

# **Průběh fermentace mladiny z pohledu čerpání zkvasitelných cukrů kvasičnou kulturou**

Bc. Dagmar Kovaříková

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dagmar Kovaříková**  
Osobní číslo: **T14407**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Průběh fermentace mladiny z pohledu čerpání zkvasitelných cukrů kvasničnou kulturou**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Výroba sladiny a mladiny.
2. Chemické složení mladiny; mladina jako zdroj substrátů pro mikroorganismy.
3. Biochemické procesy v rámci kvašení mladiny.
4. Kultury kvasinek používané při výrobě piva a jejich nároky na růstové prostředí.

### II. Praktická část

1. Sledování fermentace mladiny vybranými kvasničnými kulturami v různých časových intervalech.
2. Stanovení vybraných sacharidů (zvláště maltózy a glukózy) metodou HPLC-RI, stanovení pH vzorků mladiny, kvasící mladiny a mladého piva.
3. Doplňkové měření
4. Závěr a diskuze získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] **BASAŘOVÁ, G., ŠAVEL, J., BASAŘ, P., LEJSEK, T.** Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. 2010, Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN: 978-80-7080-734-7.

[2] **LEWIS, M. J., YOUNG, T. W.** Brewing. 2012, New York: Springer Science & Business Media. ISSN: 978-0-306-47274-9.

[3] **ŠKACH, J., SLABÝ, M.** Vážíme si dostatečně kvasinek? 2009, Kvasný průmysl, roč. 55, s. 2-8. ISSN: 0023-5830.

[4] **MATOULKOVÁ, D.** Pivovarství a taxonomie pivovarských kvasinek. 2007, Kvasný průmysl, roč. 53, s. 206-214. ISSN: 0023-5830.

[5] **WHITE, Ch., ZAINASHEFF, J.** Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation. Colorado: Brewers Association. ISBN: 978-0-937381-96-0.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Eva Lorencová, Ph.D.**  
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: KOVÁŘIKOVÁ DAGMARObor: TECHNOLOGIE PŘÍROD

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 11. 5. 2017

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá průběhem fermentace z pohledu čerpání vybraných sacharidů (maltóza, glukóza a fruktóza) pivovarskými kvasinkami. V rámci praktické části byl proveden pokus za účasti dvou kmenů komerčních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* Saflager W-34/70 a *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 a dvou kmenů získaných z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 a *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146. Proces fermentace byl proveden se všemi čtyřmi kmeny za dvou různých teplot (10 °C a 25 °C) a sledován byl po dobu 9 dní, v průběhu kterých byly prováděny pravidelné odběry vzorků. U každého vzorku byl analyzován pomocí HPLC s detektorem RI obsah sacharidů a provedena doplňková měření - hustota, pH, optická densita a celkový počet mikroorganismů. Rychlejší utilizace probíhala za teploty 25 °C. Při obou teplotách byla nejrychleji ze sledovaných sacharidů využívána glukóza, poté následovala fruktóza a jako poslední maltóza. Mezi průběhem zkvašování maltózy, glukózy a fruktózy použitými kmeny byly pozorovány odchylky.

Klíčová slova: mladina, zkvasitelné cukry, pivovarské kvasinky, fermentace, maltóza, glukóza, HPLC-RI

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with the process of fermentation from the perspective of utilisation of carbohydrates (maltose, glucose and fructose) by brewer's yeast. In the practical part, there was an experiment with two strains of commercial yeasts *Saccharomyces cerevisiae* Saflager W-34/70 and *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 and two strains *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 146 obtained from the Research Institute of Brewing and Malting, PLC. The fermentation process was performed with all four strains at two different temperatures (10 °C and 25 °C) and was followed for 9 days during which regular sampling was performed. For each sample, the carbohydrate content was analyzed by HPLC-RI and additional measurements were made at the same time (specific gravity, pH, optical density and total number of microorganisms). More effective utilisation was processed at the temperature 25 °C. At both temperatures, glucose was the fastest utilised carbohydrate, followed by fructose and the last maltose. Differences were observed among the utilisation of maltose, glucose and fructose.

Keywords: wort, fermentable carbohydrates, brewer's yeast, fermentation, maltose, glucose, HPLC-RI



Ráda bych poděkovala Ing. Eva Lorencové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost při zpracování diplomové práce. Velmi si cením také možnosti, že jsem pod jejím vedením mohla jako neslyšící samostatně pracovat v laboratoři a provést modelové kvašení piva se sledováním zvolených parametrů. Poděkování patří také Ing. Zuzaně Bubelové, PhD., která mi poskytla výsledky z měření HPLC-RI. Dále bych ráda poděkovala odbornému tlumočnickovi a asistentovi panu Mgr. Tomášovi Prušovi za čas a rady, které mi věnoval, a za zajištění tlumočení a přepis na přednáškách a laboratořích v průběhu studia. Na závěr mé poděkování patří partnerovi a rodině za podporu ve studiu i pochopení.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

**OBSAH**

<b>Úvod .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Výroba sladiny a mladiny .....</b>	<b>14</b>
1.1. Suroviny pro výrobu piva .....	14
1.1.1. Slad .....	14
1.1.2. Náhražky sladu .....	15
1.1.3. Voda.....	16
1.1.4. Chmel.....	17
1.1.5. Chmelové přípravky .....	18
1.2. Výroba sladiny.....	19
1.2.1. Máčení .....	19
1.2.2. Klíčení.....	19
1.2.3. Sušení (hvozdění) .....	20
1.2.4. Šrotování sladu .....	20
1.2.5. Vystírání.....	21
1.2.6. Rmutování.....	22
1.2.7. Scezování .....	24
1.3. Výroba mladiny .....	25
1.3.1. Chmelovar.....	25
1.3.2. Chlazení a odlučování kalů.....	28
<b>2. Chemické složení mladiny .....</b>	<b>29</b>
2.1. Mladina jako zdroj substrátů pro mikroorganismy.....	29
2.2. Nároky kvasinek používaných při výrobě piva na růstové prostředí.....	31
2.3. Mikrobiální kontaminace .....	34
<b>3. Biochemické procesy při výrobě piva .....</b>	<b>37</b>
3.1. Metabolismu sacharidů .....	37
3.2. Biochemické procesy v rámci kvašení mladiny .....	38
3.2.1. Tvorba etanolu a CO <sub>2</sub> .....	40
3.2.2. Tvorba vyšších alkoholů .....	40
3.2.3. Tvorba dalších sensoricky významných látek .....	40
3.3. Stresové faktory pivovarských kvasinek .....	41
<b>4. Kultury kvasinek používané při výrobě piva .....</b>	<b>44</b>
4.1. Pivovarské kvasinky .....	44

---

4.2.	Svrchní a spodní pivovarské kvasinky.....	44
4.3.	Divoké kvasinky .....	45
4.4.	Kmenové sbírky.....	46
<b>5.</b>	<b>Cíle.....</b>	<b>48</b>
5.1.	Hlavní cíl: .....	48
5.2.	Podcíle: .....	48
<b>6.</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>48</b>
6.1.	Přístroje a pomůcky .....	48
6.2.	Média a chemikálie .....	49
6.3.	Kvasinky .....	49
6.4.	Kultivace kvasinek v médiu a v mladině .....	49
6.5.	Stanovení vybraných sacharidů metodou HPLC-RI.....	50
6.6.	Příprava vzorku pro stanovení sacharidů.....	51
6.7.	Doplňková měření.....	52
<b>7.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>65</b>
	<b>Závěr .....</b>	<b>69</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>70</b>
	<b>Seznam použitých symbolů a zkratek.....</b>	<b>81</b>
	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>83</b>
	<b>Seznam Příloh .....</b>	<b>84</b>

## ÚVOD

V České republice patří pivo mezi oblíbené nápoje, jehož obliba v současné době stále roste. Na trhu se objevují nová piva, což klade vysoké nároky na jeho výrobu. Kvalita surovin, vč. kvality kvasinek rozhoduje o kvalitě výsledného nápoje. Substrátem pro pivovarské kvasinky jsou zkvasitelné cukry v mladině, proto jejich obsah a dostupnost rozhodují o rychlosti a efektivitě fermentačního procesu.

Hlavními sacharidy mladiny jsou monosacharidy glukóza a fruktóza, disacharidy maltóza a sacharóza a trisacharid maltotrióza. Tyto sacharidy vznikají z polysacharidů kaskádou štěpení a v procesu výroby sladiny a mladiny se uvolňují do roztoku. Kvasinky tyto sacharidy nejprve musí transportovat dovnitř své buňky a procesem anaerobní glykolýzy vytváří ethanol. Porozumění podmínkám ovlivňujícím rychlost a efektivitu utilizace cukrů umožňuje lépe řídit kvasný proces ve velkovýrobě i v malovýrobě.

Cílem diplomové práce byl popis chování vybraných čtyř kmenů kvasinek vhodných pro spodně kvašená a svrchně kvašená piva v laboratorně připravené mladině a analýza obsahu zkvasitelných cukrů v této mladině v průběhu fermentačního procesu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1. VÝROBA SLADINY A MLADINY

Základem pro výrobu piva jsou použité suroviny. Jejich kvalita je základem pro výrobu kvalitního výsledného nápoje. Ze surovin se nejprve připravuje sladina, což je roztok mletý slad vařený v pitné vodě, ze kterého se po scezení odpařuje voda. Výsledný produkt získaný infúzním nebo dekokčním způsobem je zahuštěný a se snahou zachovat hlavní složky výtažku, zejm. maltózu. Sladina je tedy roztok s extrahovanými látkami ze sladu po rmutování. Povařením sladiny s chmelem se získává mladina, někdy označovaná za „mladé pivo“. Mladina tak obsahuje nejen zkvasitelné látky ze sladu či sladových náhražek, ale i extraktivní látky z chmele a chmelových produktů. Výroba mladiny je důležitou fází při výrobě piva, někdy také označovanou za „vaření piva“, na kterou navazuje kvašení mladiny (hlavní kvašení), dokvašování, závěrečné úpravy a stáčení. Výroba z hlediska složení surovin a podmínek výroby se nastavuje dle druhu vyráběného piva.

### 1.1. Suroviny pro výrobu piva

Finální výrobek pivovarského průmyslu – pivo - je nápoj připravený ze tří základních surovin – sladu, chmele a vody a to procesem kvašení kulturními pivovarskými kvasinami.

#### 1.1.1. Slad

Slad jako výchozí surovina se vyrábí ve sladovnách ze sladovnického ječmene naklíčením a hvozdním. Jednotlivé druhy sladů s typickými vlastnostmi se získají úpravou technologií máčení a klíčení ječmene. Je tak možné regulovat biosyntézu a aktivitu sladových enzymů působících na určité složky extraktu. Ovlivnit tak lze především míru degradace vysokomolekulárních látek, redoxní potenciál či aciditu sladu (Basařová, 2010).

Pro přípravu sladu jsou využívány převážně odrůdy jarního ječmene setého dvouřadého variety níčí (*Hordeum distichum* var. *nutans*) a v menší míře také odrůdy jiných obilnin, např. pšenice, kukuřice, prosa (jáhelny slad) (Hájek, 2005). Ječmen má pluchaté zrno, byly ale vyšlechtěny i odrůdy s bezpluchým zrnem (Burešová, 2013). Ječmen pěstovaný v České republice je možné rozdělit na:

- dvouřadý (jarní) určený pro výrobu sladu, což je základní surovina pro výrobu piva. Pro výrobu Českého piva zapsaného v Rejstříku chráněných zeměpisných označení byla vytvořena nová kategorie doporučených sladovnických odrůd.

- víceřadý (ozimý), který se používá na výrobu krmiva (Burešová, 2013).

Druh vyrobeného sladu se řídí podle nastavení teploty sušícího vzduchu, při nižší teplotě se vyrábějí světlé slady, při zvyšování teploty sušícího vzduchu se získávají tmavší slady. Rozdělení sladů podle barvy (Prokeš 2017; Chládek, 2007):

- světlý slad – charakteristický příznivým extraktem a dostatečnou enzymatickou silou, s nízkou barvou, sloužící k výrobě světlého, lehkého a speciálního piva.
- bavorský slad je charakteristický vysokou barvou, výraznějším aromatem, čehož se dosáhne výrazně hlubším rozluštěním při klíčení. Ječmen pro výrobu bavorského sladu je klíčen (luštěn) o 1–2 dny déle s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě. Zelený slad je přelustěn a odlišně hvozděn s cílem podpořit tvorbu melanoidů. Dotahován je při teplotách okolo 105 °C. Obsah vody je okolo 2 %.

Další typy speciálních sladů slouží pro zvýraznění určitých kvalitativních a specifických vlastností základních typů světlých a tmavých piv či pro výroby charakteristických odlišných vlastností, např. diastatický slad, karamelový slad, barvicí slad a pšeničný slad (Basařová, 2010; Prokeš, 2017).

### 1.1.2. Náhražky sladu

Kromě sladu se při výrobě piva mohou používat sladové náhražky, což se činí často z ekonomických důvodů, z důvodu dostupnosti samotného ječného sladu, nebo z technologických či obchodních důvodů. Nahrazování tradičních surovin, čili surogace, se děje částečně a spíše v zemích s menší pivovarnickou tradicí nebo právě z ekonomických důvodů v nadnárodních společnostech. Lze se s nimi setkat při výrobě běžných i speciálních piv. Tyto náhražky lze dělit různými způsoby, nejčastěji na škrobnaté a cukernaté náhražky. Škrobnaté náhražky jsou tepelně opracované obilniny (nesladový ječmen, triticales, rýže, kukuřice, pšenice aj.), obilné vločky (z ječmene, pšenice či ovsu), přečištěné frakce obilných zrn (kukuřice, rýže, čirok), předvařené obilné vločky (z kukuřice a rýže), obilné mouky, obilné škroby (bramborový, tapiokový) aj. Cukernaté sladové náhražky představuje řepný a třtinový cukr (sacharóza – surová i rafinovaná), invertní cukr (po enzymové hydrolýze sacharózy), hydrolyzáty škrobů, hydrolyzáty sladových výtažků, glukosové a dextrinové sirupy z bramborového, pšeničného popř. kukuřičného škrobu, mladinové extrakty (koncentráty) aj. (Basařová, 2015; Cejpek, 2014; Malomo, 2012).

Surogace může usnadnit výrobu a snížit náklady na ni. Nahrazování surovin se však může projevit v senzoričných vlastnostech výsledného nápoje. Při výrobě s použitím sladových náhražek je třeba dbát na enzymatickou aktivitu. Při zpracování více než 15 % podílu škrobnatých náhražek zpravidla nestačí sladové enzymy a musí se použít enzymové preparáty. Příkladem použití nesladové obiloviny může být např. čirok či jáhly, které se používají jako pomocné látky s cílem odlehčit chuť piva za současného snížení nákladů na výrobu piva. Čirok se používá pro výrobu piva v některých rozvojových zemích v Africe, což je dáno nepříznivým podnebím pro pěstování ječmene (Schnitzenbaumer, 2014).

Zvláštní skupinou sladových náhražek jsou sladové výtažky. Sladové výtažky jsou husté sladové sirupy, získané vařením sladu a vody (infúze) a následným odpařením vody pomocí vakuových odparek pracujících za nízkých teplot od 40 do 60 °C. Cílem je získání výtažku s obsahem maltózy a se zachovanou aktivitou sladových enzymů. Sladové výtažky lze rozdělit na nediatatické neboli kanditní, diastatické neboli pekařské pro užití v potravinářství a silně diastatické neboli textilní pro průmysl. Sladové náhražky používané pro výrobu piva jsou hnědé až načervenalé medové barvy a sladké sladové chuti. Obsahují rozpustné extraktivní látky sladu, které přešly do roztoku pivovarským rmutováním. (Basařová, 2015; Prokeš, 2017)

### 1.1.3. Voda

Voda má podstatný vliv na charakter a jakost piva (Pelikán, 2004). Voda, která se používá při přípravě mladiny, musí mít charakter pitné vody a vyhovovat všem požadavkům na pitnou vodu podle současné legislativy (Chládek, 2007). V závislosti na technologickém postupu se spotřebuje na výrobu 1 tuny sladu 10 až 15 hl vody a na 1 hl vystaveného piva je potřeba dalších 12 až 15 hl vody (Rop, 2009).

Stupeň tvrdosti vody ovlivňuje kvalitu piva. Pro výrobu piva je ideální tvrdost vody měkká až středně tvrdá. Vhodnější pro výrobu světlého piva je měkká voda, při výrobě tmavého piva tvrdší voda tolik nevádí (Kosař, 2000). Pivovary, které se potýkají s tvrdou až velmi tvrdou vodou, používají úpravny vody, kde je voda upravovaná na požadovanou tvrdost. Proto vznikají rozdíly mezi pivem vařeným v různých lokalitách. Dříve se tvrdost vody dělila na trvalou čili stálou a přechodnou, což je označení v praxi se stále vyskytující. Trvalá tvrdost (nekarbonátová) je způsobena přítomností vápenatých a hořečnatých solí (chloridy, sírany), přechodná tvrdost (karbonátová) pak závisí na rozpuštěném hydrogenuhličitanu vápenatém. Pojem tvrdost vody může být v literatuře různě definován, v pivovarství je



často chápána jako součet vápenatých, hořečnatých a případně barnatých iontů. Kromě tvrdosti vody jsou důležité i další složky použité vody pro výrobu piva, jejichž obsah je závislý na lokalitě zdroje. Jedná se kromě výše uvedených dále o obsah iontů sodných, draselných, železitých/železnatých, zinečnatých, měďnatých, mangannatých, síranových, dusitanových/dusičnanových, aj. Různé složení vody je třeba zohlednit při výrobě, kdy se některé vody hodí více k výrobě vybraných typů piv (Palmer, 2006).

Vyhlášené plzeňské pivo se vyrábí z plzeňské vody, která je měkká, má malý podíl anorganických složek a hodí se pro silně chmelená spodně kvašená piva. Mnichovská voda je na hranici hodnocení jako středně tvrdá až tvrdá, obsahuje málo chloridů a síranů, více uhličitánů a vápenatých iontů. Dortmundská voda je velmi tvrdá, nekarbonátová tvrdost převažuje nad karbonátovou. Vídeňská voda pro piva s přechodem mezi světlým a tmavým je velmi tvrdá, s převládající karbonátovou tvrdostí (Basařová, 2010).

Celková tvrdost je součtem tvrdosti stálé a přechodné. Dříve se vyjadřovala ve stupních německých ( $^{\circ}\text{n}$ ), nyní v mmol/l, přičemž jeden stupeň německý byl původně definován obsahem 10 mg oxidu vápenatého (CaO) v jednom litru vody, což je po přepočtu na nové jednotky  $0,0179 \text{ mmol/l}^{-1}$ , a podle její hodnoty se vody dělí na:

- měkké do 1,4 mmol/l, tj. do 8  $^{\circ}\text{n}$
- středně tvrdé do 2,1 mmol/l, tj. do 12  $^{\circ}\text{n}$
- tvrdé do 5,3 mmol/l, tj. do 30  $^{\circ}\text{n}$
- velmi tvrdé nad 5,3 mmol/l, tj. do 30  $^{\circ}\text{n}$ .

#### 1.1.4. Chmel

Šišťice (hlávky) samičích rostlin chmele (*Humulus lupulus* L., *Cannabinceae*) jsou jednou ze základních surovin pro výrobu piva. Obohacují pivo nejen o hořkost, plnost chuti a vůni, ale i o řadu látek, jenž zvyšují jeho hodnotu z pohledu pivovarské technologie, ale také z pohledy výživy člověka a farmakognosie. Mezi tyto látky patří polyfenoly chalkonové řady, z nichž nejvýznamnější je prenylflavonoid xanthohumol (XN) a jeho izomer flavanon isoxanthohumol (IX) (Hořta, 2004).

Charakter a intenzitu hořkosti piva určují pryskyřice v chmelu. Ty se rozdělují do několika typů, nejčastěji na měkké a tvrdé, resp. na měkké chmelové pryskyřice ( $\alpha$ -hořké kyseliny, převážně humulon, kohumulon a adhumulon, a  $\beta$ -hořké kyseliny, převážně lupulon, kolupulon, adlupulon), nespecifické měkké pryskyřice (humulinony, luputritiony) a tvrdé pryskyřice (humulinové a hulupinové kyseliny) (Anon, 2002). Vzhledem k povaze a reaktivitě se jedná o dobře prostudované látky (Taniguchi, 2014). Odrůdy chmele se mohou

lišit např. poměrem  $\alpha$ -hořkých a  $\beta$ -hořkých kyselin nebo hodnotami absolutního obsahu těchto kyselin (Basařová, 2010), což je předurčuje k určitému použití.

Chmel mimo uvedené látky obsahuje mnoho dalších sloučenin. Mezi sloučeniny s významem pro chuť a vůni piva patří chmelové silice. Ty se dělí na uhlovodíkovou frakci, kyslíkatou frakci vznikající oxidací uhlovodíků a frakci sirných sloučenin. Uhlovodíková frakce silic tvoří v čerstvém chmelu největší podíl (Basařová, 2010). Tato frakce obsahuje alifatické uhlovodíky, monoterpenové, diterpenové a seskviterpenové uhlovodíky, z nichž převládá  $\beta$ -myrcen,  $\beta$ -karyofylen či  $\beta$ -farnesen. Nejdůležitějším látkami jsou ale produkty oxidace seskviterpenového uhlovodíku  $\alpha$ -humulenu, (1E, 4E, 8E)-2,6,6,9)-tetramethylcykloundeka-1,4, 8-trienu (Velíšek, 2002). Tato uhlovodíková frakce je známá jako hlavní složky oleje z chmelu. Obsah a vzájemný poměr těchto terpenoidních látek lze využít i pro klasifikaci chmelových odrůd (Takoi, 2010). Těkavé uhlovodíkové frakce chmelových silic během chmelovaru vytěkají s vodní párou a do mladiny a piva přecházejí pro svou nízkou rozpustnost jen nepatrně. Složky kyslíkaté frakce jsou mnohem rozpustnější ve vodě, dostávají se až do piva a spolu s těkavými kvasnými produkty vytvářejí aroma piva (Kosař, 2000).

Mezi další obsahové látky chmele lze zařadit polyfenolové látky zahrnují bohatou směs s převažujícím podílem flavonových glykosidů, anthokyanogenů, katechinů a volných fenolových kyselin. Jsou to většinou reaktivní, ve vodných roztocích dobře rozpustné látky, snadno podléhající oxidačně-redukčním přeměnám a vykazující vysokou reaktivitu vůči bílkovinám (Kosař, 2000).

### 1.1.5. Chmelové přípravky

Chmel je objemný a lepkový produkt, který není vhodný pro přepravu a dlouhodobé skladování. Z tohoto důvodu vyrábí chmelové přípravky, u kterých dochází ke snížení objemu, a tak zpomalení potenciálního oxidačního rozkladu cenných složek. Chmelové hlávky jsou zpracovány do různých podob, nejčastěji se jedná o chmelové přípravky vyrobené mechanickou úpravou nebo extrakcí. Při mechanické úpravě dochází k rozdrčení, stlačení a extrudování do pelet, které se pak dělí do jednotlivých typů dle obsahu původního chmele (Basařová, 2010; Kowalczyk, 2013). Chmelové hlávky, chmelový prášek nebo pelety mohou být extrahovány rozpouštědlem a mohou sloužit k produkci extraktů. Tato forma snižuje hmotnost a objem přírodního chmele a to více než je tomu u chmelových přípravků vyrobených mechanickou úpravou. Poskytují tak větší úspory při dopravě a skladování. Navíc koncentrovaný stav zlepšuje využití chmele v malých množstvích, kterých je třeba používat při

menších výroбах piva (Basařová, 2010; Kowalczyk, 2013). V minulosti byla používána různá rozpouštědla k výrobě chmelových extraktů (např. methanol, dichlormethan či hexan), ale jejich používání naráželo s postupujícím časem na problematiku dopadů na životní prostředí, zdraví lidí a nákladnost. Dnes se nejčastěji používají dva typy činidel – ethanolový extrakt a superkritický CO<sub>2</sub> extrakt (Kowalczyk, 2013).

## 1.2. Výroba sladiny

Základní surovinou k výrobě piva je slad. Ten se získává po sklizni a následném fyziologickém zrání ječmene ve sladovných procesem sladování, které probíhá ve třech základních fázích – máčení, klíčení a sušení (hvozďení). Takto získaný slad je následně šrotován, probíhá vystírání a rmutování, na jehož konci, resp. v průběhu scezování se získává sladina.

### 1.2.1. Máčení

Cílem máčení je zvýšit obsah vody v zrnu z původních 10–15 % (tento obsah se nazývá konstituční voda) na 40–47 % (obsah vody, která se dostane do endospermu a tento stav se nazývá domočení zrna) pro zahájení enzymatických reakcí. Pro proces máčení se v současnosti nejvíce používá vzdušného máčení, která má tři hlavní fáze. První fáze se označuje jako první namočení, kdy je třeba dosáhnout na celkový obsah vody 30 %. Tento proces trvá 2–6 hodin v závislosti na teplotě vody a stavu zrna. Poté následuje vzdušná přestávka trvající 14–20 hodin, kdy je nezbytné odvádět vznikající CO<sub>2</sub>. Druhé namočení trvá 6–10 hodin a obsah vody se zvýší na 38–40 %. Opět následuje s potřebou odvádět vznikající CO<sub>2</sub>. Třetí namočení trvá obvykle 4–6 hodin a obsah vody se zvyšuje na 42–44 %. Ječmen se následně nechá okapat 2–4 hodiny v pneumatických klíčidlech. Existují i jiné typy máčení jako např. záplavové máčení, sprchové máčení, aj. (Kosař, 2000)

### 1.2.2. Klíčení

Cílem klíčení je aktivace enzymového systému zrna a docílení požadovaného rozluštění. Průběh enzymatických reakcí je ovlivňován zejména stupněm domočení ječmene, vhodnou teplotou a přístupem kyslíku. K aktivaci enzymů dochází nejprve v aleuronové vrstvě, ze které dále postupují do endospermu. Proces klíčení zahrnuje řadu enzymů degradujících složky obsažené v endospermu. V důsledku tohoto procesu dochází k degradaci škrobových granulí v buněčné stěně endospermu (Ingr, 2001). Tyto strukturní a biochemické

změny složek endospermu se označují jako modifikace. Endosperm poskytuje měkkou a moučnatou konstrukci a umožňuje příznivou vlhkost a vhodné prostředí pro enzymatické reakce, aby snadněji docházelo ke štěpení obsahových složek (Gupta, 2010; Kadlec, 2009). Působení enzymů vede k morfologickým změnám (růst obilek), histologickým změnám (měknutí endospermu) a k metabolickým změnám (štěpení vysokomolekulárních zásobních látek). Změny dalších složek ječmene při skladování, jako neškrobových polysacharidů, polyfenolů a lipidů, jsou nezbytné pro průběh výroby piva a i na nich závisí kvalita finálního výrobku (Basařová, 1999).

### 1.2.3. Sušení (hvozdění)

Hvozdění je proces sušení sladu. Cílem je snížení obsahu vody v obilkách na původní vlhkost zrna a postupné snížení vlhkosti pod 4 %. Dojde tak k zastavení vegetačních pochodů při zachování enzymové aktivity a vytvoření chuťových, barevných a oxidoredukčních látek, které jsou pro slad charakteristické. Hvozdění je konečným procesem výroby sladu, kdy se zelený slad nejprve předsuší na hvozdě při teplotách do 60 °C a následně se dosuší na 80 až 105 °C. Sušení má tři základní fáze: (Kosař, 2000; Prokeš, 2017):

1. Růstová fáze

V této fázi dochází k poklesu vody na 20 %, což je původní obsah vody v zrně. Teplota sušení je do 40 °C a zrno v této fázi může dále klíčit.

2. Enzymatická fáze

Zrno ztrácí vlhkost pod 20 %. Teplota dosušování je 40–50 °C, zrno ztrácí vegetační schopnost, enzymatické reakce stále probíhají.

3. Chemická fáze

Zrno ztrácí vlhkost pod 10 %, dosušení je při teplotě nad 60 °C. Dochází k zastavení enzymatické činnosti, v zrně nastávají chemické reakce, přičemž se vytváří chuťové, aromatické a barevné látky.

### 1.2.4. Šrotování sladu

Účelem mletí sladu je dokonalé vymletí endospermu sladových zrn na vhodné podíly jemných a hrubých částic při zachování celistvosti obalových pluch. Mechanické rozrušení zrna je potřebné pro zpřístupnění extraktivních látek sladu a urychlení jejich rozpouštění a fyzikální chemické a biochemické změny, které probíhají při rmutování a v dalších fázích přípravy mladiny. (Basařová, 2010)

Pluchy a endosperm představují hlavní složky sladového zrna. Ty se liší navzájem svým složením a fyzikálními vlastnostmi. Plucha má při šrotování zůstat pokud možno neporušená, protože při pozdější separaci mláta v případě použití scezovací kádě má pomoci vytvořit kyprou a snadno propustnou vrstvu mláta (je potřebné udržet vyšší porozitu mláta). Pokud dojde k rozdrčení pluchy, intenzivněji se vyluhují některé látky a pivo mohou dodat nežádoucí drsnou chuť (Chládek, 2007). Plucha obsahuje kromě nerozpustné celulózy, polyfenoly, pentózany, hořké a barevné látky, jejichž vyluhování vzrůstá s dobou kontaktu a s poškozením pluchy (Kosař, 2000).

Endosperm sladového zrna obsahuje extraktivní látky, které lze ve varném procesu využít. Jedná se zejména o škrob a jiné sacharidy (Chládek, 2007). Jemné rozemletí endospermu je naopak od pluch předpokladem pro požadovaný průběh rmutování a vysoký varný výťažek. Při klíčení postupuje rozluštění působením enzymů od zárodku směrem ke špičce zrna, a tudíž i míra rozluštění se mění podél podélné osy zrna. Nejméně rozluštěná špička zrna tvoří při šrotování hlavní podíl hrubé krupice, a naopak dobře rozluštěné spodní partie endospermu zrna se při průchodu válci snadno rozdrťí na jemnou krupici a mouku. Hrubá krupice se těžko rozpouští a pomalu zcukřuje. Je-li zastoupena ve větším podílu, klesá dosažitelné prokvašení mladiny a vzrůstá obsah nezucukřeného extraktův mláta. Zpracování hrubšího šrotu proto vyžaduje intenzivnější a delší rmutování (Kosař, 2000).

### 1.2.5. Vystírání

Cílem vystírání je kvalitní smíšení sladového šrotu (event. škrobnatých náhražek sladu) s nálevem varné vody. Výběr surovin, jejich množství, způsob vystírání a rmutování jsou prvním předpokladem docílení složení sladiny důležitého pro určitý typ piva. K zajištění potřebné kvality chemických a biochemických reakcí, které probíhají při rmutování, scezování a při vaření v chmelovaru, je nezbytné při šrotování a vystírání optimálně regulovat mechanické a fyzikální procesy (Basařová, 2010).

Množství sladu a náhražek použitých pro jednu várku se nazývá sypání. Objem vody použitý k vystírce se nazývá nálev a určuje se dle sypání a typu vyráběného piva. U dobře rozluštěných sladů se vystírá při teplotách 35 až 38 °C. Někdy se provádí zápařka, což je zahřátí části vystírací vody k varu. Po skončeném vystírání se přičerpáním této horké vody zvýší teplota vystírky na peptonizační teplotu (Kadlec, 2002).

### 1.2.6. Rmutování

Cílem rmutování je rozštěpení a převedení optimálního podílu surovin (sladu event. sladových náhražek) do roztoku v potřebném zastoupení jednotlivých látek důležitých pro další technologický postup a tak zajištění potřebné kvality piva. Procesem rmutování dochází k zajištění štěpení složitých molekul na jednodušší, zejm. se tak získávají zkvasitelné cukry.

Škrob jako fyziologicky a hospodářsky důležitý polysacharid se ukládá v zásobních orgánech rostlin (např. hlízách brambor nebo v semenech kukuřice, pšenice a rýže) ve formě škrobových zrn. Základní stavební jednotkou škrobu je molekula glukózy, která umožňuje tvořit složitější struktury. Hlavními složkami škrobu jsou lineární amyulóza s  $\alpha$ -(1→4) glykozidovými vazbami a větvený amylopektin, obsahující  $\alpha$ -(1→4) a  $\alpha$ -(1→6) vazby. Podle původu škrob obsahuje 20 až 25 % amyulózy a 70 až 80 % amylopektinu (Kosař et al., 2000).

Amyulóza je téměř lineární polymer s několika dlouhými řetězci o střední molekulární hmotnosti  $10^{5-6}$  Da. Amylopektin je vysoce rozvětvený polymer s četnými krátkými větvemi a s vysokou molekulovou hmotností  $10^{7-9}$  Da. Amylopektin tvoří přibližně 35 % hmotnosti z celkového složení zrna a tím je nejvíce zastoupenou složkou v ječmeni. Následují proteiny (přibližně 10 % hmotnosti) a amyulóza (10% hmotnosti). Větve v amylopektinu se v některé odborné literatuře rozdělují na A, B, C řetězce, v závislosti na jejich délce, relativní poloze a větvení. A řetězce se skládají z krátkých větví, nacházejí se na vnějších okrajích molekuly amylopektinu a nevětví se, B řetězce jsou delší, nacházejí se ve vnitřních oblastech molekuly a větví se. C řetězec představuje redukující konec hlavního řetězce. (Gous, 2016)

Samotné složení škrobu se liší dle rostlinného druhu a odrůdy, rostlinného orgánu a za v závislosti na podmínkách, ve kterých rostlina roste. Tyto rozdíly jsou dány biosyntetickými procesy, resp. přítomností různých isoform enzymů a různou aktivitou enzymů. Biosyntetické dráhy zahrnují enzymy jako škrobové syntasy (SS), glukóza-1-fosfát adenyltransferáza, enzymy napomáhající větvení (SBE) a enzymy rušící větvení (DBE). Tyto enzymy jsou přítomné ve všech tkáních vyvíjejících se obilí, ale nejhojnější jsou v rozvíjejícím se endospermu. Nejvýznamnějším DBE v ječmeni je isoamyláza. Z dalších lze uvést limitní dextrinázu, která se převážně účastní štěpení vazeb na úrovni větvení amylopektinu v průběhu klíčení a má tak význam v hodnocení kvality sladu (Gous, 2016).

Proces štěpení škrobu katalyzuje enzym  $\alpha$ -amyláza, která štěpí  $\alpha$ -1,4-glykosidové vazby nespecificky uprostřed řetězců amyulózy a mezi lineárními řetězci amylopektinu. Tvoří se tak kratší řetězce, rychle klesá molekulová hmotnost struktury a viskozita roztoku. Amyulóza je působením  $\alpha$ -amylasy štěpena na oligosacharidy se 6 až 7, amylopektin převážně s 6

až 13 glukozovými jednotkami (Kosař, 2000). Procesu hydrolytického štěpení se ale účastní více enzymů a kromě  $\alpha$ -amylasy, také  $\beta$ -amyláza, limitní dextrináza (LD) a  $\alpha$ -glukosidáza. Enzym  $\beta$ -amyláza postupně odštěpuje z neredukujících konců těchto oligosacharidů maltózu. Limitní dextrináza hydrolyzuje  $\alpha$ -(1,6) vazby ve větvených řetězcích a tím tvoří lineární oligosacharidy, které mohou být dále hydrolyzovány  $\alpha$ -amylasou a  $\beta$ -amylasou. Enzym  $\alpha$ -glukosidáza štěpí především  $\alpha$ -(1,4) vazby od neredukujících konců a produkuje glukosu. Celková schopnost degradace škrobu na maltózu se v pivovarnictví označuje jako diastatická mohutnost enzymů (DPE). (Hu, 2013)

Měření diastatické mohutnosti (DP) však nemusí vždy přesně odhadnout množství zkvasitelných cukrů vznikajících při rmutování nebo zkvasitelnost mladiny. Tato nepřesnost je dána závislostí DP zejména na aktivitě  $\beta$ -amylasy s menším vlivem ostatních enzymů. Proto se jako přesnější ukazuje využití kombinace Kolbachova čísla, sledování aktivity DPE a termostability  $\beta$ -amylasy (Hu, 2013).

Štěpení škrobu probíhá ve třech stupních při působení fyzikálně-chemických vlivů a za účasti enzymů. Jednotlivé stupně se označují mazovatění, ztekucení a zcukření. Při zahřívání vodní suspenze sladového šrotu škrobová zrna postupně bobtnají, praskají, amylóza vytváří koloidní roztok a z amylopektinu vzniká viskózní škrobový maz. Bobtnání a zmazovatění škrobu je fyzikálně-chemický děj, který je závislý především na rychlosti a teplotě zahřívání a na druhu ječmene použitého k výrobě sladu. Škrob sladů z ječmene z chladných oblastí běžně mazovají při teplotě 50 až 52 °C, z ječmenů z mírně teplých oblastí středního pásma při 52 až 53 °C a z teplých oblastí při 54 až 57 °C. Enormní výkyvy teplot v daném ročníku, např. vysoké teploty v mírném pásmu, mohou změnit podmínky mazovatění škrobu při rmutování, a to až nad teploty 65 °C. Při dodržování běžného režimu prodlevy při nižší cukrotvorné teplotě 62 °C ( $\beta$ -amylasová prodleva) může pak dojít ke změnám složení mladiny (Basařová, 2010). Pro srovnání, rýžový škrob mazovají při 80 až 85 °C (Kosař, 2000).

Z technologického pohledu se postupy rmutování dělí na dekokční a infuzní. Dekokční postupy se realizují s postupným vyhříváním jednoho až tří podílů rmutu (postupy jednorumtové, dvourumtové a třírumtové) na technologicky důležité teploty a povařováním těchto podílů. Infuzní postupy zajišťují rozpouštění a štěpení extraktu sladu dlouhodobým účinkem sladových enzymů bez mechanického a tepelného působení povařování rmutů (Basařová, 2010).

Povařování rmutů má své přednosti i limity. Nevýhodou postupů s využitím povařování jsou vyšší časové a energetické nároky. Naopak mezi výhody lze zařadit:

- zvyšuje jakost piva (pitelnost, plnost, zaokrouhluje se chuť, pivo má osobitý charakter),
- zlepšuje výtěžky (koagulace části bílkovin zlepšuje výtěžnost hořkých látek a zajišťuje vyšší množství polyfenolů),
- vyšší obsah melanoidinů a polyfenolů dává lepší předpoklady pro vyšší anti-oxidační schopnost a pro senzoričnou stabilitu piva,
- s počtem rmutů se zvýrazňují výhody dekokce (redukce mikroorganismů, odpaření některých nežádoucích sloučenin),
- zvyšuje ústojnou (pufrovací) schopnost mladiny a piva.

Naopak infuzní postupy jsou z pohledu českých sládků netradičními postupy, které poskytují piva s nižší plností chuti a nižší pitelností, tzv. chuťově měkká a nevýrazná. Výhodou je nižší energetická a časová náročnost, která bývá ještě zvýrazněna použitím vysoce rozluštěných, tzv. přelustěných sladů (Enge, 2005). Mezi nevýhody rmutování bez povařování rmutů lze zařadit:

- je nevýhodné pro odrůdy ječmene českého typu, které nebývají tak rozluštěné,
- dochází k problematické hydrolýze beta-glukanů,
- dochází k nedostatečné separaci negativních těkavých látek (dochází k ní až během procesů v chmelovaru),
- nižší varní výtěžky, horší zcukření,
- vyšší čírost hotových piv, nižší barva.

### 1.2.7. Scezování

Po rmutování následuje proces scezování, kterým se získá filtrací rmutu sladina. V první fázi se s využitím filtrační vrstvy mláta oddělí hlavní podíl v suspenzi zadržené sladinu, což se označuje jako scezování předku. Ve druhé fázi se pak mláto promyje horkou vodou, což nese označení vyslazování mláta (Kosař, 2002). Scezování je na rozdíl od rmutovacího procesu převážně fyzikálním procesem (filtrace). Velkou roli v procesu scezování má kvalita sladu, složení sladového šrotu, míra degradace vysokomolekulárních látek docílená při rmutování, teplotní podmínky a procesní zařízení (Basařová, 2010).



V závislosti na homogenitě rozložení vrstvy mláta v jednotlivých komorách a dalších faktorech, ovlivňující proces scezování a vyslazování v průmyslovém měřítku, se mohou jednotlivé parametry scezovacího a vyslazovacího procesu měnit (Vandenbussche, 2001). Filtrovatelnost sladiny i piva je podle současných poznatků ovlivněna nejen mnoha vysokomolekulárními látkami extraktu sladu (polysacharidy, polyfenoly, minerální látky), ale i kalícími částicemi bakterií (*Enterobacter agglomerans*, *Microccus*, *Pseudomonas* spp. aj.) pocházející ze sladu, což se dá do určité míry eliminovat intenzivním mícháním při rmutování (Basařová, 2010).

### 1.3. Výroba mladiny

#### 1.3.1. Chmelovar

Poslední operací varního procesu je chmelovar, který je také z hlediska tepelné energie nejnáročnější operací při výrobě piva. Z technologického pohledu plní chmelovar několik funkcí. Při chmelovaru dochází ke sterilizaci mladiny, denaturaci enzymů a zastavení všech dobíhajících enzymatických reakcí ve sladině. Zároveň jsou převedeny důležité hořké chmelové látky do roztoku a dochází k jejich izomeraci. Do roztoku přechází chmelové silyce, které jsou odpovědné za chmelové aroma piva, tvoří se chuťové a aromatické látky a reduktony. Ve sladině jsou i některé těkavé sloučeniny odpovědné za nepříznivé sensorické vjemy piva, které jsou v této fázi odpařeny. Dochází ke koagulaci bílkovin, polyfenolů a některých dalších látek za tvorby lomu vypadávajícího z roztoku a k zakoncentrování mladiny na konečnou stupňovitost (Šemík, 2003).

Bylo vyvinuto mnoho systémů chmelovaru s interními či externími vařáky, vysokotlaký (vysokoteplotní) var, nízkotlaký var, dynamický nízkotlaký var Soft-boiling „Sho-Ko“ a další. Používá se stripování mladiny, postevaporace pro odstranění nežádoucích těkavých látek po chmelovaru (vakuovým odpařováním, mžikových odpařením. Každá změna technologického zařízení je ale spojena s rizikem změn sensorického charakteru piva (Mikyška, 2015).

Během chmelovaru izomerují  $\alpha$ -hořké kyseliny nebo-li humulony, dochází ke kontrakci jejich šestičlenných cyklů na pětičlenné a vznikají rozpustné iso- $\alpha$ -hořké kyseliny neboli isohumulony. Současně dochází k izomeraci dvojně vazby v postranním řetězci. Z každého homologu se tvoří čtyři izomery (Bašárová, 2010; Caballero, 2012).

Z analýz vyplývá, že poměrně vysoké koncentrace  $\alpha$ -kyselin jsou v mladině, ale již ne ve výsledném produktu. Důvod lze spatřovat právě v tepelné izomeraci humulonů, kdy účinnost izomerace je udávána do 50 % (ne více než 50 %  $\alpha$ -kyselin je izomerizováno). Vzniklé intenzivně hořké iso- $\alpha$ -kyseliny jsou mírně kyselé ( $pK_a$  hodnoty kolem 3) a jsou mnohem více rozpustné v ležácích (v hodnotách pH mezi 4,2. až 4,4.) než chmelové kyseliny ( $pK_a$  hodnoty kolem 5,5). Navíc mají iso- $\alpha$ -kyseliny příznivý vliv na stabilitu pивní pěny (Caballero, 2012).

$\beta$ -kyseliny nemohou při chmelovaru izomerovat. Vykazují však nestabilitu v přítomnosti kyslíku a sklon k oxidačním reakcím, což má velký význam při zpracování a skladování chmele. Oxidačními produkty transformace  $\beta$ -kyselin jsou hulupony. Tyto produkty jsou přítomny i v čerstvých chmelových výrobcích (lisovaný chmel, pelety), kdy v důsledku oxidace při posklizňovém zpracování chmele a při skladování chmele jejich obsah vzrůstá. Oxidační produkty ve starších chmelech do značné míry kompenzují při chmelovaru pokles hořkosti piva daný úbytkem  $\alpha$ -kyselin. Hořčící vydatnost oxidačních produktů těchto kyselin dosahuje přibližně 35–40 % hořkosti iso- $\alpha$ -kyselin. Nové technologické přístupy zkoušejí využít neoxidované  $\beta$ -kyseliny přidané do chmelovaru nebo využívají pre-oxidované  $\beta$ -kyseliny, čímž lze dosáhnout vyšší hořkosti ve srovnání s neoxidovanými kyselinami. (Krofta, 2013)

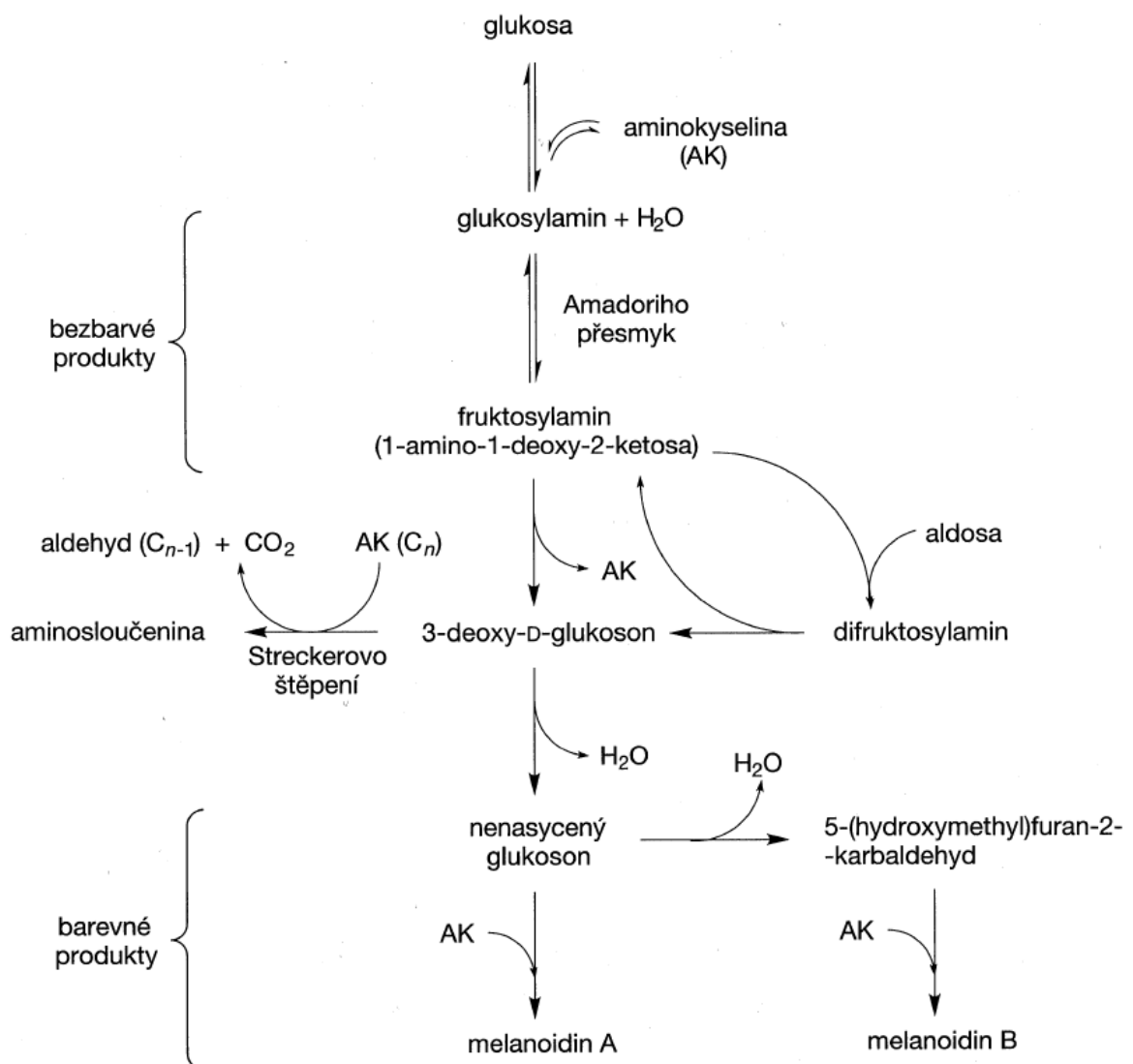
Při chmelovaru dochází také ke koagulaci bílkovin v mladině, což je předpoklad pro koloidní stabilitu piva. Obsah bílkovin v ječmeni může kolísat od 8 do 12 %, výjimečně až 16 %. Z celkového množství bílkovin asi jedna třetina přechází do hotového piva. Přestože jejich množství ve výsledném nápoji je malé, mají bílkoviny zřetelný vliv na kvalitu piva, a proto se má hodnota obsahu bílkovin v ječmeni pohybovat v rozmezí od 10,5 do 11,7 %. Dusíkaté látky v ječmeni nejsou tvořeny pouze pravými bílkoviny, ale také dalšími látkami obsahující dusík v různých vazbách a o různé molekulární hmotnosti. Rovněž jejich úloha není stejná. Hlavní část bílkovin se podílí na tvorbě buněčného substrátu, jiné dusíkaté látky plní biologickou funkci katalyzátorů a jsou i součástí některých hormonů ječmene. Dusíkaté látky jsou uloženy především v aleuronové vrstvě. (Prokeš, 2000)

Odstranění bílkovin se děje koagulací, která probíhá ve dvou stupních. V první fázi, která je spíše chemické povahy, bílkoviny denaturují, dochází k rozpadu terciární struktury, ztrácejí své prostorové uspořádání, ale stále zůstávají ještě rozpustné. Tento děj, kdy dochází ke vzniku neuspořádané koloidní formy částic, je dán dehydratací podpořenou vyšší teplotou chmelovaru. Při zahřívání dochází ke štěpení vodíkových vazeb a především disulfidových

můstků proteinů, čímž proteinové molekuly vzájemně agregují či mohou reagovat s jiným nízkomolekulárními látkami a vlivem změn oxidačně-redukčního potenciálu podpořit vylučování z roztoku. V druhé fázi, která je fyzikálně-chemické povahy, pak nastává v izoelektrickém bodě vlastní koagulace, tj. srážení bílkovin do viditelných vloček. (Prokeš, 2000; Basařová, 2010).

Bílkoviny mají i další význam při chmelovaru, účastní se Maillardovy. Jedná se o reakci aminokyselin (bílkovin) s redukujícími sacharidy. Tyto reakce jsou podobné jako při hvozdění sladu. Produkty reakce jsou významné sensoricky aktivní látky jako je furan-2-karbaldehyd nebo 5-hydroxyfuran-2-karbaldehyd, ale také vysokomolekulární barevné produkty, tzv melanoidiny, které udávají barvu piva (Preedy, 2009). Schéma tvorby těchto látek je uvedeno na obr. č. 1.

Obr. č. 1: Schéma tvorby melanoidinů (převzato z Basařová, 2010).



Při reakci dochází adicí aminoskupiny aminokyselin na karbonylovou skupinu sacharidů k tvorbě iminu (Schiffova báze). Imin se Amadoriho přesmykem transformuje na 1-amino-1-deoxyketosu (obecně glykosylamin), která podléhá enolizaci při současném uvolnění aminoskupiny. Další reakce kromě enolizace zahrnují dehydrataci, štěpení, kondenzaci a izomeraci a vedou ke vzniku reduktonů a následně výsledných barevných melanoidinů. (Basařová, 2010; Vanderhaegen, 2007)

Znalost reakcí probíhajících při chmelovaru a podmínek vzniku jednotlivých senzoryicky aktivních produktů umožňuje nastavení technologického postupu s cílem zajištění požadovaných charakteristik piva.

### 1.3.2. Chlazení a odlučování kalů

Následujícím technologickým postupem je vyrážení mladiny do připravené vířivé kádě, což je proces přečerpání horké mladiny. Horká mladina se musí před zakvašením ochladit na zákvasnou teplotu a zároveň dochází k odstranění hrubých i jemných kalů a k provzdušnění mladiny. Hrubý kal vznikl vysrážením bílkovin při chmelovaru a kromě bílkovin obsahuje i polyfenolické a hořké látky. Jelikož lom (vysrážené bílkoviny) je těžší než mladina, dojde k jeho usazení a vyčeření mladiny, která se od něj oddělí. Tento proces je důležitý jak z hlediska následujícího kvašení (kal může zanášet povrch kvasinek), tak z hlediska hořkosti a pěnivosti piva. Horká mladina dosahuje teploty přes 90 °C a je třeba ji snížit na požadovaných 4–7 °C pro klasické kvašení. U zrychlených postupů se teplota snižuje na 10–15 °C, u svrchního kvašení pak na 12–18 °C. Během zchlazování dochází také k provzdušnění sterilním vzduchem, ke kterému dochází nejlépe při teplotách kolem 40 °C. Tímto procesem se zajistí vhodné podmínky pro následující kvašení. (Basařová, 2010; Chládek, 2007; Kadlec, 2009)

## 2. CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLADINY

Ječmen obsahuje 80–90 % sušiny, kterou tvoří velké množství různých organických dusíkatých a bezdusíkatých látek a také anorganické látky. Zastoupení jednotlivých složek je variabilní a závislé na genetických vlastnostech odrůdy ječmene, použité agrotechnice, pěstebních podmínkách včetně složení půdy a klimatických podmínkách daného ročníku (Basařová, 2015). Odrůdovou vlastností ječmene je např. podíl velkých a malých škrobových zrn v endospermu, který má vliv nejen na zcukření sladiny, ale i na průběh mletí a složení sladového šrotu (Basařová, 2010).

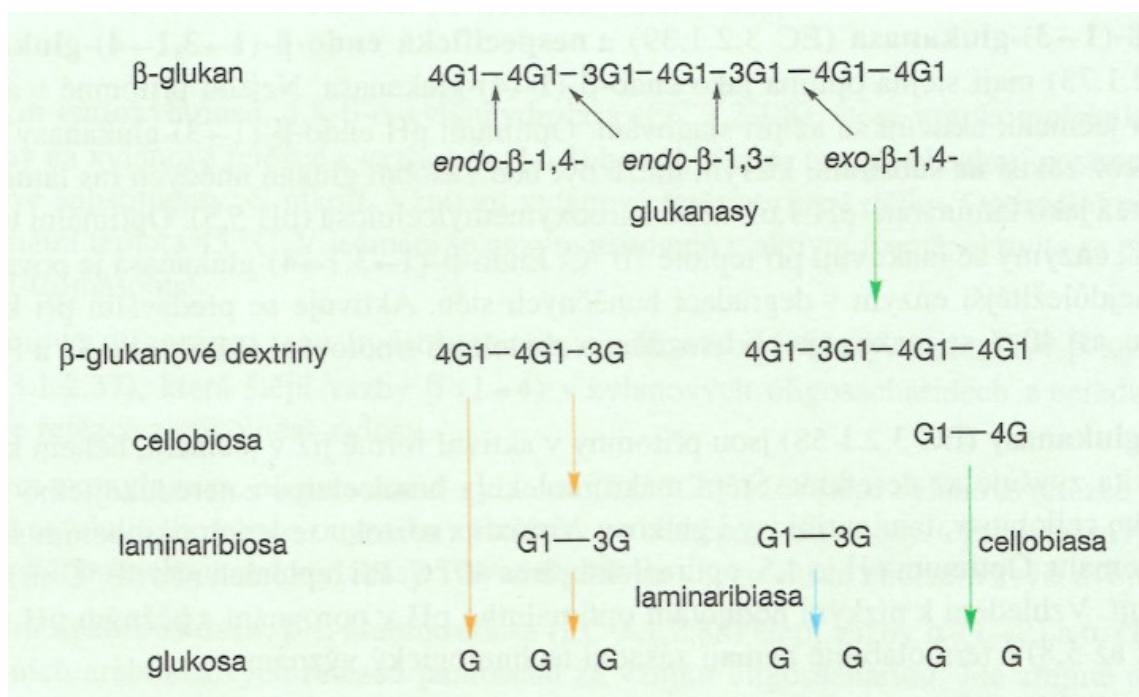
Mladina musí obsahovat dostatek zkvasitelných látek (asi 90 % tvoří cukry), kvasinami snadno absorbovatelné dusíkaté látky (obsah aminodusíku podle původní koncentrace piva v rozmezí 100 až 200 mg l<sup>-1</sup>, vyjádřeno v poměru k celkovým dusíkatým látkám asi 21 až 22 %, přiměřené množství minerálních látek a dalších exogenních biokatalyzátorů, stopových prvků a vitaminů (Basařová, 2010; Moll, 1994). Naopak mladina by neměla obsahovat velké koncentrace dusičnanů, což je dáno potenciálně nebezpečnou redukcí dusičnanů na dusitany, které se mohou přeměnit na N-nitrososloučeniny, které mají negativní dopad na lidské zdraví (Čepička, 1991). Pivo jako potravina nesmí obsahovat zdraví škodlivé látky a voda použitá pro jeho výrobu musí vyhovovat legislativním nárokům kladených na pitnou vodu. Případné kontaminaci lze čelit i některými technologickými postupy jako je například zvýšení zákvasné dávky pivovarských kvasinek. To je však pouze částečné řešení a nese s sebou nebezpečí negativního vlivu na sensorickou kvalitu výsledného produktu. Komplikaci mohou představovat také látky tvořící zákal (např. dextriny, hořké polyfenolové a vyšemolekulární dusíkaté látky). Ve vyšší míře tyto látky mohou narušit fyziologické procesy kvasinek, proto je jejich obsah v mladině doporučen do koncentrace 12 mg/100 ml (Basařová, 2010, Basařová a Čepička, 1985).

### 2.1. Mladina jako zdroj substrátů pro mikroorganismy

Buňky kvasinek přijímají živiny celým svým povrchem a o tomto procesu rozhodují vlastnosti cytoplasmatické membrány, která tvoří rozhraní mezi buňkou a okolním prostředím a je chráněna buněčnou stěnou. Buněčná stěna kvasinek je velmi pevná, chrání buňku před nepříznivými mechanickými vlivy a mohou jí volně procházet nízkomolekulární sloučeniny (Basařová, 2010). Cytoplasmatická membrána je semipermeabilní, odděluje dvě prostředí s různou koncentrací osmoticky aktivních částic a slouží tak k řízení toku látek do a z buňky kvasinek.

V kapitole Rmutování (kap. 1.2.6) bylo popsáno štěpení škrobu, což je jeden z nej-důležitějších procesů při výrobě mladiny. Získávají se tak zkvasitelné sacharidy, které slouží jako substráty pro kvasinky. V mladině dochází i k dalším změnám a štěpení vysokomolekulárních látek na jednodušší. Kromě škrobu se ve sladu nachází i neškrobové polysacharidy a to zejména hemicelulózy, které jsou vázány v buněčných stěnách na vysokomolekulární bílkoviny a odpovídají za jejich pevnost. Do hemicelulóz řadíme heteroglukany a heteroxylyany. Významnou skupinu látek z heteroglukanů představují  $\beta$ -glukany, kterým se dnes věnuje pozornost zejména ve výživě člověka jako součást vlákniny.  $\beta$ -glukany hrají významnou úlohu v nízkoteplotních varných procesech.  $\beta$ -glukany jsou polysacharidy, u kterých jsou glukopyranosové jednotky spojeny převážně vazbou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), méně pak vazbami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), které dodávají molekule pružnost. Do heteroxylanů se řadí arabinoxylany, což jsou polysacharidy, u kterých jsou pentózy vázány vazbami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Tyto neškrobové polysacharidy ze sladu přechází do sladiny a následně začíná kaskáda reakcí, které vedou k jejich degradaci (Obr. č. 2). Celý proces začíná aktivitou endo- $\beta$ -glukanázy a  $\beta$ -glukansolubilázy ( $\beta$ -D-glukan exohydrolázy). Komplex enzymů vede k tvorbě jednodušších látek, např. cellobiázy, ze kterých následně vznikají jednotlivé molekuly glukózy. Obdobný proces probíhá i u arabinoxylanů, ovšem význam je nižší ve srovnání s předcházející skupinou. Výsledkem působení komplexu enzymů je tvorba xylózy (Kosař, 2000; Basařová, 2010; Kadlec, 2002; Kanauchi, 2011; Belitz, 2004).

Obr. č. 2: Schéma štěpení  $\beta$ -glukanů (převzato z Basařová, 2010).



Pro technologii piva je žádoucí úplné rozložení  $\beta$ -glukanů, jinak se zvyšuje viskozita mladiny, snižuje varný výtěžek, zhoršuje filtrovatelnost a prodlužuje doba zcezení. Obsah  $\beta$ -glukanů v ječmeni závisí na odrůdě, lokalitě a vegetačních podmínkách. Obsah glukanů ve sladu lze ovlivnit podmínkami sladování v rozmezí 40–300 mg/l ve sladině. Ve sladině je limit obsahu  $\beta$ -glukanů 150–200 mg/l (u exportních sladů). Snižit jejich obsah lze i přidáním vhodných enzymů ( $\beta$ -glukanázy) na počátku rmutování (Havlová, 2001).

Během rmutování dochází k enzymatickému štěpení i jiných látek než polysacharidů. Vlivem působení lipáz, lipooxygenáz a dalších enzymů dochází k oxidačním změnám lipidů, což vede k tvorbě karbonylových sloučenin. Vlivem endopeptidáz dochází k degradaci proteinů za vzniku aminokyselin. Tyto procesy nemají ale takový význam jako enzymatické reakce polysacharidů (Basařová, 2010).

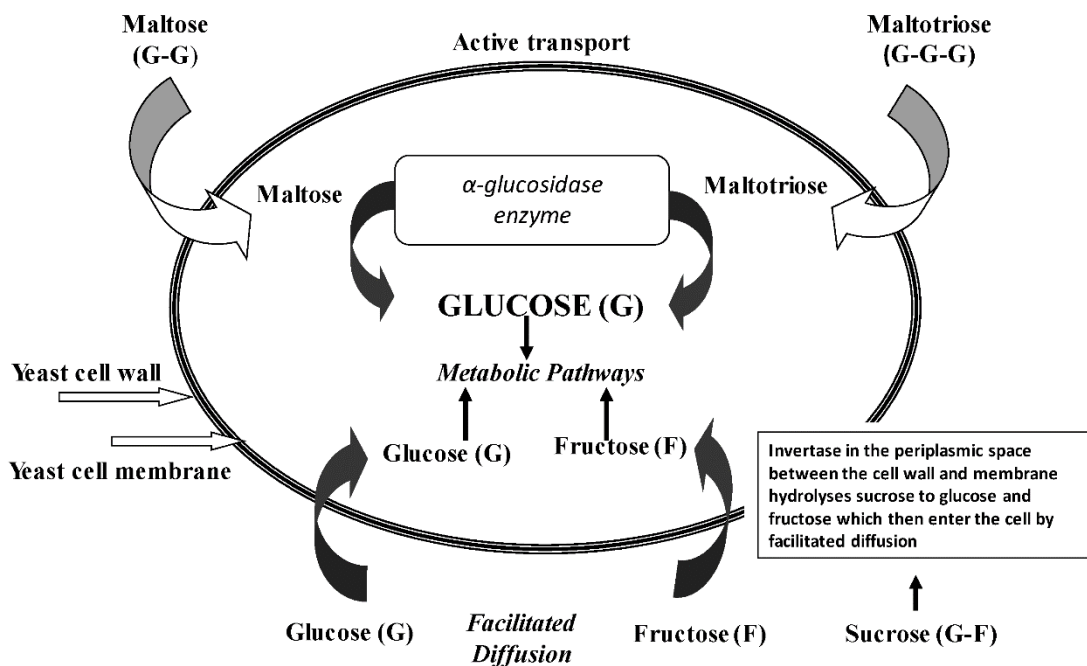
## 2.2. Nároky kvasinek používaných při výrobě piva na růstové prostředí

Mladina představuje pro kvasinky bohatý zdroj živin. Aby je mohly využívat, je nezbytné živiny přenést dovnitř buněk kvasinek. K tomu může u nízkomolekulárních látek a látek lipofilní povahy docházet pasivně. Vyšší význam v regulaci toku látek má ovšem aktivní transport, který je zajišťován integrovanými proteiny v cytoplazmatické membráně. Tento transport zajišťuje přenos polárních molekul a iontů a také přenos látek s vyšší molekulovou hmotností, které pasivně přes cytoplazmatickou membránu nemohou projít. Tyto přenašeče navíc podléhají dalším vlivům a vytváří se tak komplexní regulační síť pro vstup látek do buňky a jejich export z buňky kvasinek (Basařová, 2010; Rosypal, 2003).

Prvním předpokladem života a fungujících metabolických procesů je přítomnost vody. Vysoká aktivita vody je nezbytná i pro buňky *Saccharomyces cerevisiae* a to minimálně ve výši 0,65. Voda je naprosto nezbytná také pro fermentaci, kdy ale může rozdíl koncentrací sacharidů mezi vnější a vnitřní stranou cytoplazmatické membrány způsobit osmotický stres s negativními dopady na buňky kvasinek (Walker, 2016).

V předchozí kapitole Mladina jako zdroj substrátů pro mikroorganismy (kap. 2.1) byla největší pozornost věnována sacharidům. Sacharidy představují pro kvasinky základní zdroje uhlíku. Ačkoliv glukóza se běžně používá jako jediný zdroj uhlíku pro růst kvasinek v laboratoři, tento monosacharid není obecně volně dostupný ve vysokém množství v průmyslově využívaných médiích. V těchto médiích je běžnějším zdrojem uhlíku maltóza (sladina při výrobě piva), sacharóza (melasa pro výrobu rumu), laktóza (syrovátka) a případně i fruktóza (např. v *Agave* spp, s polyfruktany pro výrobu Tequily) (Walker, 2016).

V mladíně jsou kromě glukózy přítomny i další sacharidy, kterým je v technologii výroby piva věnována zvýšená pozornost. Jedná se o maltózu (obvykle 50 až 60 % ze všech sacharidů), maltotriózu (15–20 %) a glukózu (10 až 15%). Z těchto sacharidů přednostně kvasinky využívají glukózu. Její utilizace je rychlá a efektivní. I když maltóza snadno fermentuje, je její utilizace náročnější. Pro přenos do buňky jsou potřebné permeázy a následovat musí štěpení maltázou. Maltotrióza je pak nejméně preferovaný sacharid pro buňky *Saccharomyces cerevisiae*. V literatuře se také popisují další sacharidy. Z monosacharidů lze uvést fruktózu, u které dochází k rychlé utilizaci. Z disacharidů vyskytujících se při použití sladových náhražek lze zmínit sacharózu, která do buněk kvasinek přechází až po rozštěpení invertázou (Alves, 2013). Invertáza ( $\beta$ -D-fruktofuranosidáza) je významným enzymem, který je vázán na buněčnou stěnu kvasnic a která štěpí sacharózu ze živného prostředí na oba monosacharidy, tj. glukózu a fruktózu, před jejich transportem do nitra buňky. Tento pochod je velmi rychlý (řádové minuty), neboť jedna forma invertázy je lokalizována v mannanproteinovém komplexu buněčné stěny a v periplasmatickém prostoru mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou. Během kvasného procesu se invertáza v malém množství uvolňuje do prostředí a její aktivitu je možno vždy stanovit v hotovém nepasterovaném pivu (tj. v nepřítomnosti kvasničných buněk) (Šrogl, 2007). Sacharidy jako substráty pro kvasinky ilustruje obr. č. 3.



Obr. č. 3: Vybrané sacharidy jako substráty pro *Saccharomyces cerevisiae* (převzato z Stewart, 2016).



Basařová (2010) uvádí, že monosacharidy jako glukóza a fruktóza mohou projít do buňky kvasinek přímo. Tím ovšem není myšlen obyčejný pasivní přestup přes cytoplazmatickou membránu kvasinek. Jedná se o facilitovanou difúzi pomocí HXT (Hexose Transporter) proteinů s vysokou afinitou ke glukóze. Celkem bylo identifikováno 20 genů kódujících proteiny, které jsou podobné HXT. Proteiny HXT se řadí do rodiny MFS (Major Facilitator Superfamily), které zajišťují facilitovanou difúzi mnoha substrátů, tedy transport na energii nezávislý. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří mezi organismy s největším zastoupením těchto přenašečových systémů (Özcan, 1999).

Využití maltózy a maltotriózy kvasinkami nejprve vyžaduje, na rozdíl od monosacharidů, aktivní transport těchto látek dovnitř kvasinek. Při sledování utilizace maltózy a maltotriózy je patrný význam přenašečových systémů při srovnání fermentace kmenů svrchních a spodních pivovarských kvasinek. Výsledky pokusů ukázaly, že typy jednotlivých kmenů svrchních a spodních kvasinek nemají na utilizaci těchto sacharidů vliv. Rozdíl se však prokázal mezi oběma skupinami, kdy spodní pivovarské kvasinky využívají tyto sacharidy kompletně na rozdíl od svrchních kvasinek, které pouze částečně. Jedním ze zvažovaných vysvětlení je právě funkce permeáz (Stewart, 2016). V cytoplasmě jsou tyto sacharidy hydrolyzovány  $\alpha$ -glukosidázou (maltázou) za vzniku molekul glukózy, která je dále metabolizována na ethanol (Alves, 2013). Předchozí genetické a biochemické studie zaměřující se především na utilizaci maltózy při fermentaci zjistily, že metabolismus maltózy je kódován v locus MAL se třemi geny. Těchto míst je pět (MAL 1, 2, 3, 4 a 6) a každý lokus obsahuje alespoň jednu kopii tří různých genů kódujících transportéry nebo enzymy (Alves, 2013; Basařová, 2010). Jelikož kvasinky využívají sacharidy mladiny nebo živných půd postupně a jejich úbytek je možné a vhodné vyjádřit kinetickými rovnicemi (Basařová, 2010).

Kvasinky pro svůj růst, buněčnou proliferaci, strukturální změny a enzymatické pochody potřebují přijímat dusík. Ze všech dusíkatých látek umí kvasinky využít okolo 30 %, což se označuje jako volný aminodusík (Free Amino Nitrogen, FAN). Obvyklá hodnota FAN pro mladinu se pohybuje od 150 do 250 mg/l. Hlavním zdrojem dusíku v mladině jsou pro kvasinky malé peptidy, aminokyseliny a amonné ionty. Hodnota FAN také určuje zkvašitelnost mladiny a rozhoduje o náchylnosti piva k rozvoji kontaminace. Piva s vyšším obsahem volného aminodusíku se snáze mikrobiologicky kazí. Hodnota FAN má také vliv na chuť piva kvůli vztahu k tvorbě některých sensoricky významných látek (například vyšších alkoholů, karbonylů a esterů). I přes existenci rozdílů v utilizaci dusíkatých látek mezi kvasinkami svrchního a spodního kvašení, platí přímá úměra mezi růstem kvasnic a potřebou

dušíkatých látek. Jednotlivé rozdíly nemusí být dány rozdílným kmenem, ale závisí i na obsahu sacharidů v mladině a na dalších podmínkách fermentačního procesu. (Basařová, 2010; He, 2014; Stewart, 2016).“

Kvasinky jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, což znamená, že mohou sacharidy využívat oxidačním i fermentačním metabolismem. Z počátku kvašení je oxidační metabolismus blokován vysokou koncentrací sacharidů a kyslík mizí z mladiny během několika hodin. Je to proto, že kyslík je nezbytně nutný jako růstový faktor pro membránovou biosyntézu mastných kyselin (například kyselina olejová) a sterolů (například ergosterol). Jelikož v anaerobních podmínkách naopak kvasinky tyto látky (kyselinu olejovou a ergosterol) nedokáží syntetizovat, nazývají se auxotrofy. Proto je pro efektivní alkoholické kvašení nezbytné zajistit na začátku fermentace kyslík, nebo látky esenciální dodávat do média. Zároveň to znamená, že vliv kyslíku bude pro fermentační procesy zásadní. Rozpuštěný kyslík ovlivňuje růst kvasinek, rychlost využívání aminodusíku a další metabolické procesy. Pro kvasinky spodního kvašení se využívá obsahu kyslíku 5–7 mg/l, z čehož se využije zhruba 15 % pro syntézu sterolů a 15 % pro syntézu nenasycených lipidů (Basařová, 2010; Walker, 2016).

Z dalších látek majících vliv na růst kvasinek lze zmínit některé anorganické látky, zejm. vliv zinku. Jeho nedostatek může vést ke zpomalení hlavního kvašení. Z dalších látek se pak sleduje obsah hořčíku, fosforu či síranů. Z vitaminů jsou důležité biotin a kyselina pantothenová.

### 2.3. Mikrobiální kontaminace

Kontaminací je chápána přítomnost nežádoucích mikroorganismů ve stočeném pivu, případně kvasničnou kontaminací se označují veškeré kvasničné buňky, které se negativně projevují v určitém místě výroby (Basařová, 2010).

Technologie výroby mladiny použitím vyšších teplot vytváří podmínky nevhodné pro mikroorganismy. To se mění s klesající teplotou mladiny, která se může stát vhodným médiem pro množení některých bakterií a kvasinek. Toto nebezpečí se zvyšuje v případě otevřených kádí s mladinou, při nedodržení hygienických požadavků na pracovní prostředí a také v domácích podmínkách při malovýrobě. V další části budou rozděleny kontaminující mikroorganismy podrobně, obecně ale lze říci, že většina kontaminujících mikroorganismů působí v pivovarském provozu nepřímo, tj. využívá rozpuštěného kyslíku, živin a růstových faktorů a změnou vlastností kultivačního prostředí. Výjimkou jsou pak kvasinky vytvářející

toxin bílkovinné povahy, který negativně působí na citlivé pivovarské kvasinky (Basařová, 2010).

Kontaminaci můžeme rozdělit na primární a sekundární. Primární kontaminace zahrnuje kontaminované suroviny vstupující do výroby piva, tedy zejména slad a vodu. Problematickým místem primární kontaminace jsou i samotné kvasnice. Opakovaným použitím se nemění pouze jejich fyziologie, ale zvyšuje se i riziko kontaminace. Primární kontaminace se týká výrobních prostor, vybavení a pracovníků. Z tohoto pohledu jsou problematická zejména skladovací nádoby a prostory, prostory s vyšší vlhkostí, místa s nefiltrovaným meziproduktem a delší dobou ležení, případně prostory s horší sanitací. Pozornost je dnes věnována také ošetření piva (pasterace) a plničkám. Plně automatizované linky mají za cíl riziko mikrobiální kontaminace snížit na minimum (Vaughan, 2005). Sekundární kontaminací rozumíme kontaminaci výsledného produktu, tedy toho, který již prošel pasterací. Při této kontaminaci hrají významnou úlohu čistota a údržba potrubí. Podobně jako ve zdravotnictví, i v potravinářství je dnes věnována pozornost tvorbě biofilmu, jeho odolnosti vůči běžným sanitacním technikám a negativnímu vlivu na výsledný produkt (Basařová, 2010; Matoulková, 2012; Priha, 2015; Walker, 2007; Shabani, 2010; Brányik, 2004; Maifreni, 2015).

Z pohledu technologie výroby piva je příkladem citlivého místa proces klíčení, kdy jsou vytvořeny vhodné podmínky a během klíčení se mikroorganismy rychle množí. Převažuje růst bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Pseudomonas* a *Leuconostoc* (Justé, 2011). Dalším podobně citlivým místem je již dříve zmíněná zchlazená mladina v otevřených kádích nebo proces plnění pasterovaného piva a čistota potrubí (Bokulich, 2013). Tato místa by měla být pravidelně kontrolována, např. v systému HACCP, a v případě potřeby by měla být zavedena nápravná opatření s cílem snížit riziko primární i sekundární kontaminace.

Mezi nejvýznamnější bakterie adaptované na podmínky pivovarského prostředí řadíme bakterie mléčného kvašení. Typickým a častým zástupcem je *Lactobacillus brevis*, který je řazen mezi pivo škodící mikroorganismy. Lze tak nalézt jak v meziproduktech (mladina, mladé pivo), tak i v hotovém pivu. Tato bakterie způsobuje v hotovém pivu zákal a kyselou vůni a chuť (Suzuki, 2011; Vriesekoop, 2012).

Nežádoucí mikroorganismy lze dle Kosaře (2000) rozdělit do několika skupin. První jsou latentní zárodky, které se však vyskytují vzácně (rod *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, čeledi *Enterobacteriaceae*, aj.). Problematická je u této skupiny tvorba toxických produktů, např. mykotoxinů. Druhou skupinou jsou indikátorové mikroorganismy, které

jsou ve srovnání s předcházející skupinou méně nebezpečné (rod *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Debaryomyces* a některé kmeny *Saccharomyces*). Pivo jako výsledný nápoj, není prostředí ideální pro množení mikroorganismů. Proto třetí skupinou jsou pivu nepřímo škodící mikroorganismy, které mohou zasáhnout výrobu, ale ve výsledném produktu se již nemnoží (někteří zástupci rodů *Enterobacter*, *Obesumbacterium*, *Candida* a *Hansenula*). Že je pivo nepříznivé prostředí, ale neznamená, že by se jiné mikroorganismy v něm nemohli množit. Takzvané pivu potenciálně škodící mikroorganismy se mohou v pivu za určitých podmínek množit (např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Micrococcus kristinae*, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces pastorianus*). Takovými podmínkami je přítomnost kyslíku, zvýšené pH piva (nad 4,7) a nižší chmelení. Poslední skupinou jsou pivu škodící mikroorganismy, které se pomnožují v pivu za vzniku zákalu (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus cerevisiiphilus* a *Saccharomyces diastaticus*). Současně dochází ke změně chuťových vlastností piva, vznik zápachu, tvorba diacetylu a k dalším poškození výsledného nápoje.

### 3. BIOCHEMICKÉ PROCESY PŘI VÝROBĚ PIVA

Podmínky a průběh biochemických procesů závisí na podmínkách fermentace, kvalitě a dostupnosti surovin, kmenech kvasinek a dalších faktorech. Tyto procesy pak určují obsah a zastoupení výsledných látek a tak i podobu a kvalitu výsledného produktu. Samotný princip výroby alkoholických nápojů fermentací sacharidů je poměrně jednoduchá technika. Nicméně, pro výrobu alkoholických nápojů, jako je pivo nebo víno, není jediným výsledkem produkce ethanolu, ale získání komplexního nápoje s vyváženou chutí. Jelikož biochemické procesy nevedou k pouhé tvorbě ethanolu ze sacharidů mladiny, ale pomocí enzymů kvasinek k tvorbě dalších sensoricky významných látek, je výběr a aplikace správného kvasinkového kmene velmi důležitým krokem ve výrobě piva (Sarma, 2013).

K pochopení biochemických procesů významným způsobem dopomohly moderní analytické metody a jejich vývoj. Tyto metody umožnily identifikovat přes 1000 látek ovlivňujících sensorický profil piva. Sloučeniny s největším dopadem na aroma a chuť piva jsou produkovány kvasinkami v procesu hlavního kvašení. Sensoricky aktivní substance produkováné při hlavním kvašení mohou být rozděleny do pěti hlavních skupin: látky obsahující síru, organické kyseliny, vyšší alkoholy, karbonylové látky a těkavé estery. Různé kmeny kvasinek při tom produkují odlišná množství klíčových chuťových látek v závislosti na svém genetickém profilu (Škach et al., 2009).

#### 3.1. Metabolismu sacharidů

Předcházející text popsal sacharidy jako důležitý zdroj uhlíku v mladině a potřebu jeho přestupu do buněk kvasinek k utilizaci. Této problematice se výzkum věnoval již v historii, kdy např. závislost zkvasitelnosti cukrů na vlastnostech kvasničného kmene uvedl S. R. Griffin ve své práci v roce 1970. Práce G. G. Stewarda a spolupracovníků z roku 1986 potvrdily jako hlavní limitující faktor počátku využívání maltózy mladiny kvasinkami pokles hladiny glukózy (Basařová et al., 2002). Jako zdroj uhlíku a energie pro kvasinky mohou sloužit i jiné látky, jakými mohou být např. glycerol, laktát, ethanol, methanol, alkany, aj.

Za aerobních podmínek většina kvasinek využívá sacharidy procesem glykolýzy a navazujícím Krebsovým cyklem. U převážně fermentujících kvasinek je energie tvořena v průběhu kvašení. Při distribuci pyruvátu vznikajícího mezi respirační a fermentační reakcí je důležitá aktivita pyruvátdehydrogenázy, která se nachází v mitochondriích a produkuje

acetylCoA pro vstup do Krebsova cyklu, a cytoplasmatické pyruvátdekarboxylasy, která pomáhá vzniku acetaldehydu a tím i ethanolu. Produkty metabolismu kvasinek mohou být nejen CO<sub>2</sub>, ethanol, H<sup>+</sup>, ale i glycerol, acetát, sukcinát a další. Obsahy a poměr zastoupení jednotlivých látek lze ovlivnit u různých kmenů kultivačními podmínkami (Kopecká, 2012).

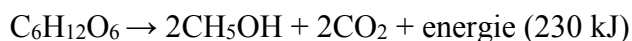
### 3.2. Biochemické procesy v rámci kvašení mladiny

Účelem hlavního kvašení mladiny je kontrolované kvašení roztoku s obsahem sacharidů, tedy výroba mladého piva, které již obsahuje důsledkem činnosti kvasnic alkohol, oxid uhličitý a další látky. Navíc se vyvíjí činností kvasnic během kvašení mladiny další metabolity a teplo, které je nutno odvést tak, aby proces kvašení mladého piva probíhal při požadované teplotě (Chládek, 2007).

Přestupem sacharidů z mladiny do těla kvasinek během kvašení postupně klesá hladina sacharidů a mění se jejich poměr v kvasicím médiu. Nejdříve a nejrychleji je zkvašována glukóza. Velkou rychlost zkvašování má i sacharóza, která vchází do kvasničné buňky již jako dva monosacharidy glukóza a fruktóza. Teprve po poklesu hladiny glukózy na určité úrovni dochází ke zkvašování hlavního pivovarského sacharidu, tedy maltózy (Basarová, 2010).

Při běžném postupu kvašení mladiny jsou 2 % extraktu zpracována v aerobním cyklu. Možný energetický zisk 38 molekul ATP z jedné molekuly glukosy není dosažen, protože meziprodukty odbourávání jsou použity jako základní kameny pro syntézu sterolů, lipidů a aminokyselin. Pouze za aerobních podmínek tvoří kvasinky zásobní látky – glykogen a trehalosu (Košár, 2000).

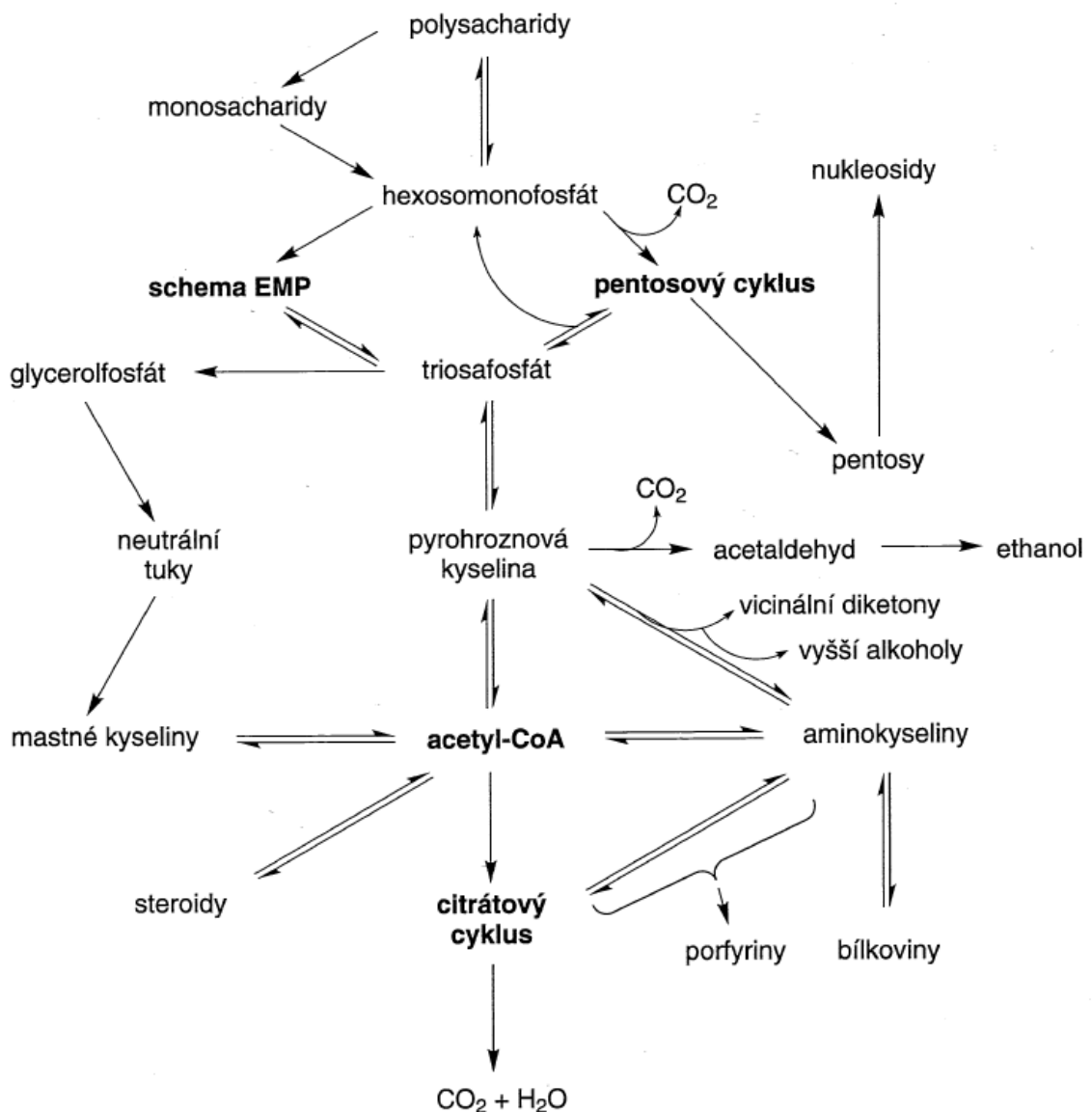
Pivovarsky nejvýznamnější částí metabolismu kvasinek je anaerobní glykolýza a tvorba ethanolu. V roce 1800 sestavil Francouz Gay-Lussac chemickou rovnici ethanolového kvašení. Stanovil, že z jedné molekuly monosacharidu vznikají dvě molekuly ethanolu a dvě molekuly oxidu uhličitého:



V dnešní době existují mnohem podrobnější informace, a tak jednotlivé fáze popisuje hojně používané Embdenovo-Meyerhofovo-Parnasovo schéma (EMP) (obr. č. 4). Energetický zisk z přeměny jedné molekuly glukosy na alkoholy při kvašení je představován dvěma molekulami ATP. Při dalších reakcích dochází ke ztrátám energie, které se projevují růstem teploty kvasící mladiny (Košár, 2000). Jelikož vznikající teplo je třeba odvádět, hraje udržení teploty roli v regulaci kvašení. Optimální teplota kvašení u většiny kmenů pivovarských

kvasinek se sice pohybuje v rozmezí 25 až 30 °C, ale z technologického a kvalitativního hlediska se nevyužívají podmínky intenzivního kvasného procesu. Pro spodní kvašení se v tradiční výrobě uplatňuje studené vedení v rozsahu teplot 5 až 9 °C, u intenzifikovaných postupů teplé vedení v rozmezí teplot 12 až 16 °C. Při svrchním kvašení se teploty pohybují mezi 15 až 22 °C. Zvyšování teploty při stacionárním spodním kvašení má za následek zvýšenou aktivitu kvasinek, zhoršení trvanlivosti pěny, barvy piva, prudší pokles hodnot pH, vyšší ztráty hořkých látek, větší autolýzu kvasničných buněk a nižší akumulaci glykogenu v buňkách (Basařová, 2010).

Obr. č. 4: Embdenovo-Meyerhofovo-Parnasovo schéma (EMP) (převzato z Basařové).



### 3.2.1. Tvorba etanolu a CO<sub>2</sub>

Z 2,0665 g extraktu vzniká 1 g ethanolu, 0,9565 g oxidu uhličitého a 0,11 g kvasnic. V tomto kvasném procesu se uvolní  $569,1 \pm 5,9$  J na 1 g extraktu. V odborné literatuře lze nalézt ale různé informace, což je dáno provedením experimentu (Basařová, 2010).

Glukóza je aktivována vazbou zbytku kyseliny fosforečné za vzniku glukóza-6-fosfátu, následného vzniku fruktóza-1,6-bisfosfátu a při spotřebě dvou molekul ATP se kaskádou dalších reakcí vytvoří tříuhlíkatá sloučenina glycerinaldehyd-3-fosfát, která následně vede k tvorbě klíčové sloučeniny kyseliny pyrohroznové. Tento proces vede k tvorbě 2 molekul ATP z jedné molekuly hexózy. Za anaerobních podmínek kvasinky pyruvát dekarboxylují pyruvátdekarboxylázou na acetaldehyd, který je následně redukován za přispění alkoholdehydrogenázy na etanol za současného vzniku CO<sub>2</sub>. Během glykolýzy dochází k regeneraci ADP a produkci NADH. Protože jsou zásoby NAD<sup>+</sup> v buňce omezené, je nutné je regenerovat předáním H<sup>+</sup> z NADH jiné molekule. Tato situace je podstatou ethanolového kvašení, kdy H<sup>+</sup> je předán acetaldehydu za produkce ethanolu. Vzniklý NAD<sup>+</sup> je potřebný pro další oxidaci glukózy (Basařová, 2010; Naydenova, 2014).

### 3.2.2. Tvorba vyšších alkoholů

Syntézu vyšších alkoholů ovlivňuje složení aminokyselin, které představují hlavní zdroj asimilovatelného dusíku v mladině a jsou absorbovány kvasinkami. Vychytávání aminokyselin se děje řadou aminokyselinových transportérů nacházejících se v buněčné membráně kvasinek (Procopio, 2014). Produkce vyšších alkoholů souvisí zejm. s metabolickou dráhou izoleucin–leucin–valin (Basařová, 2010). V pivu bylo popsáno více než 35 vyšších alkoholů. Nejdůležitější sloučeniny lze klasifikovat na alifatické (n-propanol, isobutanol, 2-methylbutanol a 3-methylbutanol) a aromatické (2-fenyletanol). Alifatické vyšší alkoholy přispívají k "alkoholické" nebo "rozpuštědlové" vůni piva a vytvářejí teplo v ústech. Aromatický alkohol 2-fenyletanol má sladkou vůni a pozitivně přispívá k vůni piva, zatímco aroma tyrosolu a tryptofolu je nežádoucí (Hui, 2006). Celkové množství vyšších alkoholů kolísá mezi 50 a 150 mg/l (Basařová, 2010).

### 3.2.3. Tvorba dalších sensoricky významných látek

Z dalších významných látek vznikajících při výrobě piva lze uvést estery či karbo-nylové sloučeniny. Estery jsou tvořeny zejména v průběhu intenzivního fáze hlavního kva-



šení enzymatickou kondenzací organických kyselin a alkoholů. Těkavé estery piva lze rozdělit do dvou hlavních skupin: estery kyseliny octové a estery mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCFA). I přes širokou škálu různých esterů, které lze nalézt v pivu, má význam hlavních jako aromatické složky piva: ethylacetát (aroma po ředidlu), izoamylacetát (banánové aroma), isobutylacetát (ovocné aroma), fenyl ethylacetát (růže a medové aroma), ethylhexanoát (sladké jablečné aroma) a ethyloktanoát (kyselé jablečné aroma) (Pires, 2014). Tyto těkavé estery vznikají při reakci spotřebovávající energii a za účasti několika enzymů, např. alkohol acetyl transferázy I a II. Rovnováha mezi syntetickými enzymy vedoucími k tvorbě esterů a enzymy s hydrolytickou aktivitou je důležitá pro obsah těchto čisté míry akumulace kyseliny (Nedović, 2014).

Z karbonylových sloučenin jsou nejvíce zastoupeny acetaldehyd, glyoxal, methylglyoxal, furan-2-karbaldehyd, fenylacetaldehyd, benzaldehyd aj. Při biosyntéze valinu a izoleucinu vznikají diketony, mezi kterými má významné postavení biacetyl, jelikož je pro kvasinky toxický. Při slabé redukční aktivitě kvasinek diacetyl navíc zůstává v pivu a tím mu udílí nepříjemnou vůni a chuť. Kvasinky mají schopnost v průběhu kvašení redukovat senzorycky nepříznivé karbonylové pocházející ze sladu a jsou příčinou staré chuti piva.

Poslední skupinou jsou sirné metabolity, ze kterých mají význam zejm. sulfan, oxid siřičitý a dimetylsulfid. Tyto látky vznikají z aminokyselin methioninu a threoninu. Sulfan sám dává mladému pivu nepříjemnou vůni a chuť a dále může reagovat s alkoholy nebo aldehydy za tvorby nežádoucích thiolů. Oxid siřičitý vzniká během hlavního kvašení. Jeho přítomnost není žádoucí, jelikož způsobuje nepříjemnou příchut'. Dimetylsulfid je charakteristický ovocnou chutí a vůní mladého piva (Basařová, 2010).

Tvorba těchto doprovodných látek společně s látkami vznikajícími při výrobě sladiny a mladiny vytváří v komplexu organoleptický profil konečného produktu.

### 3.3. Stresové faktory pivovarských kvasinek

V současnosti se řada faktorů nepříznivě ovlivňujících chování kvasnic označuje jako stresové faktory. Jejich působení snižuje viabilitu i vitalitu kvasnic a může vést k poškození kvasničných buněk a v důsledku až k jejich úhynu. Přítomnost environmentálních a technologických stresů klade vyšší nároky na výběr vhodných kmenů kvasinek pro využití při výrobě piva (Sigler, 2011).

Stresových faktorů je velká šíře a reakcím na jednotlivé typy faktorů se věnuje dnes i v technologii potravin pozornost. I přes tuto variabilitu má reakce na stresové podněty společný genetický základ. Dochází tak k zastavení normálních buněčných procesů, k iniciaci exprese genů kódujících stresové proteiny a k degradaci poškozených proteinů vlivem stresu. Hlavním typem stresové odpovědi je nespecifická stresová odpověď (Sigler, 2011; Bleoanca, 2013).

Mezi fyzikální stresové faktory s významem pro pivovarství lze zařadit působení tepla. Teplotní stres zahrnuje jako působení vyšších, tak nižších teplot. Teplotní šok působící na buňky vyvolává nejen zvýšenou toleranci k pozdějším teplotním výkyvům, ale i k ethanolovému stresu případně k jiným stresům. Principem tohoto procesu je akumulace trehalózy, která zabraňuje tepelné denaturaci buněčných bílkovin (Sigler, 2011).

Dalším významným faktorem je osmotický stres, který závisí na koncentračních gradientech na cytoplazmatické membráně kvasinek. Je významný zejména u mladin s vysokou koncentrací extraktu. Podobně jako v předcházejícím odstavci, i zde hraje protektivní roli trehalóza. Pro snížení negativního vlivu osmotického tlaku lze použít kovy v zakvašované mladině a obohacení o růstové faktory (Sigler, 2011; Hohmann, 2002).

Stresovým faktorem je i působením aktivních forem kyslíku, jako jsou volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku jako např. peroxid vodíku. Tento typ stresu se označuje jako oxidativní stres, který zasahuje zejména membránové lipidy *Saccharomyces cerevisiae*. Antioxidační roli zde plní vitaminy rozpustné v tucích, vitamin A a E, které mohou zmírnit poškození strukturálních částí buněk a kyslíkem indukované růstové defekty (Sigler, 2010; Bendová, 1970).

Ethanolový stres je jedním z hlavních environmentálních stresů vznikajících při procesu vaření piva. Ethanol primárně cílí na membrány, zvyšuje jejich tekutost a propustnost, což ovlivňuje transportní systém základních sloučenin, jako jsou aminokyseliny a glukóza. Jeho hromadění ohrožuje celou řadu buněčných funkcí, což vede k redukci rychlosti metabolismu, zpomalení růstu a snížení životaschopnosti, v konečném důsledku je odpovědný za stagnaci kvašení. Při vysokých koncentracích ethanolu bylo také prokázáno, že způsobuje změny konformace proteinů a vede k jejich denaturaci, příkladem může být vliv na klíčové glykolytické enzymy pyruvátkinázu a hexokinázu (Novák, 2006; Bleoanca, 2013; Menggen, 2010). Kromě ethanolu mohou na kvasinky negativně působit mladinové kaly, některé látky s antimikrobiální aktivitou nebo některé peptidy s inhibičním účinkem (Sigler, 2011).

Z chemických vlivů lze dále vyzdvihnout působení některých kovů, které je typické ireverzibilní inhibicí některých enzymatických komplexů, nebo působení dusitanů. Dusitany vznikají působením gramnegativních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, které mají schopnost redukovat dusičnany přítomné ve vodě. Dusitany mohou působit samy negativně, kdy inhibují růst kvasinek, případně se mohou přeměnit na nebezpečné N-nitrosaminy (Basařová, 2010).

Z technologicky významných stresů lze zmínit vliv pH a opakované zakvašení. Při kvašení mladiny dochází ke snížení pH ze zhruba 5,5 na hodnotu kolem 4,0, což ovlivňuje produkci aromatických látek – produkce dimetylsulfidu se snižuje, zatímco množství diacetylu narůstá. Toto snížení pH mladiny může ovlivnit růstovou rychlost a replikativní délku života kvasinek. Kombinace nízkého pH s narůstající koncentrací ethanolu má vliv na proteiny plazmatické membrány, kdy je její stabilita nižší a vznikající buňky vykazují nízkou míru přežití. Opakované zakvašení není samostatným stresovým faktorem, ale opakovaným nasazením kvasinek může docházet ke snížení jejich viability, vitality a fermentační schopnosti. S opakovaným zakvašením dochází k postupným změnám fyziologie, flokulace, povrchového náboje a viability kvasinek (Sigler, 2011).

## 4. KULTURY KVASINEK POUŽÍVANÉ PŘI VÝROBĚ PIVA

### 4.1. Pivovarské kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, náležící mezi houby (*Fungi*). Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat některé sacharidy na ethanol a oxid uhličitý (Šilhánková, 2002).

Jako pivovarské kvasinky jsou označovány kulturní kvasinky, které se používají k produkci spodně či svrchně kvašených piv. Základních rysem standardních produkčních kvasinek jsou dobře definované vlastnosti, které by se měly měnit pouze minimálně, a to i při opakovaném nasazení (Kopecká, 2014). Pivovarské kvasinky jsou v pivovaru mikrobiologické společnosti European Brewery Convention (EBC) definovány jako kulturní kvasinky používané k produkci spodně nebo svrchně kvašených piv. Do této široké definice lze zahrnout i některé kvasinky a kvasinkové mikroorganismy používané v menší míře k výrobě speciálních piv, jako jsou Lambic, Krieg, Pombe aj. (Basařová, 2010).

Tvar buněk kvasinek souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování, jež se děje buď pučením, nebo dělením, nejčastěji je tvar krátce elipsoidní, případně vejčitý až kulovitý. (Šilhánková, 2002). Pivovarské kvasinky jsou řazeny do dvou druhů – *Saccharomyces pastorianus* a *Saccharomyces cerevisiae*. Geny důležitých vlastností jsou uloženy jak v jaderné, tak mitochondriální DNA. Kombinace chromosomů v každém jednotlivém provozním kmeni pivovarských kvasinek je jedinečná a umožňuje jeho identifikaci (Basařová et al., 2010). Pivovarské kmeny jsou typické polyploidii (výskyt tří a více chromozomových sad v buňce), nejčastěji tetraploidii nebo aneuploidii (ne všechny jsou zastoupeny ve stejném počtu) (Krescanková, 2015). Obecně se předpokládá, že větší počet kopií genu vede ke stabilitě kvasinkového organismu a může znamenat také zvýšení produkce enzymů, které vedou k rychlejším procesům v mladině. U polyploidních kmenů však bývá někdy popisována chromozomální nestabilita, což v důsledku může vést ke změně ve flokulaci a využití maltotriózy. K některým změnám ve vlastnostech kvasinek může docházet také částečnou či úplnou ztrátou mitochondriální DNA (Bokulich, 2013).

### 4.2. Svrchní a spodní pivovarské kvasinky

Kmeny svrchních a spodních pivovarských kvasinek se vzájemně liší fyziologickými a genetickými vlastnostmi a jedná se tedy dva rozdílné druhy rodu *Saccharomyces*. Svrchní kvasinky jsou geneticky blízké rodu *Saccharomyces cerevisiae*, zatímco spodní kvasinky

tvoří heterogenních druh a jsou jedním z nejlepších příkladů přirozených hybridů kvasinek (Dostálek, 2013).

Rozlišení kvasinek na spodně a svrchně kvasící je založeno zejména na jejich flokulčních vlastnostech. Flokulace je reverzibilní schopnost kvasinek se shlukovat a následně se rychle usazovat nebo stoupat k povrchu média. Principem flokulace je interakce buněčných stěn kvasinek, která, jak se dnes předpokládá, je zajišťována lektiny na povrchu jedné buněčné stěny a cukernými zbytky na buněčné stěně druhé buňky. Tato vlastnost je z hlediska technologie výroby důležitá, jelikož usnadňuje účinně odstraňovat buňky kvasinek spolu s balastními látkami z fermentačního média a ulehčuje tak následně výrobní fáze, dokvašování a filtraci. (Bokulich, 2013; Kopecká, 2015).

Svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* se používají při výrobě piv typu Ale a u dalších druhů piv s teplotním rozmezím 18 až 22 °C (Basařová et al., 2010). Tyto kvasinky jsou po skončení kvašení vynášeny na povrch fermentační kapaliny (do kvasničné deky), kde tvoří hustou pěnu (Kopecká, 2012).

Spodní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae (carlsbergensis)*, popř. (*uvarum*) se používají při výrobě piva typu ležáků v teplotním rozmezí 7 až 15 °C. Spodní kvasinky se v konečné fázi shlukují ve vločky (flokulují) a sedimentují na dně kvasné nádoby. Po stáhnutí piva se properou vodou a po promytí se znovu použijí pro další fermentaci (Kopecká et al., 2012).

Rozdíly jsou i v utilizaci sacharidů. Druhy *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* a *S. bayanus* vykazují značnou variabilitu při využívání galaktózy, maltózy, melibiózy, sacharózy a trehalózy za aerobních a anaerobních podmínek. Příkladem může být utilizace melibiózy, kdy spodejší kvasinky tento sacharid využívají a svrchně kvasící kmeny ji využívat neumí (Krescanková, 2015). Jiným příkladem může být klasický kvasný test s rafinózou, kterou svrchní kvasinky zkvašují pouze z jedné třetiny, zatímco spodní kvasinky úplně (Basařová, 2010).

### 4.3. Divoké kvasinky

Divoké nebo-li „cizí“ kvasinky jsou kvasinky jiné nežli kulturní pivovarské kvasinky. Divoké kvasinky se vyskytují v různých fázích výroby piva, největší problémy však působí při hlavním kvašení produkcí nežádoucích chutí a aromat. Mimo to mohou zpomalit či dokonce zastavit kvasný proces. Nebezpečím je také možnost jejich přenesení do výsledného produktu, kde rostou a poškozují ho. Alkohol a chmelové komponenty jsou pro většinu

bakterií inhibující. Několik mikroorganismů, které poškozují pivo, má však schopnost růst i v tomto prostředí (Matoulková, 2013, Bulgass, 2011).

Divoké kvasinky jsou běžně rozdělovány do dvou skupin:

1. Kvasinky rodu *Saccharomyces*
2. Kvasinky patřící do jiných rodů, tzv. non-*Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* je z hlediska své škodlivosti považován za více rizikový a to z toho důvodu, že je schopný růst anaerobně a může tak konkurovat kulturním kvasinkám při kvašení cukrů obsažených v mladině za současné produkce nežádoucích aromatických látek. Schopnost produkovat fenolické látky dekarboxylací fenolických kyselin mladiny je charakteristická pro amylolytické (tj. kvasinky schopné štěpit dextriny). Skupina non-*Saccharomyces* divokých kvasinek je různorodá – zahrnuje např. kvasinky rodu *Candida*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, aj.

#### 4.4. Kmenové sbírky

Proces fermentace v pivovarství je řízeným procesem výroby piva, který se neobejde bez čisté kultury, na kterou jsou kladeny vysoké požadavky. Pivovarské kvasnice se získávají od známých dodavatelů v podobě sušených nebo tekutých kvasnic (Besařová, 2010). Sbírký mikroorganismů mají v České republice dlouholetou tradici. Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC) byla oficiálně ustanovena v r. 1947 jako centrální sbírka lokálních souborů kultur spravovaných jednotlivými národními referenčními laboratořemi. V letech 2003–2004 spolupracovala CNCTC v mezinárodním projektu. Biologická centra (transformované Sbírký kultur) se stávají klíčovou rolí pro biotechnologický průmysl (Žemličková, 2006).

V současnosti, kdy se zvyšuje zájem o výrobu piva, o zavádění nových a moderních technologií, o výrobu speciálních a netypických piv, jsou kladeny vysoké nároky na jednotlivé výrobní operace a kvalitu vstupních surovin, včetně produkčního kmene kvasinek. Cílem kmenové sbírky je poskytnout dostatečné informace, aby mohla být využívána pro široké potřeby. Proto byly v průběhu minulých let ověřovány a stanovovány základní morfologické a biochemické vlastnosti jednotlivých kmenů. Zejména jednotlivým kmenům byla věnována pozornost s ohledem na technologické vlastnosti, jako jsou kvasná schopnost a sedimentace. Pozornost je však věnována také tvorbě vedlejších produktů, které ovlivňují organoleptické vlastnosti, zejména produkci vyšších alkoholů (Kohoutová, 1996).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5. CÍLE

### 5.1. Hlavní cíl:

- Popsat chování vybraných kmenů kvasinek vhodných pro spodně kvašená a svrchně kvašená piva za různých podmínek kvašení.

### 5.2. Podcíle:

- Vybrat vhodné kmeny kvasinek pro pokus v diplomové práci.
- Definovat podmínky pokusu.
- Monitorovat změny v zastoupení obsahových látek v průběhu kvašení.

## 6. METODIKA

### 6.1. Přístroje a pomůcky

- Kapalinový chromatograf Shimadzu LC-20AD Prominence
  - Kvarterní pumpa
  - Pětikanálový degaser DGU-20AR
  - Autosampler SIL – 20ACHT
  - Diferenciální refraktometrický detektor RID – 20A (vše Shimadzu)
- Kolona Agilent Zorbax NH<sub>2</sub> (4,6 x 250 mm x 5µm)
- Předkolonový cartridge filtr 0,2 µm (Optimize Technologies)
- Inkubátor INCU-Line (VWR International)
- Spektrofotometr Shimadzu UVmini-1240
- Analytické váhy GR-200-EC (A & D instruments)
- Hustoměr pro pivo a víno 45 mN/m, Sp. Gr. 20° C (UK)
- pH metr (pH Spear, Oakton Illinois, USA)
- Filtrační papír KA 4 (papírna Penštejn Keseg & Rathouzský)
- Stříkačkové filtry 0,22 µm (Cronus)
- Inkubační sterilní plastové lahve o objemu 1000 ml
- Kahan lihový
- UV zářič



- Kvasné zátky
- Běžné laboratorní pomůcky a sklo

## 6.2. Média a chemikálie

Pro zjišťování KTJ/ml v čase odběru a pro pomnožení kvasinek před samotným zaočkováním mladiny bylo zvoleno médium Malt Broth (HiMedia, Indie). Pro vaření mladiny byl vybrán sladový výtažek český světlý (Sladovna Bruntál, Česká republika) a Extrakt chmele (YC-Iso, Yakima Chief, Washington, USA).

## 6.3. Kvasinky

Mezi testované kmeny kvasinek byly zahrnuty:

- *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96
- *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146
- *Saccharomyces cerevisiae* 34/70
- *Saccharomyces cerevisiae* S-04

*Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 jsou spodní pivovarské kvasinky, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146 pak svrchní pivovarské kvasinky. Oba kmeny zastupují experimentální kmeny a byly získány z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze. Pro srovnání byly do pokusu zahrnuty dva komerční kmeny hojně se využívající. První komerčně dostupné kvasinky jsou vhodné pro výrobu ležáku a jedná se o spodní pivovarské kvasinky Saflager W-34/70 původem z kmenové sbírky Německého pivovarského institutu ve Weihenstephanu. Druhým komerčně dostupným kmenem jsou svrchní pivovarské kvasinky Safale S-04, které jsou vhodné pro výrobu piva typu Ale. Oba kmeny byly zakoupeny v běžné obchodní síti.

## 6.4. Kultivace kvasinek v médiu a v mladině

Kmeny byly před zaočkováním pomnoženy po dobu 24 hodin v médiu Malt broth při 25 °C, což je teplotní optimum růstu většiny pivovarských kvasinek. Před zaočkováním do lahví byl ještě zjištěn zákal kvasničné suspenze a byla zjištěna plotnovou metodou koncentrace buněk (KTJ/ml). Pro vlastní pokus, tedy pro monitorování vývoje zastoupení cukrů během fermentace, probíhala kultivace kvasinek v litrových sterilních lahvích (PET lahve sterilované ředěnou peroxooctovou kyselinou), pod kvasnou zátkou v 600 ml média. Médium byla mladina připravená ze sladového extraktu, chmelena na 40 BU. Každá lahev (1000

ml) byla inokulována 50 ml 24hodinové suspenze buněk kvasničné kultury. Každý ze čtyřech kmenů kvasinek byl kultivován při dvou různých teplotách, při kterých byl sledován průběh fermentace. Zvolenými teplotami byla teplota 10 °C a teplota 25 °C. Tyto teploty byly zvoleny záměrně, jelikož je při nich běžně realizována hlavní fáze kvašení spodně a svrchně kvašených piv. Pro obě teploty se pro každý kmen kvasinek provedla kultivace ve třech opakováních (pro jeden kmen kvasinek v jedné teplotě byly kultivovány 3 láhve = 3 opakování). Dále pro každou teplotu byla provedena kultivace jedné lahve bez zaočkování a tato láhev tak představovala kontrolu, ve které by neměl probíhat žádný fermentační proces, a neměla by se v ní projevit kontaminace.

Odběry pro obě testované teploty probíhaly v časech 0, 24, 48, 72, 96, 120, 192 a 216 hodin po zaočkování. Fermentace a odběry tak probíhaly celkem 9 dní. V každém čase odběru byl odebrán vzorek v celkovém objemu 50 ml a byl stanoven obsah cukrů (fruktózy, glukózy, maltózy) metodou HPLC-RI, změřeny pH a hustota. Byla také stanovena koncentrace životaschopných buněk v čase odběru (KTJ/ml) a byla sledována optická denzita (zákal) kvasničné suspenze při vlnové délce  $\lambda = 600$  nm, což je metoda pro měření hustoty buněčné suspenze.

## 6.5. Stanovení vybraných sacharidů metodou HPLC-RI

Pro separaci sacharidů se nejčastěji používají chromatografické metody. Z jednodušších metod lze uvést papírovou a tenkovrstevnou chromatografii, které jsou vhodné zejména pro mono- a disacharidy. Pro analýzu složek piva se z dalších chromatografických metod používají metody plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), metody kapalinové chromatografie – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), iontoměničová HPLC nebo kapilární elektroforetické metody (CE), např. micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). V případě GC-MS a LC-MS jsou vyvíjené metody detekce a identifikace látek drahé a často časově náročné. Metody HPLC s elektrochemickou detekcí jsou citlivé a dostatečně selektivní, proto se dnes používají pro analýzu některých přírodních látek, např. alkaloidů, vitaminů nebo antioxidantů v potravinách a nápojích. Tyto metody lze využít i pro stanovení sacharidů. (Monošík, 2013)

Pro stanovení sacharidů lze využít více metod. Mezi historicky tradiční chemické metody lze zařadit gravimetrické metody pro stanovení škrobu a titrační metody typické pro stanovení redukcujících sacharidů, např. oxidace aldóz jódem, reakce s Fehlingovým čini-

dlem, reakce s měďnatými ionty nebo některé komplexometrické reakce. Mezi fyzikální metody lze zařadit polarimetrické nebo refraktometrické metody, jejichž podstatou je měření indexu lomu. Refraktometrická detekce je založena na měření změn indexu lomu mobilní fáze s rozpouštěnou látkou a indexu lomu mobilní fáze bez rozpuštěné látky, tedy čisté mobilní fáze (Magwaza, 2015; Klouda, 2003). Citlivost metody se zvyšuje s rostoucím rozdílem v indexu lomu mobilní fáze s a bez rozpuštěné látky. Citlivost je však předmětem diskuzí. Některými autory jsou u refraktometrického detektoru kromě nízké citlivosti diskutovány i další nevýhody, jako je např. problematické využití gradientové eluce (Nogueira, 2005). Existují však studie, které refraktometrický detektor úspěšně použily a to i pro analýzu sacharidů v pivě. Současné výsledky tak prokazují dostatečnou citlivost a aplikovatelnost pro stanovení celkového obsahu sacharidů a také pro určení profilu sacharidů v pivě (Jurková, 2014). Kombinace kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí poskytuje spolehlivé výsledky pro stanovení obsahu sacharidů a to i ve srovnání s jinými detekčními systémy. HPLC-RI lze tak použít ke kvalitativní i kvantitativní analýze sacharidů v potravinách (Laczkowska, 2015).

## 6.6. Příprava vzorku pro stanovení sacharidů

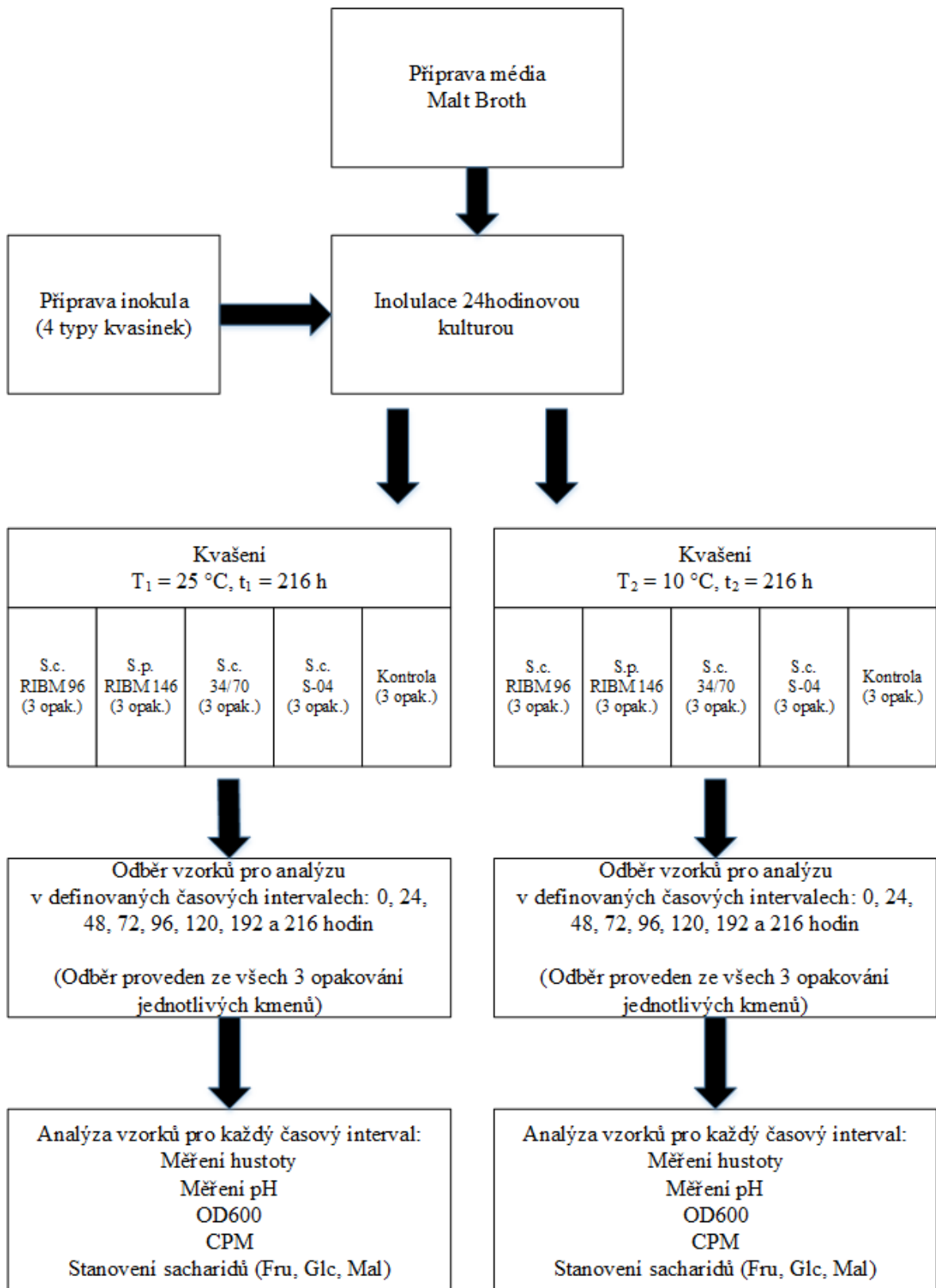
Každý vzorek v objemu 25 ml byl napipetován do odměrné baňky o objemu 100 ml, do které bylo přidáno 2x 5 ml čirících Carrezových činidel a odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou. Obsah baňky byl přefiltrován přes filtrační papír KA 4 (pomalá rychlost filtrace) a následně ještě přes stříkačkový mikrofiltr s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ . Vzorek byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie s refraktometrickým detektorem. Mobilní fází byl 70% acetonitril ve vodě. Vzorky byly eluovány izokraticky při průtoku 1,4 ml/min. Délka analýzy byla 15 minut. Každý ze tří připravených vzorků v čase odběru pro jeden kmen a teplotu byl analyzován dvakrát ( $n=6$ ).

Před vlastním stanovením byly pro fruktózu, glukózu a maltózu sestrojeny kalibrační křivky. Kalibrační řady (koncentrační rozsah 0,1–10 g/l) byly naředěny ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 100 g/l. Každý bod kalibračních křivek byl proměřen třikrát. Z rovnice lineární regrese byla vypočtena koncentrace jednotlivých sacharidů ve vzorku.

## 6.7. Doplnková měření

V každém čase odběru bylo změřeno pH pomocí pH metru Spear (Oakton Illinois, USA) a hustota pomocí hustoměru pro pivo a víno 45 mN/m, Sp. Gr. 20° C (UK). Odebraný vzorek z každého opakování byl převeden do odměrného válce a nejprve třikrát provedeno měření hustoty a následně třikrát provedeno měření pH. Ze získaných výsledků byly vypočítány průměrné hodnoty pro každé opakování. Následně bylo provedeno měření optické hustoty kvasničné suspenze pomocí spektrofotometru Shimadzu UVmini-1240 při vlnové délce  $\lambda = 600$  nm, opět ve třikrát pro každé opakování. Jako poslední součást doplňkových měření byla stanovena koncentrace životaschopných buněk v čase odběru (KTJ/ml). Pro toto stanovení bylo připraveno desetinné ředění v 5 zkumavkách. Do každé z nich bylo napipetováno 0,9 ml fyziologického roztoku. Do první zkumavky bylo napipetováno 100  $\mu$ l suspenze kvasinek z mladiny, vzorek promíchán na vortexu a přeneseno 100  $\mu$ l do druhé zkumavky. Postup byl opakován až do 5. zkumavky, ze které bylo odpipetováno 100  $\mu$ l na medium Malt Broth a rozetřeno hokejkou. Následovala kultivace pro každé opakování při 25 °C po dobu 24 hodin s následným odečtem nárůstu. Jedna láhev byla neočkována, a proto sloužila jako kontrola kontaminace.

Obr. 3: Schéma metodiky přípravy, kultivace a odběrů vzorků v diplomové práci.

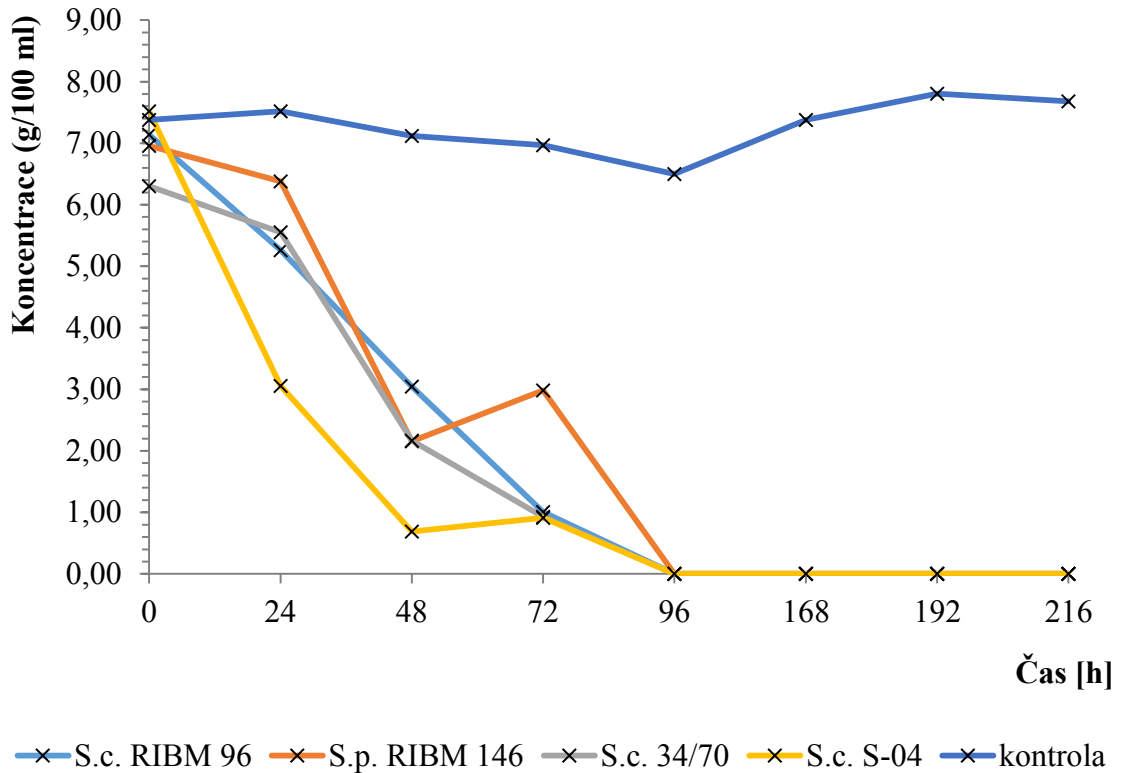


## 7. VÝSLEDKY

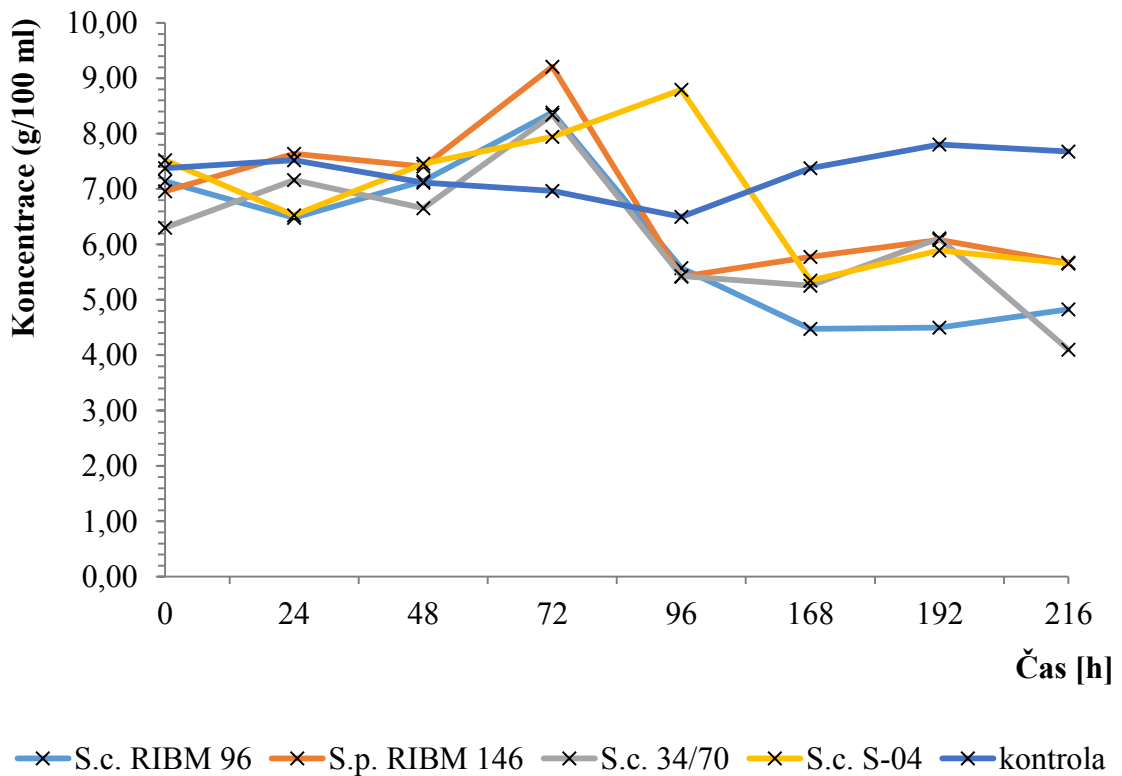
Pro celý pokus byly zvoleny čtyři kmeny kvasinek, dva kmeny spodních a dva kmeny svrchních pivovarských kvasinek. Kultivace byla provedena ve dvou zvolených teplotách odpovídajících teplotám pro hlavní fázi kvašení spodně a svrchně kvašených piv. Pro každý kmen a teplotu byly provedeny tři opakování. Všechna měření probíhala ze vzorků odebraných v celkem 8 časových intervalech. Ze získaných hodnot pro každé opakování jednotlivých kmenů byl vypočten aritmetický průměr jednotlivých výsledků měření a tyto hodnoty byly vyneseny do grafů příslušných teplot.

Následující grafy se zaměří na koncentrace vybraných sacharidů a jejich pokles v závislosti na čase. Prvním sledovaným sacharidem je maltóza, jejíž koncentrace v mladině byla ze všech sledovaných sacharidů nejvyšší a jejíž pokles není tak rychlý, neboť musí nejprve dojít k jejímu rozštěpení. U všech sacharidů je patrný rozdíl mezi utilizací při vyšší a nižší teplotě, kdy při teplotě 25 °C dochází k rychlejšímu poklesu koncentrací sledovaných sacharidů. V případě maltózy došlo při teplotě 25 °C k nejrychlejšímu poklesu u kmene *Saccharomyces cerevisiae* S-04 a od 96. hodiny je její koncentrace u všech kmenů pod mezí stanovitelnosti (Graf č. 1). Při teplotě 10 °C není pokles koncentrace maltózy tak výrazný a i po ukončení pokusu zůstává v mladině ve stanovitelné koncentraci. Největší pokles na konci pokusu lze pozorovat u kvasinek spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 a *Saccharomyces cerevisiae* 34/70 (Graf č. 2).

Graf č. 1: Koncentrace maltózy při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.

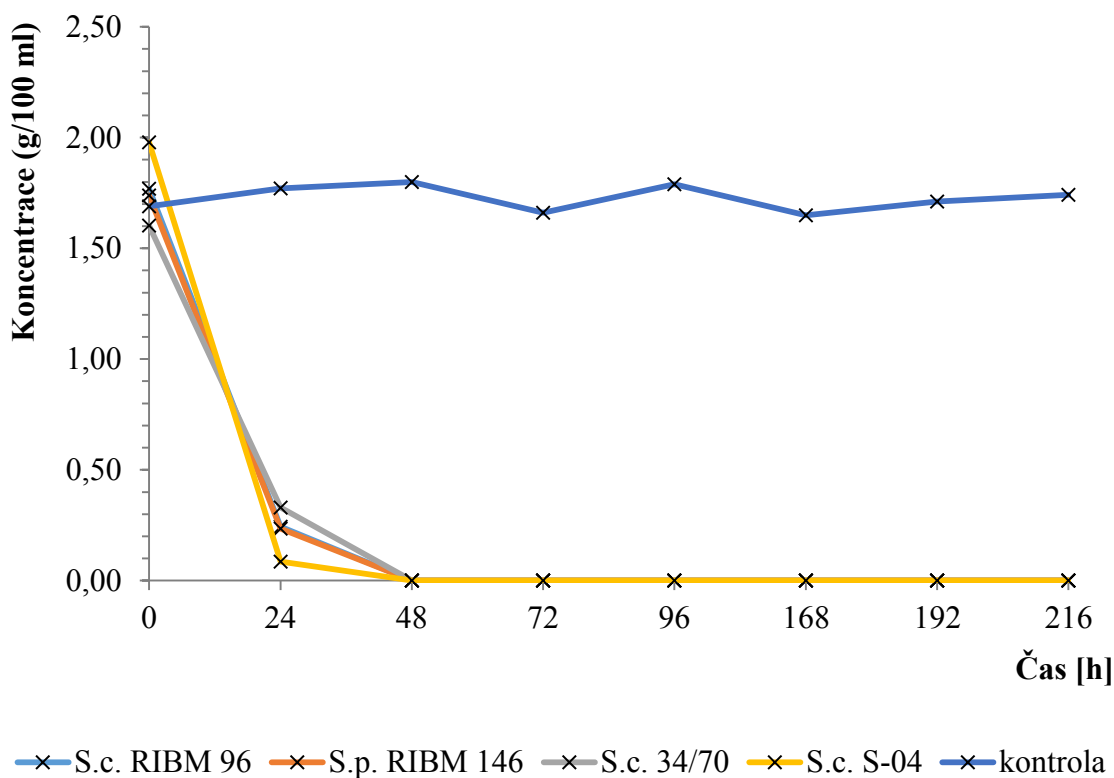


Graf č. 2: Koncentrace maltózy při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.



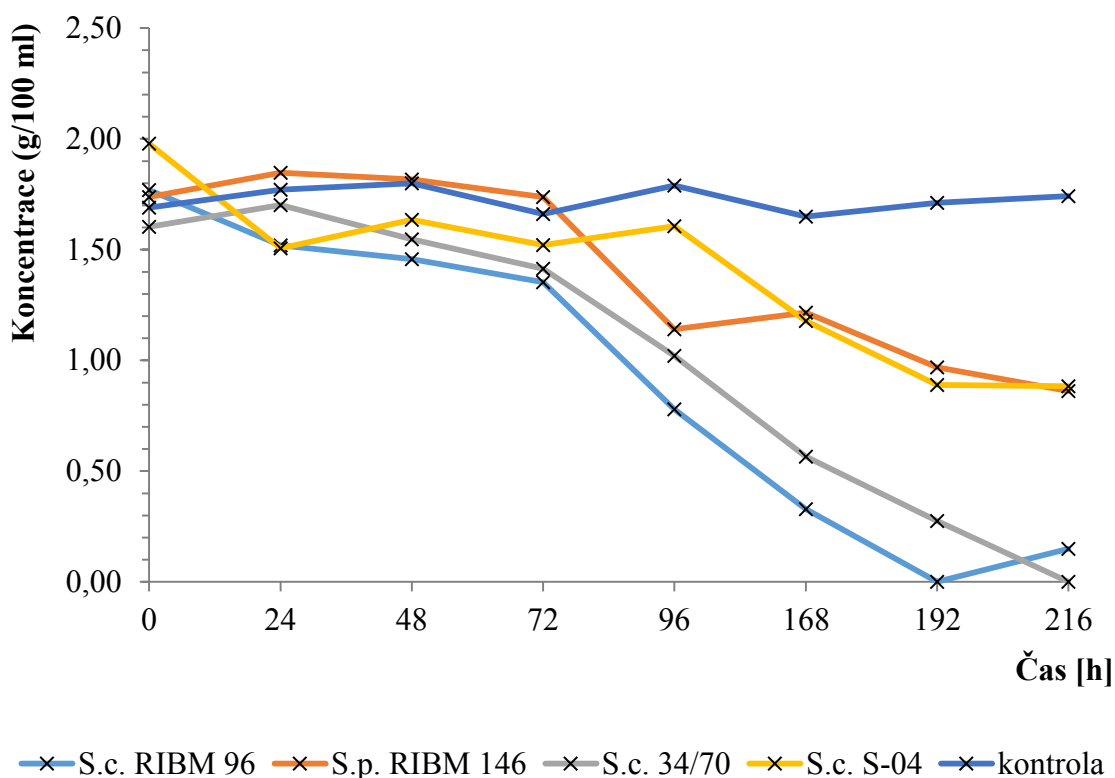
V diplomové práci byly sledovány i dva vybrané monosacharidy. Prvním byla glukóza přirozeně se vyskytující v mladině a vznikající štěpením maltózy. Rychlost utilizace glukózy byla zejména při teplotě 25 °C velmi vysoká a koncentrace v mladině po 48 hodinách byly pod mezí stanovitelnosti (Graf č. 3). Při této vyšší teplotě nebyly zaznamenány větší rozdíly mezi jednotlivými kmeny. Při teplotě 10 °C byl pokles koncentrace glukózy pomalejší (Graf č. 4). Největší a nejrychlejší pokles lze pozorovat podobně jako u maltózy u kvasinek spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 a *Saccharomyces cerevisiae* 34/70.

Graf č. 3: Koncentrace glukózy při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.



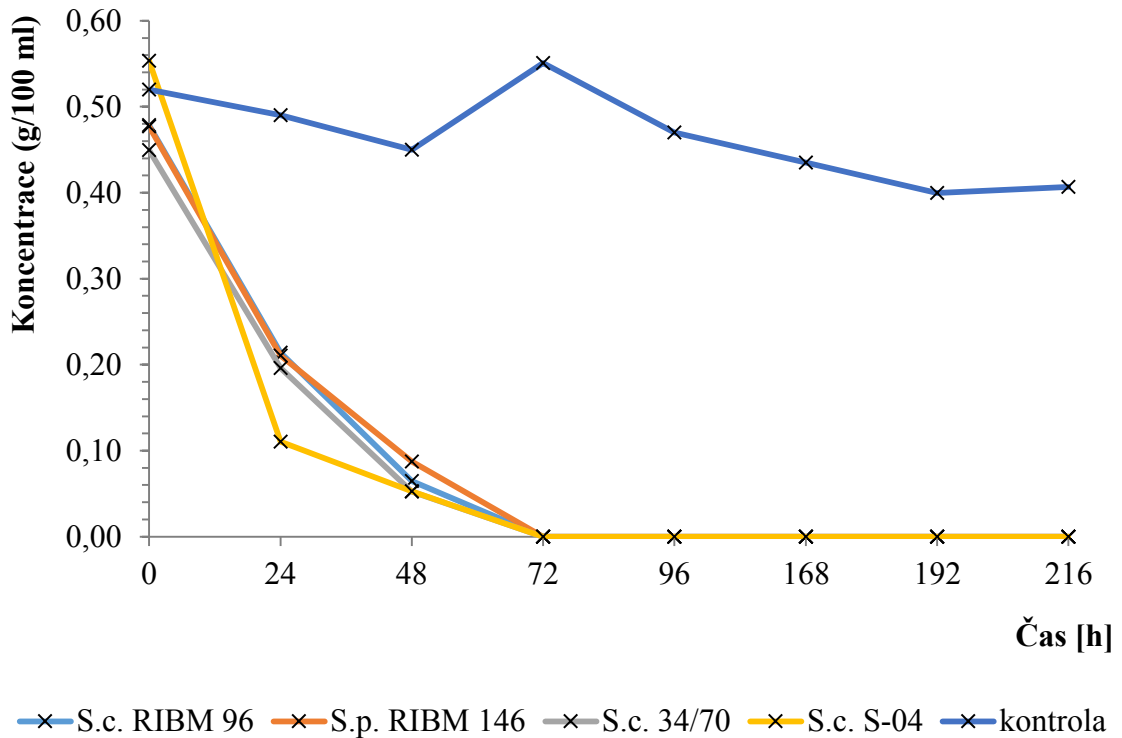


Graf č. 4: Koncentrace glukózy při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.

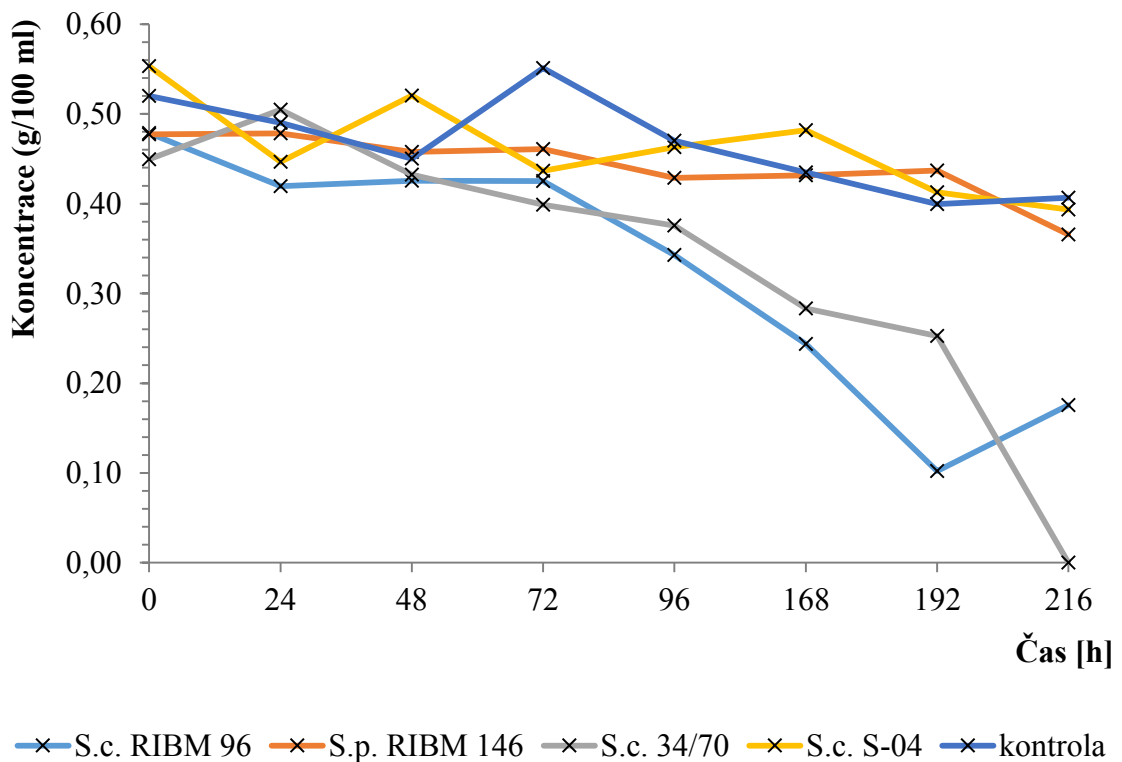


Třetím sledovaným sacharidem byla fruktóza, jejíž koncentrace byla ze všech sledovaných sacharidů nejnižší. Dynamika vývoje koncentrace ale odpovídá předcházejícím výsledkům. Při teplotě 25 °C, jak ukazuje graf č. 5, dochází k rychlé utilizaci a tak i výraznému poklesu koncentrace fruktózy u všech použitých kmenů bez větších rozdílů. Rychlejší pokles lze zaznamenat pouze u *Saccharomyces cerevisiae* S-04, ale od 72. hodiny pokusu jsou koncentrace pro tuto teplotu pod mezí stanovitelnosti u všech kmenů. Při srovnání dynamiky křivek není tento pokles tak rychlý jako u glukózy (Graf č. 3), kde došlo k výraznému poklesu již u 48. hodiny od inokulace. Při teplotě 10 °C byl pokles koncentrace fruktózy pomalejší (Graf č. 6). Opět nejvýraznější a nejrychlejší pokles koncentrací lze pozorovat u kvasinek spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 a *Saccharomyces cerevisiae* 34/70.

Graf č. 5: Koncentrace fruktózy při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.

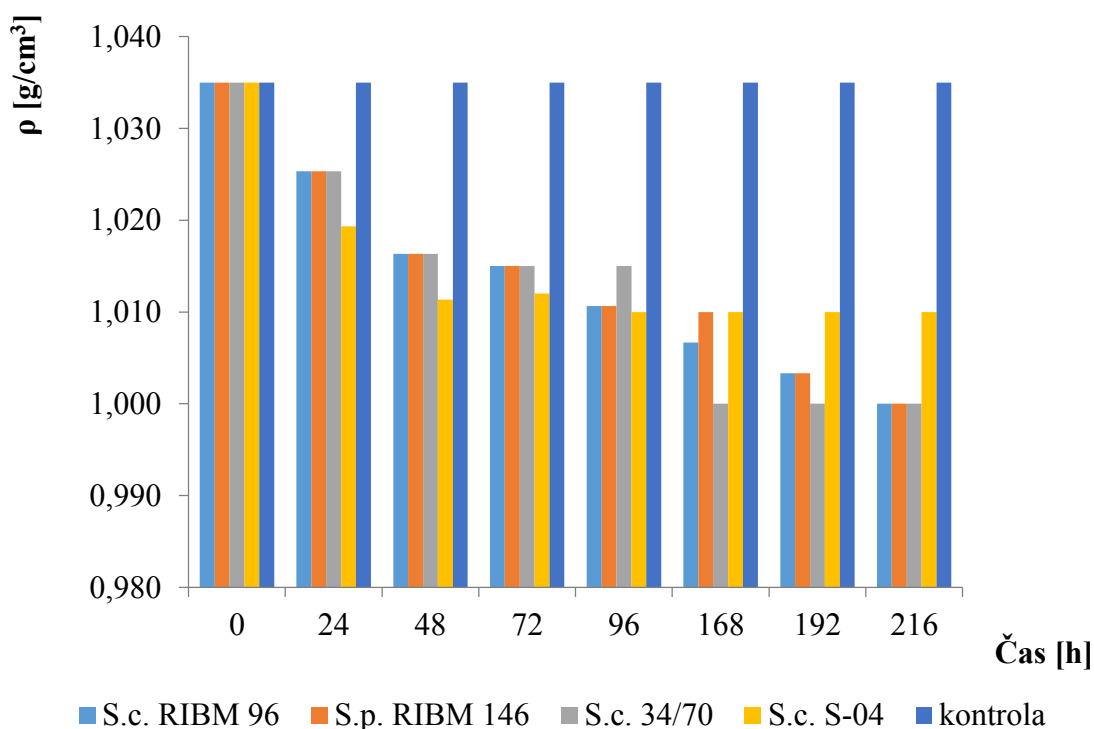


Graf č. 6: Koncentrace fruktózy při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.

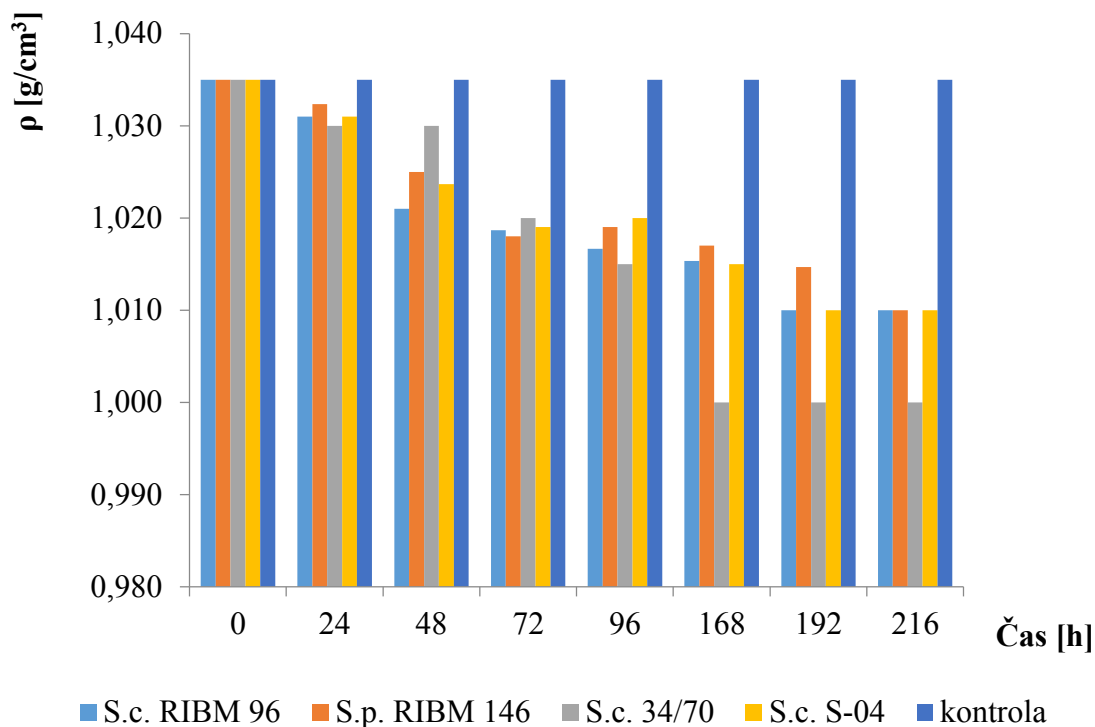


Vývoj hustoty mladiny jako první výsledky doplňkových měření ukazují grafy č. 7 a 8, ze kterých je patrný pokles hustoty v průběhu realizace pokusu. Pokles hustoty mladiny je dán utilizací sacharidů a produkcí etanolu. Z charakteru obou grafů je patrná rychlejší utilizace při teplotě 25 °C ve srovnání s teplotou 10 °C. Při teplotě 25 °C je patrný rychlejší pokles hustoty mladiny u kmene pro svrchní kvašení *Saccharomyces cerevisie* S-04, který se ale od 96. hodiny pokusu zastavil. Při nižší teplotě je patrný významný pokles u kmene *Saccharomyces cerevisiae* 34/70. V ostatních případech jsou dynamika poklesu u jednotlivých kmenů při daných teplotách i hodnoty v posledním čase odběru podobné. Hustota mladiny na počátku pokusu je pro obě teploty shodná, hodnoty hustoty v posledním čase odběru jsou při teplotě 25 °C o něco nižší ve srovnání s výsledky při teplotě 10 °C.

Graf. č. 7: Hustota mladiny při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.

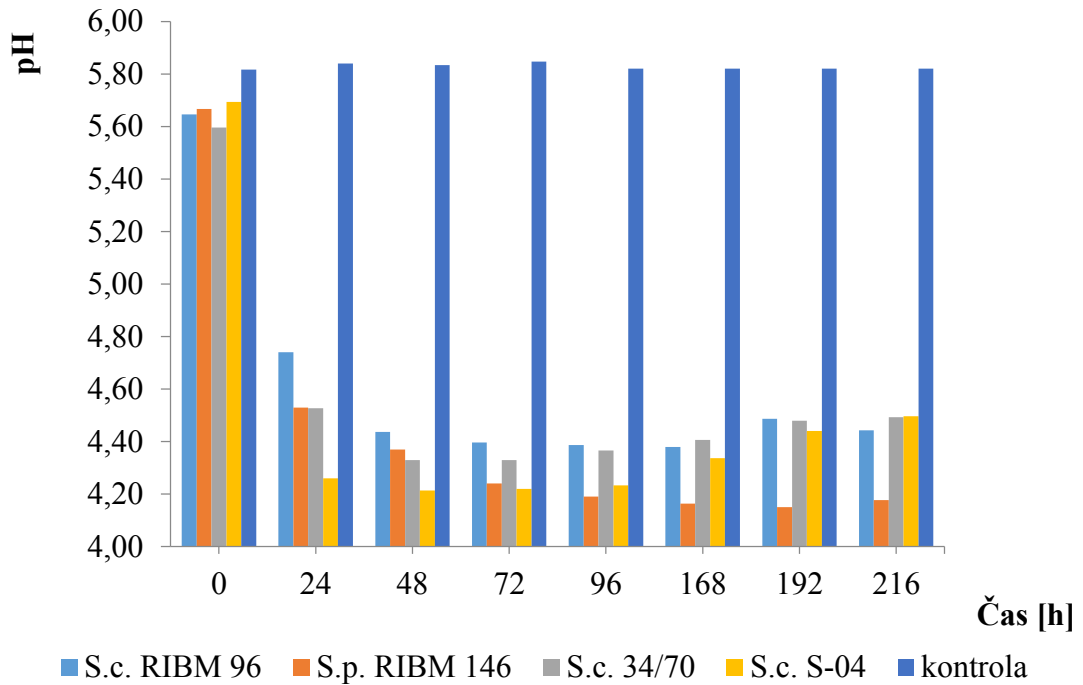


Graf. č. 8: Hustota mladiny při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.

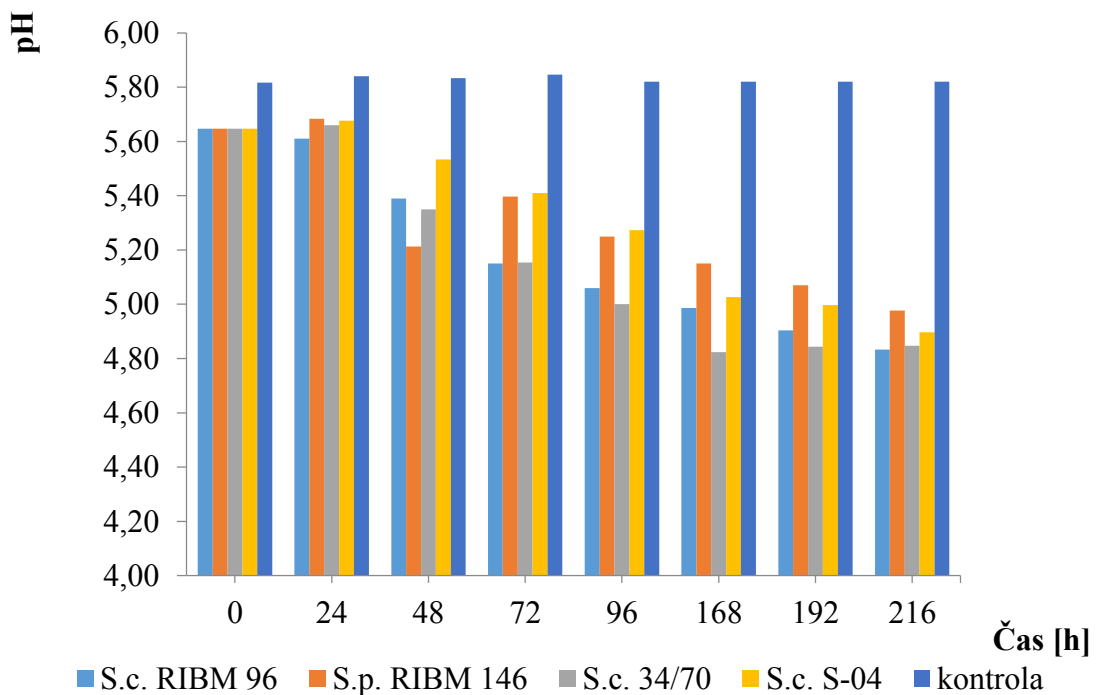


Druhou sledovanou veličinou doplňkových měření bylo pH. Z grafů č. 9 a 10 je patrný pokles pH v průběhu kvašení, což je dáno tvorbou oxidu uhličitého a organických kyselin. Na počátku kvašení byla hodnota pH zhruba 5,6 pro obě teploty. V grafech je patrný rozdíl na počátku měření mezi zaočkovanými lahvemi a kontrolou bez inokulace. Vliv teploty na pokles pH je výrazný, avšak rozdíly mezi jednotlivými kmeny v daných teplotách byly zaznamenány pouze malé. Nejrychlejší pokles pH u vyšší teploty byl zaznamenán u *Saccharomyces cerevisiae* S-04. Nejnižší hodnoty pH v 216. hodině při 25 °C bylo dosaženo u kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146. Při teplotě 10 °C nejsou zaznamenány tak významné rozdíly mezi jednotlivými kmeny. V průběhu fermentačního procesu pH klesá při teplotě 25 °C rychleji a cílové hodnoty v 216. hodině se pohybují od 4,18 u *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146 až k 4,50 u *Saccharomyces cerevisiae* S-04. Při teplotě 10 °C mají výsledné hodnoty pH menší rozdíly, od 4,83 u *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 po 4,98 u *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146.

Graf č. 9: pH mladiny při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.

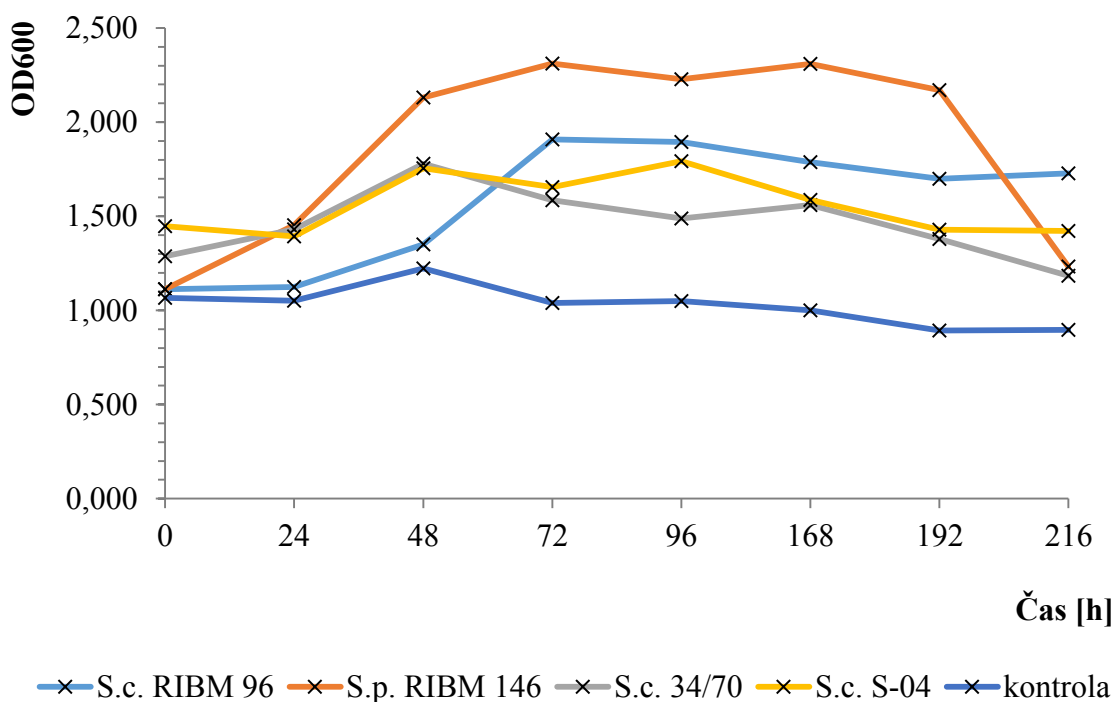


Graf č. 10: pH mladiny při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.

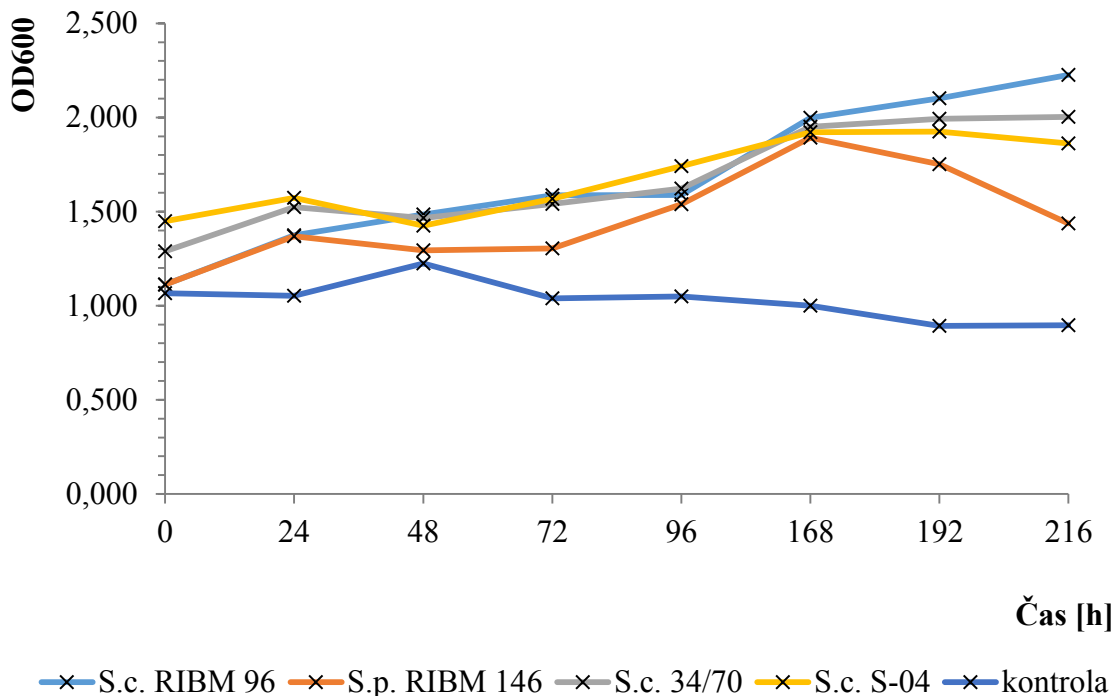


Třetí sledovanou veličinou doplňkových měření byla optická denzita kvasničné suspenze měřena při vlnové délce  $\lambda = 600$  nm. V průběhu fermentačního procesu dochází k pomnožení kvasinek a zvyšuje se tak hustota buněčné suspenze v mladině. K vyššímu zákalu na začátku kvašení a k rychlejší tvorbě zákalu dochází při teplotě 25 °C. Při této teplotě lze také pozorovat větší rozdíly mezi jednotlivými kmeny. Z grafu č. 11 je patrné, že při teplotě 25°C prokazuje nejvýznamnější zákal kmen *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146, pomalejší rychlost nárůstu v počátku fermentačního procesu lze vidět u *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96. Z graf č. 12 je patrné, že při nižší teplotě jsou rozdíly mezi jednotlivými kmeny menší. Při této teplotě je nárůst zákalu pozvolnější a úplného maxima dosahují kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96. Naopak kvasinky svrchního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 146 při této teplotě vykazuje zákal nejnižší. U obou grafů je patrná kontrola, u které nedošlo k tvorbě zákalu při žádné teplotě, což je dáno absencí kvasniční kultury v ní.

Graf č. 11: Optická denzita kvasničné suspenze při  $\lambda = 600$  nm při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.

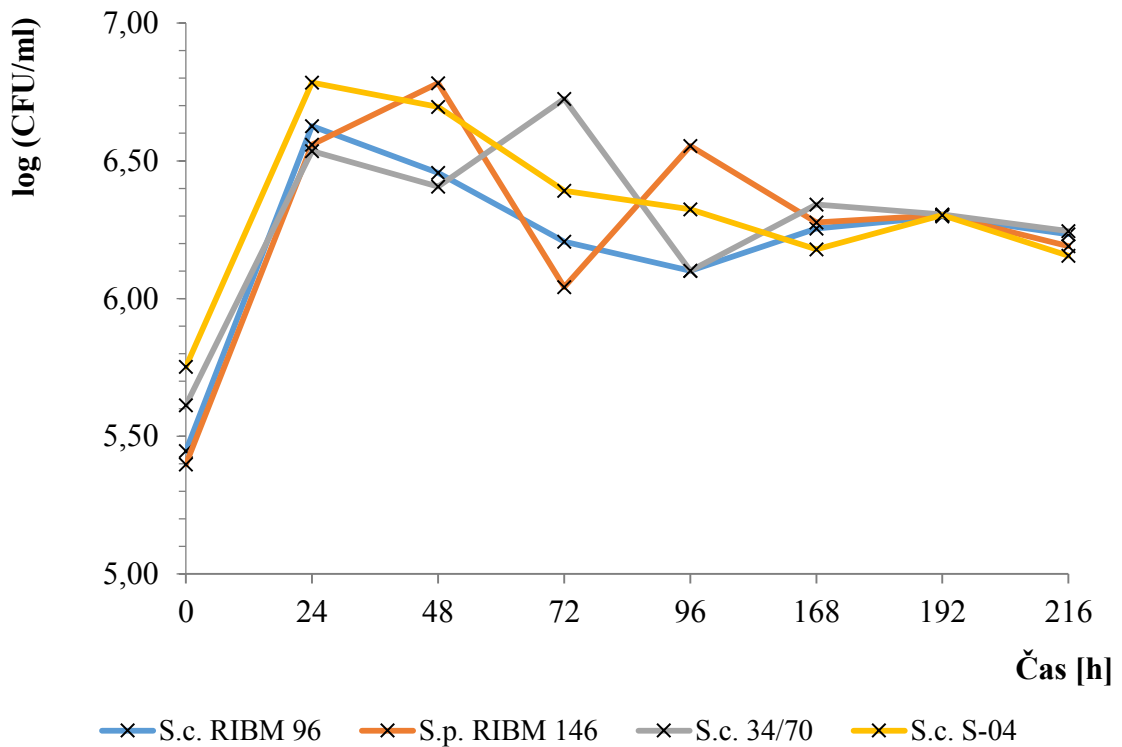


Graf č. 12: Optická denzita kvasničné suspenze při  $\lambda = 600$  nm při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.

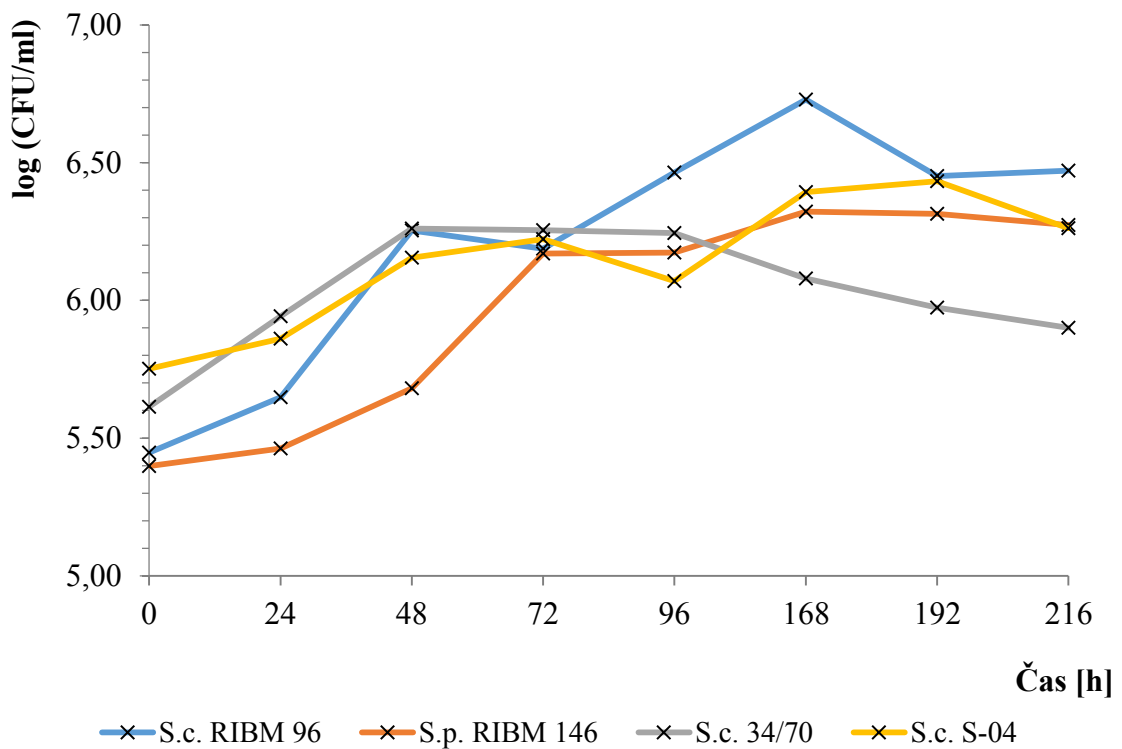


Na předcházející výsledky optické denzity navazují výsledky ukazující celkový počet mikroorganismů. Při teplotě 25 °C dochází k rychlejšímu nárůstu CPM, což je patrné u všech kmenů zejména do 24 hodin od inokulace, jak ukazuje graf č. 13. V grafech demonstrujících CPM byly pro lepší čitelnost jednotky KTJ/ml zlogaritmovány a vyneseny na osu y. Dynamika křivek pro jednotlivé kmeny je při teplotě 25 °C podobná, pomalejší nárůst je patrný u *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96, avšak výsledné hodnoty CPM v 216. hodině jsou velmi podobné. Při teplotě 10 °C, jak ukazuje graf č. 14, je nárůst CPM v čase pozvolnější ve srovnání s vyšší teplotou. Nejpomalejší nárůst CPM je u *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146, maximální hodnoty dosáhla *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96 a nejnižší *Saccharomyces cerevisiae* 37/70.

Graf č. 13: Celkový počet mikroorganismů při teplotě 25 °C v jednotlivých časech odběru.



Graf č. 14: Celkový počet mikroorganismů při teplotě 10 °C v jednotlivých časech odběru.





## 8. DISKUZE

Diplomová práce se věnovala utilizaci vybraných sacharidů čtyřmi kmeny kvasinek za podmínek dvou různých teplot, sledovala rychlost poklesu koncentrací těchto sacharidů a na základě doprovodných měření sledovala probíhající změny v mladině.

Teoretická část popsala jako hlavní zdroj uhlíku a energie u pivovarských kvasinek zkvasitelné monosacharidy, disacharidy a trisacharidy mladiny, jejichž zastoupení je odvislé od způsobu přípravy mladiny, od použitých surovin a také od varního postupu. Diplomová práce využila v rámci modelového pokusu přípravu mladiny se sladovým výtažkem. Zvolené sledované sacharidy byly maltóza, glukóza a fruktóza. Sledování utilizace sacharidů není důležité pouze z energetického hlediska, ale obsah sacharidů má vliv i na organoleptické vlastnosti.

Maltóza jinak označovaná jako sladový cukr a z ní vznikající glukóza jsou v rámci fermentačních procesů standardně sledovány. V diplomové práci byla sledována ale i fruktóza, která je 4,5krát sladší než glukóza, vyskytuje se přirozeně v ovoci, může být využita i v procesu výroby piva. Pro zlepšení sensorických vlastností piva se může použít přídatek sacharidů po vykvašení. Sacharidy takto přidané jsou využity pro sekundární kvašení během ležácké fáze piva anebo jako přídatek do filtrovaného lahvového piva. Tak se vytvářejí nové zajímavé příchutě, kdy se vychází ze stimulační úlohy sladké chuti při vnímání ostatních aromatických složek. V případě přidání fruktózy dochází k podpoře vnímání citrusové chuti. V případě diplomové práce ale byla sledována utilizace fruktózy, tedy její koncentrace v dřívější fázi výroby. Teoreticky se může fruktóza uvolnit ze sacharózy, ale její množství přirozeně se vyskytující v mladině je popisováno jako velmi nízké. Dalším faktorem ovlivňující nízký obsah fruktózy je účinnost sacharázy, která je při rmutování kvůli teplotě omezena. Při klasické výrobě piva z tradičních surovin nemusí mít fruktóza a její utilizace zásadní význam. Jelikož v pokusu diplomové práce byl použit sladový výtažek z důvodu nižší časové náročnosti, je pravděpodobnost obsahu fruktózy vyšší, což je dáno potenciální izomerací při hydrolytických reakcích při výrobě výtažku. Proto byl dotázán výrobce Sladovna Bruntál, zda v uváděném celkovém obsahu sacharidů je zahrnuta i fruktóza. Ředitel sladovny Ing. Vavřík se k zaslanému dotazu vyjádřil: „Dobrý den, sladový výtažek je přírodní produkt, takže poměr sacharidů v něm je poměrně proměnlivý. Obsah glukózy a fruktózy jsme párkrát měřili na kapalinové chromatografii, kde ale byl problém, že se sacharóza hydrolyzuje na glukózu a fruktózu, takže v podstatě skutečný obsah sacharózy, glukózy a fruktózy přesně změřit nešlo. Většinou jsme naměřili mezi 8,5-12% fruktózy a 2-4% glukózy.

[...]“ Z tohoto důvodu byla v práci fruktóza sledována společně s dvěma předcházejícími sacharidy.

Glukóza i fruktóza jsou sacharidy transportující se do těla kvasinek facilitovanou difúzí. Na rozdíl od nich, maltóza vstupuje do buňky nerozložená a vyžaduje aktivní transport. Proteiny transportérů a enzymy hydrolyzující maltózu se nejprve musí syntetizovat, což může zpomalit utilizaci maltózy. Navíc indukci syntézy těchto proteinů inhibuje glukóza, při jejíž vysoké koncentraci v médiu může po rychlém rozkvašení dojít k zastavení kvasného procesu.

Připravená mladina vykazovala podobné koncentrace všech tří sacharidů v čase to jako ukazují publikované odborné práce. Starší práce od Patel (1973), která uvádí všechny tři sacharidy a jejich utilizaci do sta hodin od inokulace, má počáteční koncentraci maltózy 62,8 g/l, glukózy 14,7 g/l a fruktózy 1,3 g/l, což jsou hodnoty blízké odnotám změřeným v diplomové práci. Práce Hodžic (2008) ukazuje, že fruktóza se v mladině přirozeně vyskytuje a náhradou, byť částečnou, za jiné obilniny se obsah maltózy nemění tolik, jako obsah fruktózy. Z novějších prací uvádí složení třech použitých typů mladiny Huuskonen (2010), které měly 3–5 g/l fruktózy, 80–120 g/l maltózy a variabilní obsah glukózy 13, 25 a 62 g/l glukózy. Z dalších prací lze uvést práce Liu (2016), Gibson (2008) nebo Boulton (1991), které ve shodě s předchozími studii a s výsledky diplomové práce, uvádějí podobné koncentrace sacharidů na začátku fermentačního procesu. Charakter křivek se v čase liší, což je dáno jednak podmínkami fermentace, kdy nižší teplota v diplomové práci vedla k prodloužení časů poklesu koncentrací, navíc s diferenciací mezi kmeny svrchního a spodního kvašení. Z českých prací je možné výsledky diplomové práce porovnat s prací Nováka (2004). V této práci byla počáteční koncentrace maltózy 68,3 g/l, glukózy 17,4 g/l a fruktózy 3,3 g/l. K výraznému poklesu koncentrace maltózy (snížení koncentrace na minimum se současným zpomalením poklesu) u kmenů spodního kvašení při teplotě 13 °C došlo za 100 hodin s výraznými rozdíly mezi zvolenými třemi kmeny. Při teplotě 9 °C, což je teplota typická pro piva českého původu, se rozdíly mezi kmeny snížily a k poklesu došlo později. V případě diplomové práce u teploty 10 °C byly poklesy po celou dobu sledování nevýrazné. U teploty 25 °C byl nejrychlejší pokles zaznamenán u kmene *Saccharomyces cerevisiae* S-04 (kvasinky svrchního kvašení) a to již po 48 hodinách. U ostatních kmenů byl pokles koncentrace maltózy pozvolnější, ale stále výrazně patrný. K poklesu koncentrace glukózy u Nováka (2004) došlo kolem 40. hodiny. V diplomové práci k poklesu tohoto sacharidu u všech kmenů při teplotě 25 °C do 24 hodin od inokulace a při teplotě 10 °C u spodních kvasinek

kolem 192. hodiny. U svrchních kvasinek byla rychlost utilizace glukózy při teplotě 10 °C výrazně pomalejší. Při utilizaci fruktózy dochází u Nováka (2004) k poklesu mezi 40. a 60. hodinou. V případě diplomové práce je pokles koncentrace fruktózy dle očekávání pomalejší než utilizace glukózy a při teplotě 25 °C dochází k poklesu mezi 48. a 72. hodinou a při teplotě 10 °C mezi 192. a 216. hodinou u kmenů spodního kvašení.

Doplňková měření využívají nepřímé sledování fermentačních procesů založené na měření změn vlastností mladiny z důvodu úbytku substrátu a přírůstku produktů. Pokles hustoty je tak dán poklesem koncentrace sacharidů s vyšší hustotou a vznikem ethanolu s nižší hustotou. Podobně i tvorba organických kyselin a oxidu uhličitého vede při fermentaci ke snížení pH mladiny. Zmnožení kvasinek lze pak pozorovat jako zvýšení zákalu, tedy zvýšení optické denzity. Pokles hustoty byl v pokusu diplomové práce při teplotě 25 °C z hodnoty 1,035 g/cm<sup>3</sup> na hodnoty 1,000 g/cm<sup>3</sup> a pokles je plynulý bez výrazného zlomu. Při teplotě 10 °C je pak tento pokles ještě mírnější. Při srovnání s prací Boulton (1991), který v pokusu dosáhl hodnot 1,010 g/cm<sup>3</sup> již kolem 80. hodiny, nejsou výsledky diplomové práce tak výrazné a snadno čitelné.

Snížování hodnoty pH kvašení je způsobeno posunutím tlumivé schopnosti zkvašované mladiny do kyselější oblasti tvorbou těkavých a organických kyselin. Původní hodnoty pH mladiny jsou v literatuře uváděny kolem 5,2 až 5,7 a sníží se v průběhu fermentace na 4,3 až 4,7, přičemž pH kvasinkových buněk se prakticky nemění a zůstává na hodnotě přibližně 6,0 (Basařová, 2010). Existují studie, které tento rozsah popisují jako výraznější, např. Misihairabgwi (2014) uvádí pokles z 5,25 na konečné hodnoty 3,50. Existuje mnoho studií, které popisují, že pivo obsahuje organické kyseliny, jako je acetát, malát, citrát, fumarát, formiát, laktát, sukcinát, aj. Organické kyseliny jsou jedním z důležitých sloučenin přítomných v pivu, které mají nejen hlavní vliv na kyselou chuť piva, ale některé z nich také přispívají k dalším sensorickým vlastnostem. Kromě toho, organické kyseliny mají také vliv na hodnoty pH, a ve svém důsledku vedou k chuťové stabilitě (Li, 2015). Dalším důvodem, proč je výhodné snížení pH v mladině je význam v ochraně piva před patogenními bakteriemi. V počátečních fázích fermentace se jedná zejména o gram-negativní patogeny (*E. coli* a *S. Typhimurium*) (Menz et al. 2010). Při sledování pH v diplomové práci došlo k jeho výraznému poklesu při teplotě 25 °C velmi rychle již po 24 hodinách od inokulace a to z hodnot kolem 5,6 na hodnoty kolem 4,4. Při teplotě 10 °C byl pokles výrazně mírnější. Podobně rychlého a o něco výraznějšího poklesu bylo dosaženo v pokusu Liu (2016) při použití *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-05 při 21 °C. Podobné výsledky měření pH

publikovala i Steiner (2011). Je však otázkou, jak by se pH vyvíjelo dále, neboť bylo prokázáno, že pH závisí na čase fermentace a je možné, že některé kvasinky přítomné následně v dokvašovací lahvi by se autolyzovaly a pH roztoku by se mohlo mírně zvýšit, zejména ve vyzrálém pivě (Pires, 2014).

Při srovnání nárůstu celkového počtu mikroorganismů s prací Boulton (1991) jsou hodnoty v diplomové práci o něco nižší s maximem log (CFU/ml) kolem hodnot 6,8 ve srovnání s citovanou studií, která dosahovala hodnot log (CFU/ml) kolem 7,4. I charakter křivky se lišil a ve shodě se všemi předcházejícími výsledky lze usuzovat, že mnou provedený pokus měl pomalejší začátek fermentace. Z pokusů také vyplývá, že při nižších teplotách je fermentační proces u spodních kvasinek efektivnější a potvrzují se teplotní optima zvláště pro svrchní a spodní kvasinky.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala utilizací zkvasitelných sacharidů (maltóza, glukóza a fruktóza) vybranými kmeny pivovarských kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae* RIBM 96, *Saccharomyces pastorianus* RIBM 146, *Saccharomyces cerevisiae* 34/70 a *Saccharomyces cerevisiae* S-04). Kromě sledování změn koncentrace vybraných sacharidů byla provedena doplňková měření – měření pH, hustoty, optické denzity a stanoven CPM.

Na základě získaných výsledků lze formulovat následující závěry:

- V připravené mladině byla maltóza převládajícím zkvasitelným sacharidem.
- Glukóza byla využívána kvasinkami rychleji než fruktóza a maltóza a byla tak využívána jako přednostní zdroj uhlíku a energie.
- Po glukóze je druhým sacharidem, který kvasinky zkvašují, fruktóza, následovanou disacharidem maltózou, což je dáno vlivem vyšší koncentrace glukózy na začátku fermentace.
- Při teplotě 25 °C probíhá fermentace pivovarskými kvasinkami rychleji a efektivněji ve srovnání s fermentací při teplotě 10 °C.
- Mezi průběhem zkvašování maltózy, glukózy a fruktózy použitým kmeny byly pozorovány odchylky.
- Kvasinky spodního kvašení vykazovaly vyšší míru efektivity při fermentaci za nižší teploty (10 °C) ve srovnání s kvasinkami svrchního kvašení.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. ALVES J., J. M. THEVELEIN a B. U. STAMBUK. Expression of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucoside transporters under different growth conditions, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2014, roč. 31, s. 1-8.
2. BASAŘOVÁ, Gabriela., et al. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*, Vydavatelství VŠCHT, Praha 2010, ISBN: 978-80-7080-734-7.
3. BASAŘOVÁ, Gabriela. Vývoj teorie a praxe kvašení a dokvašování piva, *Kvasný průmysl*, 2002, roč. 48, č. 3, s. 61- 66.
4. BASAŘOVÁ, G.; ČEPIČKA, J. *Sladařství a pivovarství. 2.* Praha: SNTL, 1986. 256 s.
5. BASAŘOVÁ, Gabriela a kolektiv autorů. *Sladařství – Teorie a praxe výroby sladu*, 1. vyd., Havlíček Brain Team, Praha 2015, ISBN: 978-8087109-47-2.
6. BASAŘOVÁ, Gabriela a Ivo HLAVÁČEK. *České pivo*, 2.vyd. 1999, ISBN 80-85903-08-3.
7. BELITZ, Hans-Dieter, Werner GROSCHE a Peter SCHIEBERLE. *Food Chemistry*, 3.vyd. Würzburg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004, ISBN 3-540-40818-5.
8. BENDO VÁ, O., V. KURZOVÁ a B. PARDONOVÁ. Typizace kmenů pivovarských kvasinek. *Kvasný Průmysl*. 1970, roč. 16, s. 185-191. ISSN: 0023-5830.
9. BOULTON, A.,Chris. Developments in Brewery Fermentation, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1991, roč. 9, s. 127-182. ISSN: 0264-8725.
10. BLEOANCA, Iulia a Gabriela BAHIRIM, Overview on Brewing Yeast Stress Factors, *Romanian Biotechnological Letters*, 2013, roč. 18, č. 5, 8559-8572.
11. BLEOANCA, Iulia et al. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, roč. 116, č. 6, s. 697-705.

12. BOKULICH, Nicholas., A. a Charles W. BAMFORTH. The Microbiology of Malting and Brewing, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, roč. 77, s. 157-172.
13. BRÁNYIK, Tomáš et al. Growth model and metabolic activity of brewing yeast biofilm on the surface of spent grains: a biocatalyst for continuous beer fermentation, *Biotechnology progress*, 2004, roč. 20, č. 6, s. 1733-1740.
14. BUGLASS, Alan, J. *Handbook of Alcoholic Beverages*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2011, ISBN 978-0-470-51202-9.
15. BUREŠOVÁ, Iva a Eva LORENCOVÁ. *Výroba potravin rostlinného původu, Zpracování obilovin*, Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2013, ISBN 978-80-7454-278-7.
16. CABALLERO, I., C. A. BLANCO a M. PORRAS. Iso - $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage, *Trend in Food Science & Technology*, 2012, roč. 26, s. 21-30.
17. CEJPEK, Karel. Vonné a chuťové složky sladů, *Chemické listy*, 2014, r. 108, s. 426-435.
18. ČEPIČKA, Jaroslav, et al. Obsah dusičnanů ve varních vodách a v pivech východočeských pivovarů, *Kvasný průmysl*, 1991, roč. 37, č. 8-9.
19. DOSTÁLEK, Pavel et al. Sekvence genomu spodní pivovarské kvasinky, *Kvasný průmysl*, 2013, roč. 59, s. 10-11.
20. ENGE, Jan et al. Technologické aspekty infuzních a dekokčních způsobů rmutování, *Kvasný průmysl*, 2005, roč. 51, č. 5, s. 158-165.
21. INGR, Ivo. *Zpracování zemědělských produktů*. 2. nezměněn. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 80-7157-520-8.
22. GIBSON, R., Brian et al. Carbohydrate Utilization And The Lager Yeast Transcriptome During Brewery Fermentation. *Yeast*, 2008, Roč. 25, S. 549-562.

23. GIBSON, Brian et al. Variation in  $\alpha$ -acetolactate production within the hybrid lager yeast group *Saccharomyces pastorianus* and affirmation of the central role of the *ILV6* gene, *Yeast*, 2014, r. 32, č. 1, s. 301-316.
24. GOUS, W. Peter a Glen P. FOX. Amylopectin synthesis and hydrolysis - Understanding isoamylase and limit dextrinase and their impact on starch structure on barley (*Hordeum vulgare*) quality. *Trend in Food Science & Technology*, 2016, ISSN: 0924-2244.
25. GUPTA, M., N. ABU-GHANNAM a E. GALLAGHAR. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products, *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, roč. 9, č. 3, s. 318-328.
26. HÁJEK. Vysvětlení pojmů slad a přehled druhů sladů. *Projektysipvz.gytool.cz* [online]. 2005 [cit 2017-05-08]. Dostupné z: <http://projektysipvz.gytool.cz/Projektysipvz/Default.aspx?uid=46>
27. HAVLOVÁ, Pavla.  $\beta$ -glukany a jejich význam pro pivovarství. *Kvasný průmysl*, 2001, roč. 47, č. 6, s. 174-5.
28. HE, Yang et al. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review, *Journal of The Institute of Brewing*, 2014, roč. 120, č. 3, s. 157-163.
29. HODŽIC, Z., B. BANJANIN a J. SADADINOVIĆ. Fermentable carbohydrates determination in different worts by HPLC-RI, *Journal of Engineering annals of fakulty of engineering hunedoara*, 2008, ISSN 1594-2665.
30. HOFTA, P., P. DOSTÁLEK a G. BASAŘOVÁ. Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol?, *Chemické listy*, 2004, roč. 98, s. 825-830.
31. HOHMANN, Stefan. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, roč. 66, č. 2, s. 300-372.
32. HUI, Y., H. et al. *Handbook of Food science, Technology, and Engineering*, 1. vyd. Taylor & Francis Group, USA, 2006, ISBN 1-57444-551-0.



33. HUUSKONEN, Anna et al. Selection from Industrial Lager Yeast Strains of Variants with Improved Fermentation Performance in Very-High-Gravity Worts, *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, roč. 76, č. 5, s. 1563-1573
34. JUSTÉ, Annelies et al. Microflora during malting of barley: Overview and impact on malt quality. *Brewing Science*, 2011, roč. 64, s. 22-31.
35. HU, Shumin et al. Relationship between levels of diastatic power enzymes and wort sugar production from different barley cultivars during the commercial mashing process of brewing, *Starch*, 2013, roč. 66, s. 615-623.
36. CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*, 1.vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007, ISBN 978-80-247-1616-9.
37. JURKOVÁ, Marie et al. Determination of Total Carbohydrate Content in Beer Using Its Pre column Enzymatic Cleavage and HPLC-RI, *Food Analytical Methods*, 2014, r. 7, č. 8, s. 1677-1686.
38. KADLEC, Pavel et al. *Technologie potravin: Co byste měli vědět o výrobě potravin?*. První. Ostrava: KEY Publishing s.r.o., 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.
39. KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0510-2.
40. KANAUCHI, Makoto, Wakana ISHIKURA A Charles W. BAMFORTH.  $\beta$ -Glucans and Pentosans and their Degradation Products in Commercial Beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, roč. 1117, č. 1, s. 120-124.
41. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2.vyd. Ostrava, 2003, ISBN 80-86369-07-2.
42. KOHOUTOVÁ, Petra a Ida HOLLEROVÁ, Sbírká pivovarských kvasinek VÚPS, *Kvasný průmysl*, 1997, roč. 43, č. 1, s. 8-9.
43. KOPECKÁ, J., D. MATOULKOVÁ a M. NĚMEC. Povrchové vlastnosti a taxonomie pivovarských kvasinek, *Kvasný průmysl*, 2014, roč. 60, č. 7-8, s. 182-190.

44. KOPECKÁ, J., D. MATOULKOVÁ a M. NĚMEC. Kvasinky a jejich využití, *Kvasný průmysl*, 2012, roč. 58, č. 11-12, s. 326-335.
45. KOSAŘ, K., S. PROCHÁZKA a kolektiv autorů. *Technologie výroby sladu a piva*, 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2000, ISBN 80-902658-6-3.
46. KOWALCZYK, Dariusz et al. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets, *Journal of The Institute of Brewing*, 2013, roč. 119, č. 3, s. 103-110.
47. KRESCANKOVÁ, Katarína et al. Charakterizace technologicky využívaných kvasinek rodu *Saccharomyces*, *Kvasný průmysl*, 2015, roč. 61, č. 6, s. 174-185.
48. KROFTA, Karel et al. Vliv oxidačních produktů beta kyselin chmele na hořkost piva, *Kvasný průmysl*, 2013, roč. 59, č. 10-11, s. 306-312.
49. LACZKOWSKA, M., E. MALCZAK a A. BARYGA. Metoda HPLC/RI ke stanovení sacharidů v cukrovarnických meziproduktech a výrobcích. *Listy cukrovarnické a Řepařské*, 2015, roč. 131, č. 7-8, s. 255-257.
50. LARSEN-HOUGHTON, Jens a Andres BRANDT. Fermentation of High Concentrations of Maltose by *Saccharomyces cerevisiae* Is Limited by the COMPASS Methylation Complex, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, r. 72, č. 11, s. 7176-7182.
51. LEI, Hongjie et al. Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, r. 122, č. 5, s. 583-588.
52. LI, Hong et al. Technological Factors Influencing Buffering Capacity of Wort, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2015, roč. 73, č. 3, s. 236-239.
53. LI, Hong a Fang LIU. Changes in Organic Acids During Beer Fermentation, *China National Research Institute of Food and Fermentation Industries*, 2015, r. 73, č. 3, s. 275-279.

54. LIU, Shao-Quan a Althea Ying Hui QUEK, Evaluation of Beer Fermentation with a Novel Yeast *Williopsis saturnus*, *Food Technology a Biotechnology*, 2016, roč. 54, č. 4, s. 403-412.
55. MAGWAZA, Lembe Samukelo a Umezuruike Linis OPARA. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products. *Scientia Horticulturae*. 2015, 184, 179-192. ISSN 3044238.
56. MAIFRENI, Michela et al. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment, *Food Control*, 2015, roč. 50, s. 809-814.
57. MALOMO, Olu et al. Effect of Enzymes on the Quality of Beer/Wort Developed from Proportions of Sorghum Adjuncts, *Scientific Research, Advances in Microbiology*, 2012, r. 2, s. 447-451.
58. MATOULKOVÁ, Dagmar. Pivovarství a taxonomie pivovarských kvasinek. *Kvasný průmysl*, 2007, roč. 53, s. 206-214. ISSN: 0023-5830.
59. MATOULKOVÁ, D., J. KOPECKÁ a P. KUBIZIANKOVÁ. Mikrobiologie pivovarské výroby – Divoké kvasinky a metody jejich detekce, *Kvasný průmysl*, 2013, roč. 59, č. 9, s. 246 – 257.
60. MATOULKOVÁ Dagmar et al. Occurrence and species distribution of strictly anaerobic bacterium *Pectinatus* in brewery bottling halls. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 2012, roč. 70, č. 4, s. 1-4.
61. MENGGEN, Ma a Lewis LIU. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, roč. 87, č. 3, s. 829-845.
62. MENZ, Garry et al. The growth and survival of food-borne pathogens in sweet and fermenting brewers' wort, *International Journal of Food Microbiology*, 2010, r. 140, č. 1, s. 19-25.
63. MIKYŠKA, Alexandr a Martin SLABÝ. Studium energetických úsporných systémů chmelovaru pro výrobu Českého piva. *Kvasný průmysl*, 2015, roč. 61, č. 2, s. 26-33.
64. MIRISOLA, M., G., R. J. BRAUN a D. PETRANOVIC. Approaches to study yeast cell aging and death, *Fems Yeast Research*, 2014, r. 14, č. 1, s. 109-118.

65. MISIHAIRABGWI, J., M., I. KUDITA a R. ZVAUYA. Application of high gravity fermentation wort to the brewing of industrial opaque beer, *Journal of Brewing and Distilling*, 2015, r. 6, č. 1, s. 1-8.
66. MOLL, Manfred, et al. Beer and Coolers. Bedfordshire: Intercept Ltd, 1994. 550 s. ISBN 9781898298090.
67. MONOŠÍK Rastislav et al. Monitoring of monosaccharides, oligosaccharides, ethanol and glycerol during wort fermentation by biosensors, HPLC and spectrophotometry, *Food Chemistry*, 2013, roč. 138, č. 1, s. 220-226.
68. NAYDENOVA, Vessla. et al. Modeling of Alcohol Fermentation in Brewing – carbonyl compounds synthesis and reduction, *Technology of wine and brewing*, [online]. Bulgaria [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/7c0d/609fb4b79b36915d73319d211046982632c5.pdf>
69. NOVÁK, Jan et al. Změny vlastností kvasinek v pivovarském procesu a rychlé metody jejich sledování, *Kvasný průmysl*, 2006, roč. 52, č. 1, s. 3-6.
70. NOVÁK, Jan., G. BASAŘOVÁ a J. FIALA. Rychlost zkvašování sacharidů mladiny a buněčný cyklus pivovarských kvasinek, *Kvasný průmysl*, 2004, r. 50, č. 5, s. 126-129.
71. NEDOVIĆ, Viktor et al. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes, *Yeast*, 2014, roč. 32, č. 1, s. 173-216.
72. NOGUEIRA L. C, et al. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography*, 2005, roč. 1065, č. 2, s. 207-210.
73. OHNUKI, Shinsuke et al. Dynamic changes in brewing yeast cells in culture revealed by statistical analyses of yeast morphological data, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, r. 117, č. 3, s. 278-284.
74. ÖZCAN, Sabire a Mark JOHNSTON. Function and Regulation of yeast Hexose Transporters, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, roč. 63, č. 3, s. 554-569.

75. PALMER, J., JOHN. *How To Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First*, Brewers Publications, Colorado: A Division of the Brewers Association, 2006. ISBN-13: 978-0937381-88-5.
76. PATEL, Girishchandra B., a Michael INGLEDEW. Trends in Wort Carbohydrate Utilization, *American Society for Microbiology*, 1973, roč. 26, č. 3, s 349-353.
77. PELIKÁN, Miloš a František DUDÁŠ. *Technologie kvasného průmyslu*. Brno: MZLU, 1996. ISBN 80-7157-240-3.
78. PIRES, J., Eduardo et al. High gravity primary continuous beer fermentation using flocculent yeast biomass, *Journal of The Institute of Brewing*, 2014, r. 120, č. 4, s. 486-494.
79. PIRES, J.. Eduardo et al. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, roč. 98, č. 5, s. 1937-1949.
80. PREEDY, Victor R. *Beer in health and disease prevention*. London: Elsevier Inc., 2009. s. 1101, ISBN 978-0-12373891-2.
81. PRIHA Outi. et al. Microbial populations on brewery filling hall surfaces - Progress towards functional coatings. *Food Control*, 2015, roč. 55, s. 1-11.
82. PROCOPIO, Sussane et al. Differential Transcribed Yeast Genes Involved In Flavour Formation And Its Associated Amino Acid Metabolism During Brewery Fermentation, *European Food Research And Technology*, 2014, roc. 239, č. 3, s. 421-439.
83. PROKEŠ, Josef. Technologický význam dusíkatých látek v ječmeni a sladu, *Kvasný průmysl*, 2000, roč. 46, č. 10, s. 277-279.
84. PROKEŠ, Josef. Hvozdění. In: *Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.* [online]. Praha: VÚPS, a.s. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: [http://www.beerresearch.cz/index.php?searchword=hvozd%C4%9Bn%C3%AD&ordering=newest&searchphrase=all&limit=20&option=com\\_search&lang=cs](http://www.beerresearch.cz/index.php?searchword=hvozd%C4%9Bn%C3%AD&ordering=newest&searchphrase=all&limit=20&option=com_search&lang=cs)

85. PROKEŠ, Josef. Druhy sladu. In. *Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.* [online]. Praha: VÚPS, a.s. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: [http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com\\_rubberdoc&view=category&id=123%3Apivovarska-kola-vyroba-sladu-a-piva&Itemid=159&lang=cs](http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com_rubberdoc&view=category&id=123%3Apivovarska-kola-vyroba-sladu-a-piva&Itemid=159&lang=cs)
86. ROP, Otakar a Jan HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*, Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009, ISBN 978-80-7318-748-4.
87. ROSYPAL, Stanislav a kolektiv. *Nový přehled biologie*, 1. vyd. Praha: Scienta, 2003, ISBN: 80-7183-268-5.
88. SARMA S., J., M. VERMA a S. K. BRAR. *Industrial Fermentation for Production of Alcoholic Beverages*, Fermentation Processes Engineering in the Food Industry, 2013, s. 299-322, ISBN: 978-1-4398-8765-3.
89. SIGLER, Karel a Dagmar MATOULKOVÁ. Pivovarské kvasinky a reakce na stres. *Kvasný průmysl*. 2011, roč. 57, s. 277–284, ISSN: 0023-5830.
90. SIGLER, Karel et al. Kvasinky a stres: z laboratorních podmínek do pivovaru. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, s. 100–104. ISSN: 0023-5830.
91. SHABANI, Laura a Ariola DEVOLLI. Growth model and metabolic activity of brewing yeast biofilm on the surface of spent grains: a biocatalyst for continuous beer fermentation, 2010, roč. 9, č. 3, s. 655-662.
92. Sladovna Bruntál, *Sladové výtažky*. [www.sladovnabruntal.cz](http://www.sladovnabruntal.cz) [online] Bruntál, 2017, [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.sladovnabruntal.cz/sladove-vytazky>
93. SCHNITZENBAUMER, Birgit et al. Implementation of commercial oat and sorghum flours in brewing, *European Food Research and Technology*, 2014, roč. 238, č. 3, s. 515-525.
94. STEINER, Elisabeth et al. Comparison of Beer quality attributes between beers brewed 100 % barley malt and 100 % barley raw material, *Science of Food and Agriculture*, 2011, roč. 92, č. 4, s. 803-813.
95. STEWART, G. Graham. Saccharomyces species in the Production of Beer, *Beverages*, 2016, roč. 2 (4), s. 34, ISSN. 10-3390.

96. SUZUKI, Koji. 125th anniversary review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of The Institute Brewing*, 2011, roč. 117, č. 2, s 131–155.
97. ŠEMÍK, P., M. SEKORA a Š. KOVANDA. Možnosti ovlivnění kvalitativních parametrů mladiny připravené rozdílným způsobem chmelovaru, *Kvasný průmysl*, 2003, roč. 49, č. 10, s 296-303.
98. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd., Praha, 2002, ISBN 80-200-1024-6.
99. ŠKACH, Josef a Martin SLABÝ. Vážíme si dostatečně kvasinek?, *Kvasný průmysl*, 2009, roč. 55, s. 2-8. ISSN: 0023-5830.
100. ŠROGL, Jiří et al. Faktory ovlivňující aktivitu invertasy během kvašení, dokvašování a v hotovém pivu, *Kvasný průmysl*, 2007, roč. 53, č. 5, s. 134-138.
101. TAKOI, Kiyoshi et al. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, roč. 58 (8), s. 5050-5058.
102. VANDERHAEGEN, Bart et al. Aging characteristics of different beer types. *Food chemistry*. 2007, roč.. 103, s. 404–412.
103. VAUGHAN Anne, Tadhg O’SULLIVAN a Douwe Van SINDEREN. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review, *Journal of The Institute of Brewing*, 2005, roč. 111, č. 4, s. 355-371.
104. VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 2. vyd., 2002, Tábor, ISBN 80-86659-01-1.
105. VRIESEKOOP, Frank et al. 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly, *Journal of The Institute of Brewing*, 2012, roč. 118, č. 4, s. 335-345.
106. VÚPS, *Produkty na výrobu piva*. <http://www.beerresearch.cz> [online]. Praha, 2017, [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: [http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=34&Itemid=93&lang=cs](http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=34&Itemid=93&lang=cs)

107. WALKER, M., Greame a Graham G. STEWART. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages, *Beverages*, 2016, roč. 2, č. 4, s. 30.
108. WALKER, Samantha L. Removal of Microbial Biofilms from Dispense Equipment: The Effect of Enzymatic Pre-digestion and Detergent Treatment, *Journal of The Institute of Brewing*, 2012, roč. 113, č. 1, s. 61-66.
109. TANIUCHI, Yoshimas et al. Analysis of the Components of Hard Resin in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Structural Elucidation of Their Transformation Products Formed during the Brewing Process, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, roč. 62, č. 47, s. 11602-11612.
110. ŽEMLIČKOVÁ, H., R. KOLÍNSKÁ a P. ŠPANĚLOVÁ. Česká národní sbírka typových kultur – historie a současnost, [www.szu.cz](http://www.szu.cz) [online]. Praha, 2006. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/cnctc/sbirka\\_historie\\_soucasnost.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/cnctc/sbirka_historie_soucasnost.pdf)



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

<b>CE</b>	Capillary electrophoresis / micelární elektrokinetická chromatografie
<b>CO<sub>2</sub></b>	Oxid uhličitý
<b>CNCTC</b>	Česká národní sbírka typových kultur
<b>CPM</b>	Colony forming unit / kolonie tvořící jednotka
<b>DBE</b>	Starch-debranching enzyme / enzymy rušící větvení
<b>DP</b>	Diastatic power / diastatická mohutnost
<b>DPE</b>	Diastatic power enzymes / diastatická mohutnost enzymů
<b>EBC</b>	European Brewery Convention
<b>EMP</b>	Embdenovo-Meyerhofovo-Parnasovo
<b>FAN</b>	Free Amino Nitrogen / volný aminodusík
<b>Fru</b>	Fruktóza
<b>GC</b>	Gas Chromatography / plynová chromatografie
<b>Glc</b>	Glukóza
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points / systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography / vysoce účinné kapalinové chromatografie
<b>HPLC-RI</b>	HPLC Refractive Index Detectors / HPLC s refraktometrickou detekcí
<b>HXT</b>	Hexose Transporter / Hexózový transportér
<b>IX</b>	Isoxanthohumol
<b>KTJ</b>	Kolonie tvořící jednotka
<b>LC</b>	Liquid Chromatography / kapalinová chromatografie
<b>LD</b>	Limit dextrin / Limitní dextrin
<b>Mal</b>	Maltóza

---

<b>MEKC</b>	Micellar electrokinetic chromatography / Micelární elektrokinetická chromatografie
<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily / superrodina přenašečů
<b>SBE</b>	Starch-branching enzyme / enzymy napomáhající větvení
<b>VÚPS</b>	Výzkumný ústav pivovarský a sladařský
<b>XN</b>	Xanthomol

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1: Schéma tvorby melanoidinů (převzato z Basařová, 2010).

Obr. č. 2: Schéma štěpení  $\beta$ -glukanů (převzato z Basařová, 2010).

Obr. č. 3: Vybrané sacharidy jako substráty pro *Saccharomyces cerevisiae* (převzato z Stewart, 2016).

Obr. č. 4: Schéma metodiky přípravy, kultivace a odběrů vzorků v diplomové práci.

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Příprava suspenze jednotlivých kmenů kvasinek

Příloha č. 2: Kultivační láhve (1000 ml) s mladinou (600 ml) a kvasnou zátkou.

Příloha č. 3: Koncentrace sacharidů z HPLC-RI při teplotu 25 °C

Příloha č. 4: Koncentrace sacharidů z HPLC-RI při teplotu 10 °C.

Příloha č. 1: Příprava suspenze jednotlivých kmenů kvasinek



Příloha č. 2: Kultivační láhve (1000 ml) s mladinou (600 ml) a kvasnou zátkou.





Příloha č. 4: Koncentrace sacharidů z HPLC-RI při teplotu 10 °C.

Teplota 10 °C		koncentrace (g/100 ml)					
Čas [h]	Kmen	Fru		Glc		Mal	
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0	S.c. S-04	0,55	0,02	1,98	0,13	7,52	0,61
	S.c. RIBM 96	0,48	0,01	1,77	0,00	7,14	0,33
	S.p. RIBM 146	0,48	0,01	1,74	0,04	6,96	0,08
	S.c. 34/70	0,45	0,01	1,60	0,02	6,30	0,31
24	S.c. S-04	0,45	0,05	1,51	0,13	6,53	0,48
	S.c. RIBM 96	0,42	0,01	1,52	0,02	6,48	0,13
	S.p. RIBM 146	0,48	0,02	1,85	0,11	7,64	0,66
	S.c. 34/70	0,50	0,00	1,70	0,04	7,16	0,11
48	S.c. S-04	0,52	0,06	1,63	0,11	7,46	0,42
	S.c. RIBM 96	0,43	0,01	1,46	0,06	7,15	0,59
	S.p. RIBM 146	0,46	0,04	1,82	0,13	7,41	0,53
	S.c. 34/70	0,43	0,05	1,55	0,06	6,66	0,62
72	S.c. S-04	0,44	0,04	1,52	0,19	7,94	0,35
	S.c. RIBM 96	0,43	0,02	1,35	0,05	8,39	0,23
	S.p. RIBM 146	0,46	0,03	1,74	0,16	9,21	0,72
	S.c. 34/70	0,40	0,04	1,41	0,12	8,34	0,17
96	S.c. S-04	0,46	0,07	1,61	0,25	8,79	0,37
	S.c. RIBM 96	0,34	0,02	0,78	0,12	5,57	0,07
	S.p. RIBM 146	0,43	0,04	1,14	0,08	5,42	0,14
	S.c. 34/70	0,38	0,02	1,02	0,19	5,43	0,12
168	S.c. S-04	0,48	0,05	1,18	0,22	5,35	0,92
	S.c. RIBM 96	0,24	0,04	0,33	0,08	4,48	0,46
	S.p. RIBM 146	0,43	0,03	1,22	0,11	5,77	0,26
	S.c. 34/70	0,28	0,07	0,57	0,06	5,26	0,64
192	S.c. S-04	0,41	0,01	0,89	0,07	5,89	0,50
	S.c. RIBM 96	0,10	0,03	0,00	0,00	4,50	0,27
	S.p. RIBM 146	0,44	0,04	0,97	0,08	6,08	0,32
	S.c. 34/70	0,25	0,05	0,28	0,07	6,11	0,04
216	S.c. S-04	0,39	0,04	0,88	0,07	5,66	0,52
	S.c. RIBM 96	0,18	0,07	0,15	0,06	4,83	0,86
	S.p. RIBM 146	0,37	0,06	0,86	0,11	5,67	0,61
	S.c. 34/70	0,00	0,00	0,00	0,00	4,10	0,74