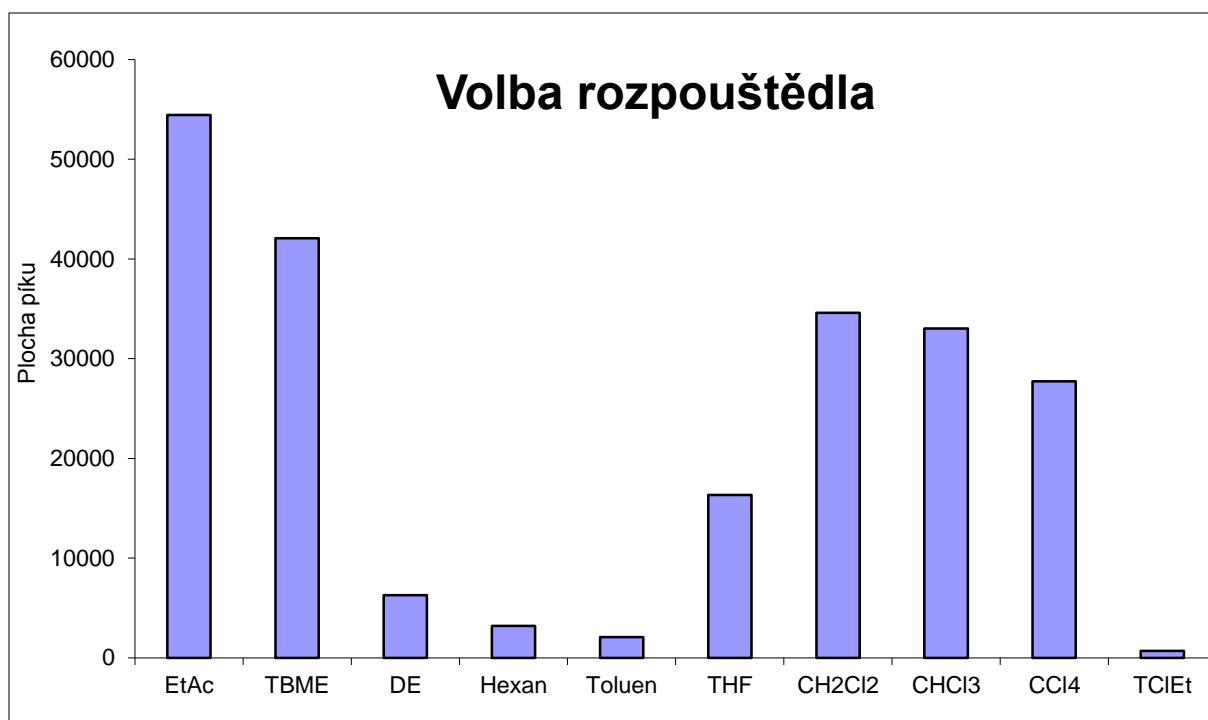
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Volba rozpouštědla

Pro optimalizační postupy bylo použito pivo Klasik světlé výčepní 10°, běžně dostupné v supermarketech.

Pro analýzu maltolu bylo nejdříve potřeba zjistit, jaké rozpouštědlo je pro extrakci kapalina-kapalina vhodné. Proto byla vybrána pro experiment následující rozpouštědla: ethylacetát (EtAc), diethylether (DE), hexan, tetrahydrofuran (THF), dichlormethan (CH_2Cl_2), chloroform (CHCl_3), tetrachlorethylen (TCIEt), *tert*-butylmethylether (TBME), toluen, tetrachlormethan (CCl_4).

Na obrázku 15 jsou uvedeny relativní plochy píku maltolu získané při jednoduché extrakci zvolenými rozpouštědly. Největších výtěžků maltolu bylo dosaženo při extrakci ethylacetátem, dobrou účinnost extrakce vykazoval i *tert*-butyl-methylether. Výrazně méně účinná byla extrakce chlorovanými rozpouštědly a tetrahydrofuranem, jako zcela nevhodná se ukázala uhlovodíková rozpouštědla. Překvapivě nízká extrakční účinnost byla pozorována v případě diethyletheru. Při extrakci piva ethylacetátem docházelo k dobrému oddělování fází, po odstředění bylo fázové rozhraní ostré a extrakční fázi bylo možné dobře oddělit. Obtížná separace fází byla zaznamenána u chlorovaných rozpouštědel a u toluenu. Vzhledem k vysokému extrakčnímu výtěžku a dobrému oddělení fází byl pro další experimenty zvolen ethylacetát.



Obr. 15: Graf účinnosti rozpouštědel při jednoduché extrakci

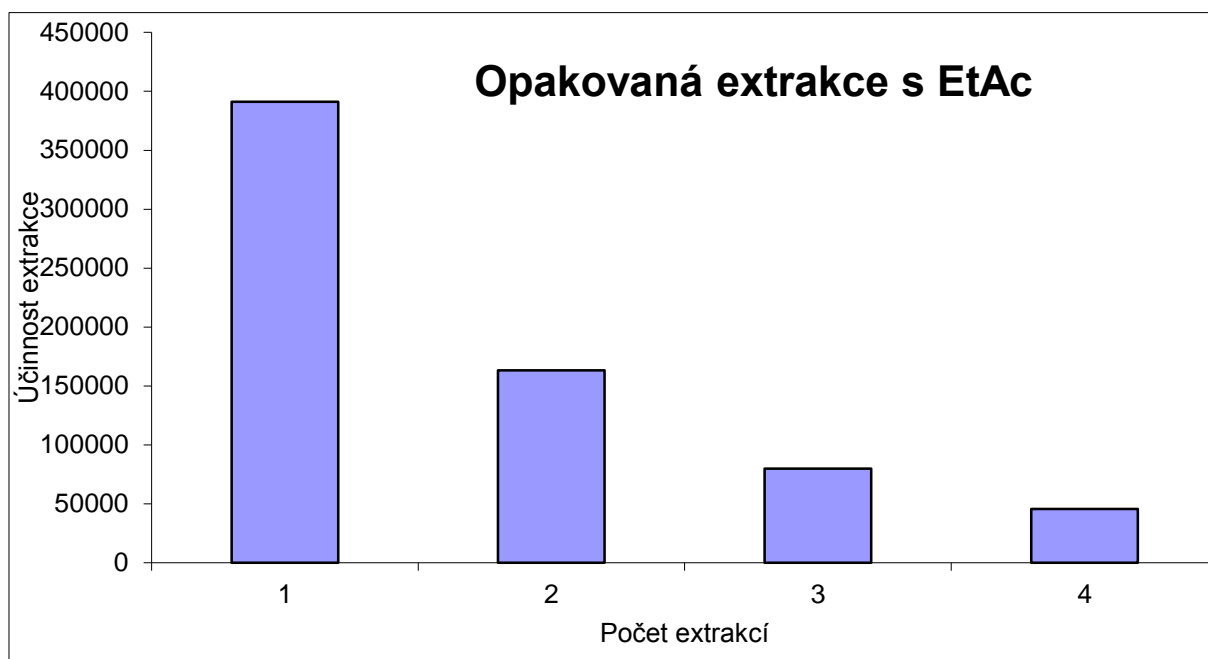
4.2. Opakovaná extrakce

Dalším krokem bylo použití vícenásobné extrakce pro zajištění vyšší výtěžnosti extrakce. Na obrázku 16 je znázorněna posloupnost čtyřnásobné extrakce s použitím ethylacetátu jako extrakčního činidla. Při prvním extrakčním kroku bylo dosaženo výtěžku 58,2%. Při druhé extrakci byla výtěžnost 21,3%, tedy celková kumulativní návratnost dvojnásobné extrakce činila 79,6%. Třetí extrakcí byla získána 8,7% návratnost, celkový výtěžek při trojnásobné extrakci tedy byl 88%.

Pro další experimenty a pro analýzu reálných vzorků bylo rozhodnuto, že se použije dvojnásobná extrakce. Větší počet extrakcí by byl ekonomicky náročný a dvojnásobná extrakce je pro tento účel postačující.

Výtěžek extrakce byl počítán podle vztahu: $k = 1 - \frac{A_2}{A_1}$

kde A_1 , A_2 jsou plochy píku odpovídající první a druhé extrakci.



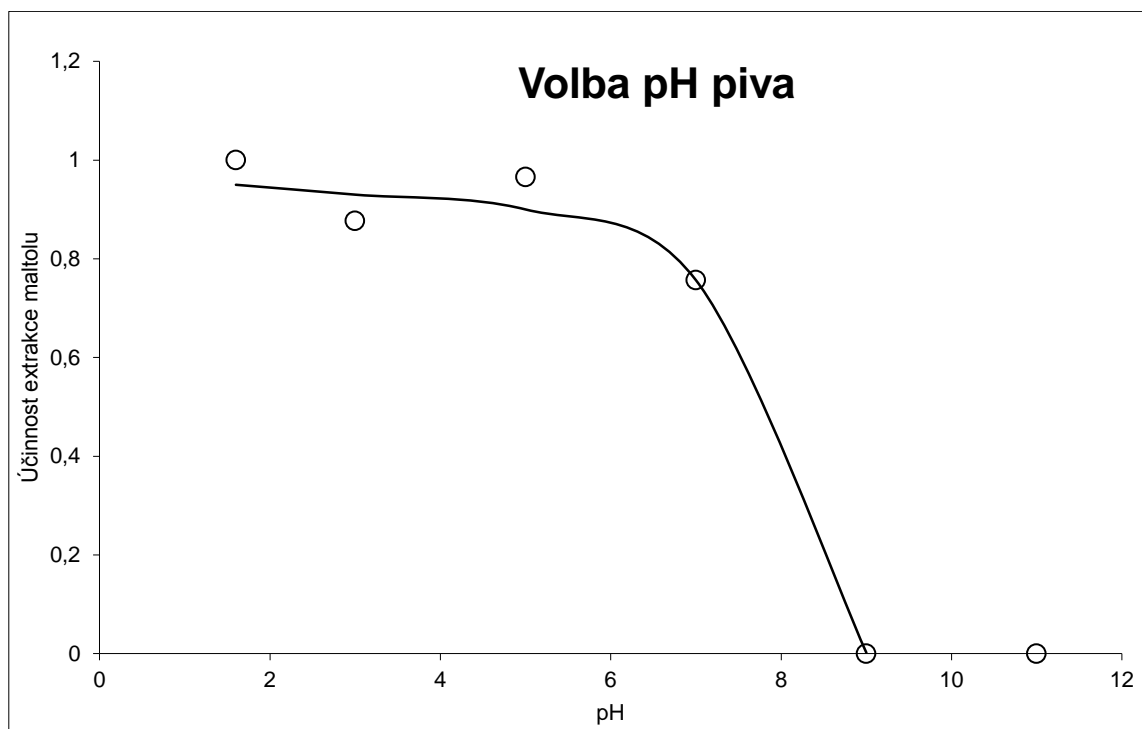
Obr. 16: Graf účinnosti ethylacetátu při opakované extrakci

4.3. Opakovaná extrakce s přidavkem soli

Následující pokus byl proveden s přidavkem soli do extrakční směsi. Výtěžek dvojnásobné opakované extrakce s vysolením činil 85%. Rozdíl v dosažené výtěžnosti při vysolení a bez vysolení činí asi 5%, z důvodu rizika kontaminace roztoku nasyceného solí nebyla tato metoda pro reálné vzorky potřebná. Citlivost extrakce pro analýzu maltolu v pivu je dostatečná, ale vysolení by mohlo být potřebné pro jiné typy vzorků.

4.4 Volba pH

Poté se sledovalo ideální pH piva vhodné pro extrakci. Z grafu na obrázku 17 lze vyčíst, že maltol v pivu je lépe extrahován v kyselější oblasti pH. Což znamená v přirozeném pH piva. Naopak v neutrálním a bazickém prostředí účinnost extrakce maltolu prudce klesá. Z tohoto důvodu se pH nijak neupravovalo a pracovalo se s přirozenými vzorky piva.



Obr. 17: Graf výtěžnosti extrakce maltolu v různých hodnotách pH piva

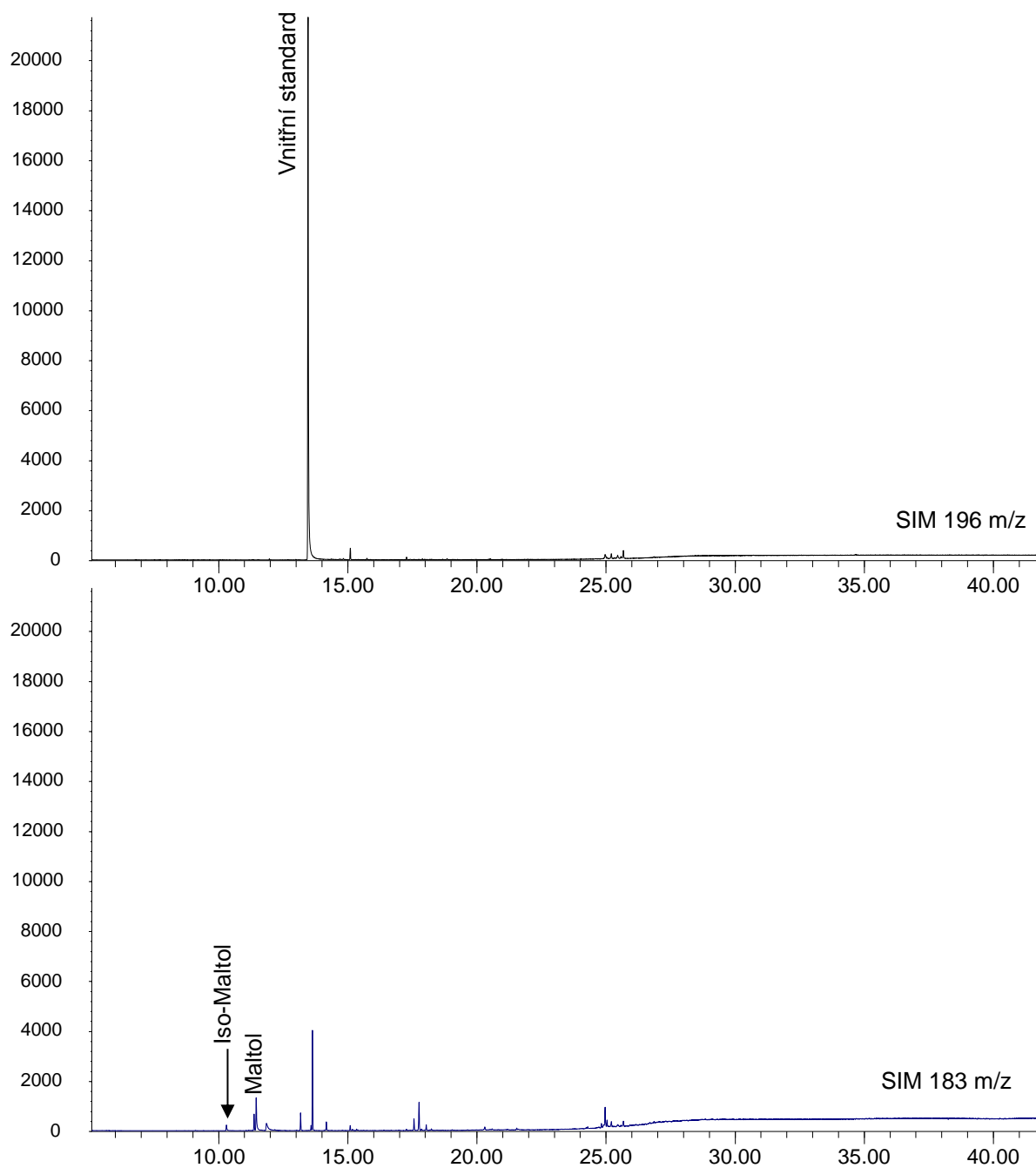
4.5. Metody kvantifikace

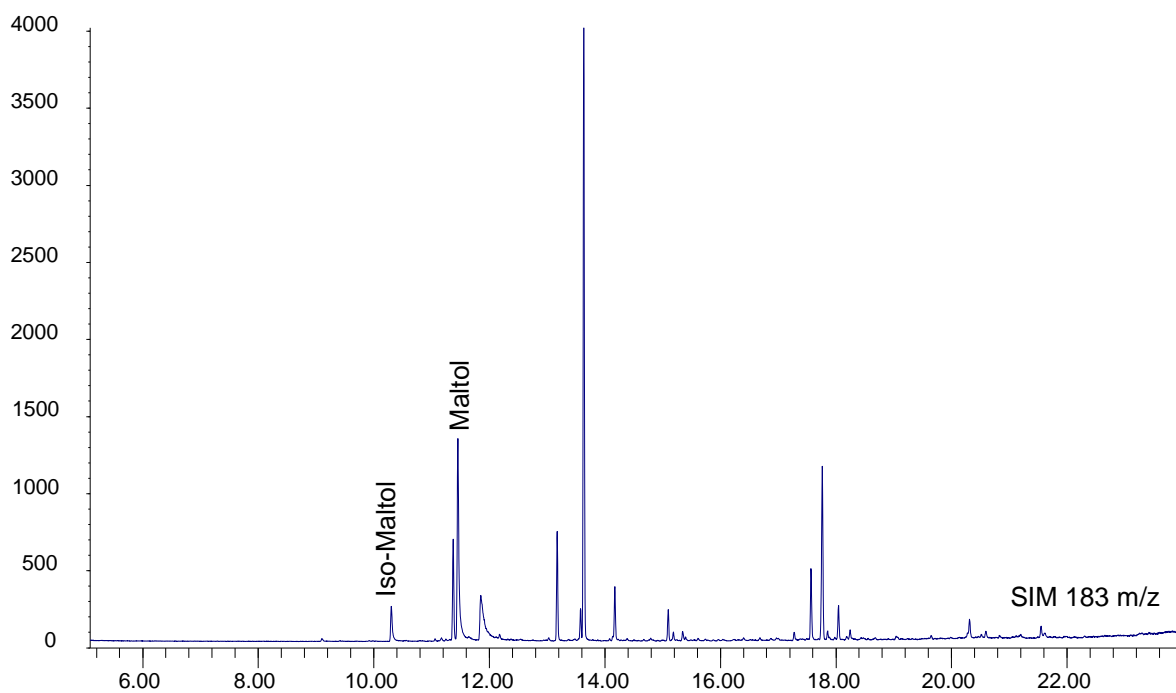
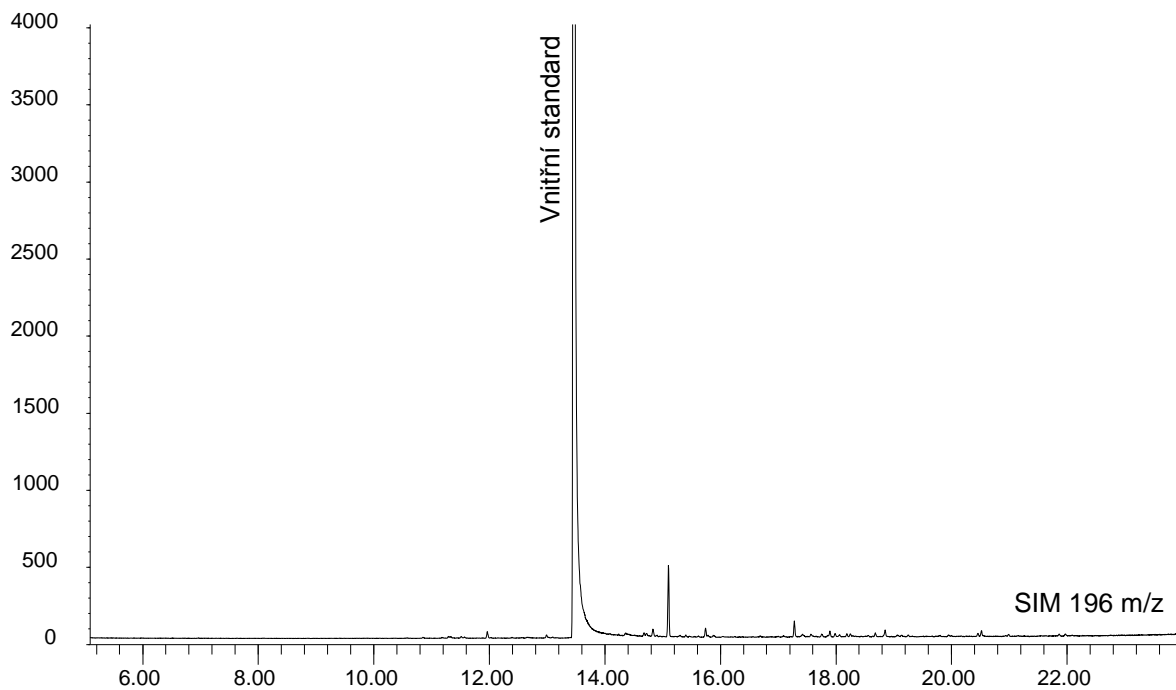
Další experiment se vztahuje ke stanovení obsahu maltolu v pivu pomocí metody vnitřního standardu, metody kalibrační závislosti a metody standardního přídávku. Tyto metody byly vybrány pro srovnání výsledků.

Jako vnitřní standard byl ze čtyř sledovaných látek vybrán nitrofenol, protože se od námi hledané látky dobře dělil. Obsahuje ve své struktuře hydroxylovou skupinu stejně jako maltol, tudíž se také silanizoval. Navíc je to vnitřní standard, který se v pivu přirozeně nevyskytuje. Píky nitrofenolu a maltolu měly stejně velkou odezvu, proto je nitrofenol ideální látka využita jako vnitřní standard pro analýzu maltolu v pivu.

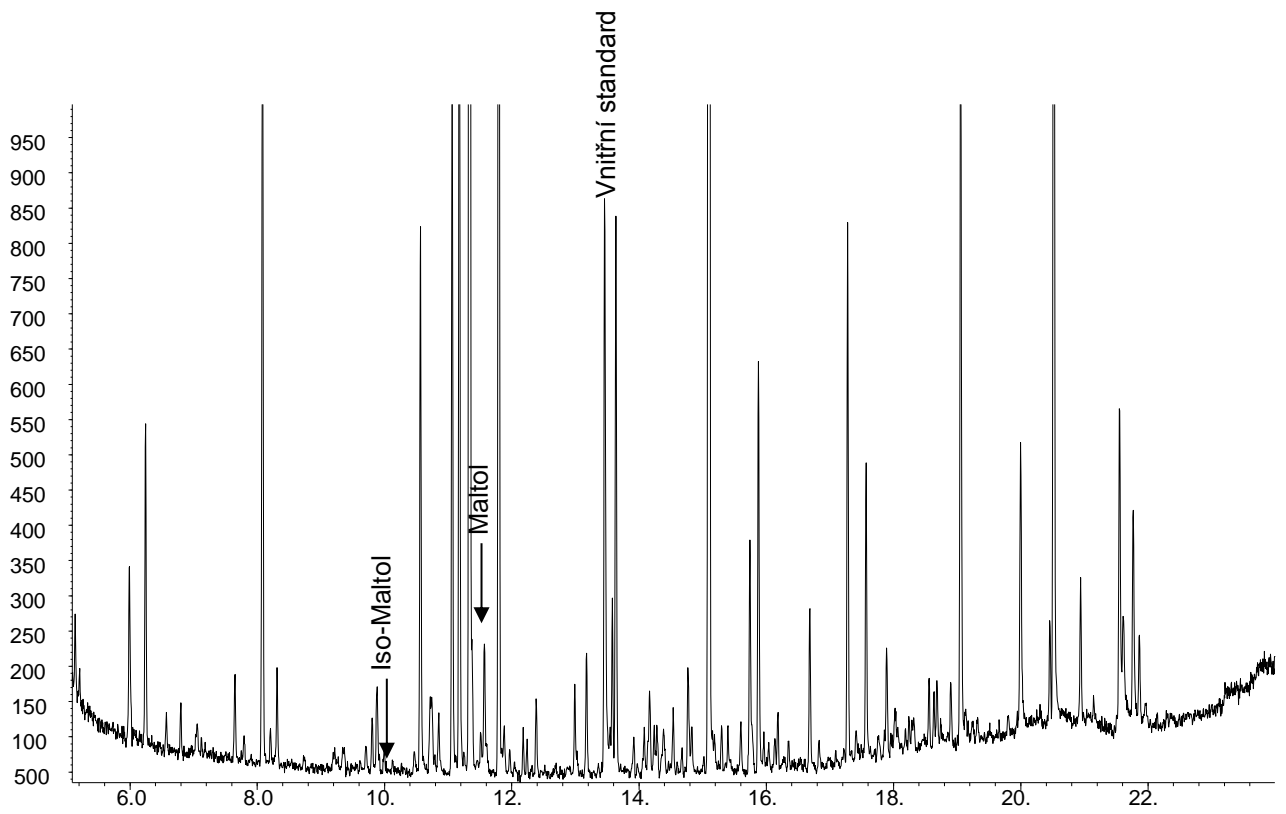
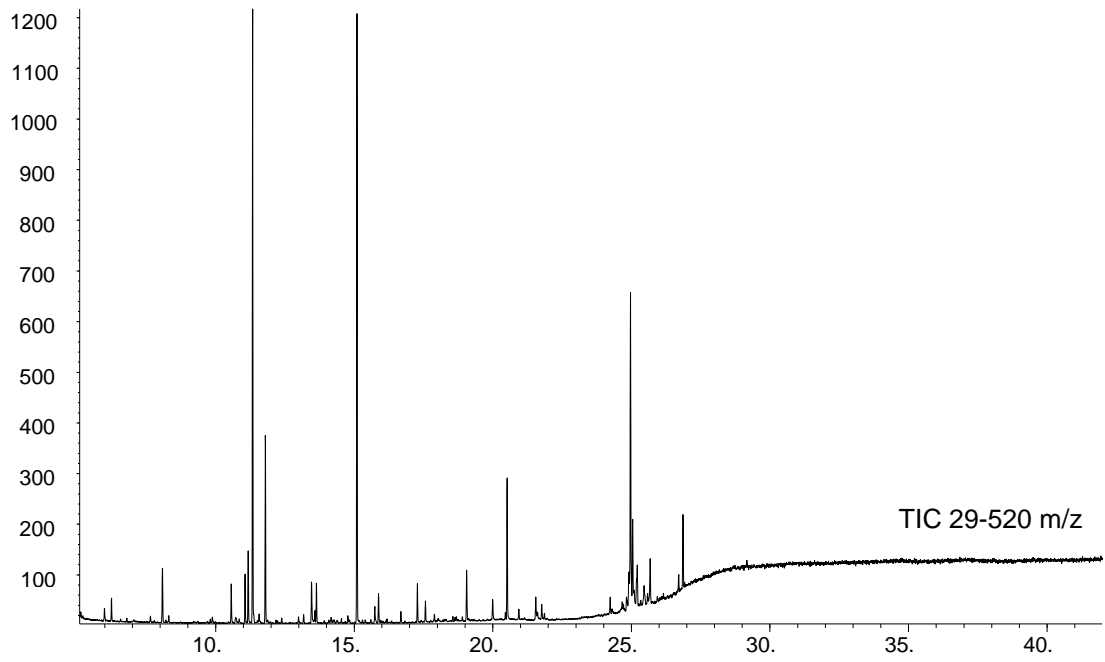
Metodou přídávku vnitřního standardu nitrofenolu byl zjištěn obsah maltolu v pivu 0,144 $\mu\text{g/ml}$. Druhou metodou pro srovnání byl standardní přídavek maltolu a touto cestou byl

nalezen obsah 0,168 $\mu\text{g/ml}$. Poslední srovnávací postup byla metoda kalibrační závislosti, ze které byl vypočten obsah maltolu v daném pivu 0,160 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky všech tří metod byly téměř srovnatelné.





Obr 18: Chromatogramy selektivně vybraných iontů (SIM)



Obr 19: Chromatogramy celkového iontového proudu (TIC)

4.6. Reálné vzorky

Pro kvantifikaci reálných vzorků byla použita metoda vnitřního standardu se srovnávací metodou kalibrační závislosti, protože tyto metody byly méně pracné. Metoda standardního přídávku byla vyzkoušena pro ověření a srovnání metod, ale pro reálné vzorky už nebyla použita.

| | Kalibrace | | Vnitřní standard | |
|------------------------------|-----------|-----------|------------------|-----------|
| | maltol | isoMaltol | Maltol | isoMaltol |
| Bertold | 0,0636 | 0,0181 | 0,0654 | 0,0284 |
| Rothschild | 1,2930 | 0,0113 | 1,9136 | 0,0101 |
| Radhošť | 0,0528 | 0,0194 | 0,1367 | 0,0334 |
| Čert | 3,0470 | 0,0415 | 3,8278 | 0,0498 |
| Rožnov | 0,2091 | 0,0276 | 0,3864 | 0,0367 |
| Popper | 0,1233 | 0,0437 | 0,1770 | 0,0542 |
| Zlatopramen nealko NA | 0,0350 | 0,0137 | 0,0402 | 0,0078 |

Tabulka 1: Hodnoty koncentrací maltolu v jednotlivých druzích piv v $\mu\text{g/ml}$

Z tabulky je zřejmé, že nejvyšší koncentraci maltolu obsahovalo černé pivo Čert v rozmezí od 3,05 do 3,83 $\mu\text{g/ml}$. Druhý nejvyšší obsah maltolu vykazovalo polotmavé pivo Rothschild s koncentrací maltolu od 1,29 do 1,91 $\mu\text{g/ml}$. Naopak nejnižší koncentrace maltolu se ukázala u nealkoholického piva Zlatopramen nealko NA, u kterého se obsah maltolu pohybuje v rozmezí od 0,035 do 0,04 $\mu\text{g/ml}$. U ostatních světlých piv byla nalezena koncentrace maltolu od 0,05 do 0,39 $\mu\text{g/ml}$.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout vhodné podmínky pro analýzu maltolu v pivu a jeho následné stanovení. Vzorky piva byly pořízeny zejména v lokálním Rožnovském pivovaru.

V první řadě bylo voleno rozpouštědlo pro extrakci kapalina-kapalina. Z deseti testovaných rozpouštědel vykazoval ethylacetát nejvyšší výtěžnost a nejlepší fázové rozhraní. Pro lepší návratnost byla využita metoda opakované extrakce, kde na základě dvou extrakčních kroků se stanovil výtěžek 79,6%. Testovala se také extrakce s vysolením pomocí chloridu sodného. Návratnost byla 85%, tedy asi o 5% více než bez použití soli. Vysolení při extrakci reálných vzorků nebylo použito, protože zde hrozí riziko kontaminace a při ohledu na tuto skutečnost můžeme diferenci považovat za zanedbatelnou. Důležitou roli hraje také pH. Bylo zjištěno, že je maltol dobře extrahován v kyselejší oblasti pH. Tedy v oblasti přirozeného pH piva a proto se nijak neupravovalo.

Způsob kvantifikace maltolu v pivu byl pro srovnání proveden třemi metodami. Metodou kalibrační závislosti, metodou vnitřního standardu a metodou standardního přídávku. Koncentrace maltolu stanovená všemi třemi metodami byla srovnatelná. Pro analýzu reálných vzorků byla vybrána metoda kalibrační závislosti a metoda vnitřního standardu.

Jak bylo předpokládáno, nejvyšší koncentrace maltolu byla nalezena u tmavých piv. Na druhou stranu nejnižší obsah maltolu byl stanoven u světlých nealkoholických piv.

SEZNAM LITERATURY

- [1] M. Xinying a CH. Mingyong . *Electrocatalytic determination of maltol in food products by cyclic voltammetry with a poly(l-phenylalanine) modified electrode*. Analytical Methods . 2013, **20**, 5823- [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1039/c3ay41142g. ISSN 1759-9660.
- [2] M. Fátima Barroso, M. Goretif F. Sales, Sofia A. A. Almeida, M. Carmo V.F. Vaz and C. Delerue-Matos. *Maltol Determination in Food by Microwave Assisted Extraction and Electrochemical Detection*. Journal of Food and Drug Analysis. 2008, **16**, 30-36. [cit. 2017-03-17]
- [3] T. Gan, S. J. Sun, M. YU, K. Wang, Z. LV and Y. Liu . *Amplified electrochemical determination of maltol in food based on graphene oxide-wrapped tin oxide@carbon nanospheres*. Food Chemistry. 2016, **214**, 82-89. [cit. 2017-03-17]
- [4] Čejka P. *Faktory ovlivňující senzorické vlastnosti piva*. VÚPS Praha, Pivovarský ústav, 1997.
- [5] Ch. Ma, Y. He, Y. Cao, X. Bai a H. Li. *Analysis of flavour compounds in beer with extruded sorghum as an adjunct using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of the Institute of Brewing. 2016, **122**, 251-260 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1002/jib.330. ISSN 00469750.
- [6] M. Riu-Aumatell, P. Miró, A. Serra-Cayuela, S. Buxaderas a E. López-Tamames. *Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME–GC-MS*. Food Research International. 2014, **57**, 196-202. [cit. 2017-03-16]
- [7] C. Beddows. *The chemistry behind beer flavor*. SciTech Connect. 2015. [cit. 2017-03-16] (<http://scitechconnect.elsevier.com/chemistry-behind-beer-flavor/>)

- [8] K. A. Thompson-Witrick, R. L. Rouseff, K. R. Cadawallader, S. E. Duncan, W. N. Eigel, J. M. Tanko and S. F. O'Keefe. *Comparison of Two Extraction Techniques, Solid-Phase Microextraction Versus Continuous Liquid-Liquid Extraction/Solvent-Assisted Flavor Evaporation, for the Analysis of Flavor Compounds in Gueuze Lambic Beer*. Journal of Food Science. 2015, 80, C571-C576 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1111/1750-3841.12795. ISSN 00221147.
- [9] L. Dong, Y. Hou, F. Li, Y. Piao, X. Zhang, X. Zhang, Ch. Li and Ch. Zhao. *Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars*. Science of Food and Agriculture. 2015, 95, 915-921. [cit. 2017-03-16]
- [10] C. Andrés-Iglesias, J. García-Serna, O. Montero and C. A. Blanco. *Simulation and flavor compound analysis of dealcoholized beer via one-step vacuum distillation*. Food Research International. 2015, 76(3), 751-760. [cit. 2017-03-16]
- [11] O. Oladokun, A. Tarrega, S. James, T. Cowley, F. Dehrmann, K. Smart, D. Cook and J. Hort. *Modification of perceived beer bitterness intensity, character and temporal profile by hop aroma extract*. Food Research International. 2016, **86**, 104-111. [cit. 2017-03-16]
- [12] P. Schieberle. *Primary odorants of pale lager beer*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. 1991, 193(6), 558-565 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1007/BF01190873. ISSN 0044-3026.
- [13]H. Maarse. *Volatile compounds in foods and beverages*.. Food science and technology .44. New York, 1991. ISBN 9780824783907. [cit. 2017-03-16]
- [14] M. B. Hirst. and C. L. Richter. *Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of Saccharomyces cerevisiae in Beverage Fermentations*. American Journal of Enology and Viticulture. 2016, 67, 361-370 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.5344/ajev.2016.15098. ISSN 0002-9254.

[15] L. Rong, L. J. Peng, Ch.T. Ho, S. H. Yan and M. Meurens. *Brewing and volatiles analysis of three tea beers indicate a potential interaction between tea components and lager yeast*. Food Chemistry. 2016, 197, 161-167. [cit. 2017-03-16]

[16] <https://en.wikipedia.org/wiki/Maltol> [cit. 2017-03-17].

[17] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB30776> [cit. 2017-03-17].

[18] G. A. F. Harrison. *The flavour od beer - review*. Journal of the Institute of Brewing. Dublin, 1970, **76**. [cit. 2017-03-17].

[19] J. Zhou, K. Zhang, Y. Li, K. Li and B. Ye. *Study on the electrochemical properties of maltol at a carbon paste electrode and its analytical application*. Analytical Methods . 2012, **4**, 3206- [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1039/c2ay25514f. ISSN 1759-9660.

[20] J. Velíšek aj. Hajšlová. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6. [cit. 2017-03-17]

[21] N. Göncüoğlu Taş, V. Gökmen. *Maillard reaction and caramelization during hazelnut roasting: A multiresponse kinetic study*. Food Chemistry. 2016, **221**, 1911-1922. [cit. 2017-03-17]

[22] M. Rubio-Flores and S. O. Serna-Saldivar. *Technological and Engineering Trends for Production of Gluten-Free Beers*. DOI: 10.1007/s12393-016-9142-6. ISBN 10.1007/s12393-016-9142-6. [cit. 2017-03-17]

[23] G. Basařová. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7. [cit. 2017-03-17]

[24] V. Stojanová. *Výroba sladu a piva v České republice, homebrewing a minipivovary*. Brno, 2015. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Prof. Dr. Ing. Luděk Hřivna. [cit. 2017-03-17]

- [25] A. D.Beal and D. S. Mottram. *Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1994, **42**, 2880-2884 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1021/jf00048a043. ISSN 0021-8561.
- [26] D. Langos, M. Granvogl and P. Schieberle. *Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Bavarian Wheat Beers by Means of the Sensomics Approach*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013, **61**, 11303-11311 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1021/jf403912j. ISSN 0021-8561.
- [27] B. K. Simpson Ph.D. and R. Willaert Ph.D. *Biochemistry of beer fermentation*. Oxford, 2012. ISBN 978-3-319-15188-5. [cit. 2017-03-17]
- [28] T. Dolníčková. *Výroba piva CHZO „České pivo“ a piva vyráběného v EU*. Brno, 2015. Mendelova Univerzita v Brně. Vedoucí práce Doc. Ing. Jindřiška Kučerová, Ph.D. [cit. 2017-03-17]
- [29] M. Mészáros. *Technologie výroby specifických druhů piva*. Zlín, 2012. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Mgr. Iva Burešová, Ph.D. [cit. 2017-03-17]
- [30] L. Narziss. *Die Bierbrauerei*, Vol. 2: Die Technologie der Würzebereitung, 6. Auflage. Stuttgart: F. Enke Verlag, 1985. 385. ISBN 3-432-85006-9. [cit. 2017-03-17]
- [31] H. Friedlová. *Voda jako základní surovina pro výrobu piva*. Brno, 2009. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. Jindřiška Kučerová, Ph.D. [cit. 2017-03-17]
- [32] K. Schuster, F. Weinfurtner and L. Narziss. *Die Bierbrauerei; Zweiter Band; Die Technologie der Würzebereitung*. 7. vyd. Stuttgart, 1992, 402. [cit. 2017-03-17]
- [34] Ch. Dai, R. He, W. Zhang and H. Ma. *Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae*. Ultrasonics Sonochemistry. 2016, 36, 191-197. [cit. 2017-03-17]

- [35] K. Krogeru, F. Magalhães, V. Vidgren and B. Gibson. *Novel brewing yeast hybrids: creation and application*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2017, 101, 65-78 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1007/s00253-016-8007-5. ISSN 0175-7598.
- [36] A. L. Chagas, A. O. Rios, A. Jarenkow, N. R. Marcílio, M. A. Z. Ayub and R. Rech. *Production of carotenoids and lipids by Dunaliella tertiolecta using CO₂ from beer fermentation*. Process Biochemistry. 2015, 50, 981-988. [cit. 2017-03-17]
- [37] S. Arena, G. Renzone, Ch. D'Ambrosio, A. M. Salzano and A. Scaloni. *Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies*. Food Chemistry. 2016, **219**, 477-489. [cit. 2017-03-17]
- [38] S. Y. Yang, S. Lee, M. Ch. Pyo, H. Jeon, Y. Kim and K. W. Lee. *Improved physicochemical properties and hepatic protection of Maillard reaction products derived from fish protein hydrolysates and ribose*. Food Chemistry. 2016, **221**, 1979-1988. [cit. 2017-03-17]
- [39] https://en.wikipedia.org/wiki/Beer_style [cit. 2017-03-17]
- [40] T. Hasík. *Svět piva a piva světa*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4648-7. [cit. 2017-03-17]
- [41] B. Verhoef. *Kompletní encyklopedie piva: podrobný průvodce světem lahodného pěnivého moku*. 2. vyd. Dobřejovice: Rebo Productions, 2004, 304. ISBN 80-7234-116-2 [cit. 2017-03-17]
- [42] D. E. Briggs, R. Stevens, T.W. Young and J. S. Hough. *Malting and brewing science*. 2. ed. London [u.a.]: Chapman a. Hall, 1982. ISBN 0412165902. [cit. 2017-03-17]
- [43] *Proceedings of the 27th Congress: Cannes 1999*. Zoeterwoude, the Netherlands: EBC, 1999. ISBN 9070143208. [cit. 2017-03-17]

[44] European Brewery Convention. *European Brewery Convention: proceedings of the 25th Congress Brussels 1995*. Oxford: OIRL Press at Oxford University Press, 1995. ISBN 0199636141. [cit. 2017-03-17]

[45] A. D. Rodman and D. I. Gerogiorgis. *Dynamic Simulation and Visualisation of Fermentation: Effect of Process Conditions on Beer Quality*. IFAC-PapersOnLine. 2016, **49**, 615-620. [cit. 2017-03-17]

[46] M. Moll: *Beer & Coolers*, English ed. Andover Hampshire: Intercept LTD, 1994, 495. ISBN 1-898 298-2. [cit. 2017-03-17]

[47] O. P. Haefliger and N. Jeckelmann. *Stripping of aroma compounds during beer fermentation monitored in real-time using an automatic cryotrapping sampling system and fast gas chromatography/mass spectrometry*. Analytical Methods. 2013, **5**, 4409- [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1039/c3ay40647d. ISSN 1759-9660.

[48] R. Willaert. *Hydrocarbon metabolism of lager yeast*. Cerevisia. 2001, **26**, 43-47. [cit. 2017-03-17]

[49] J.R.A. Pollock. VOL. 2. *Brewing science*. London: Academic Press, 1981. ISBN 0125610025. [cit. 2017-03-17]