



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM VLIVU STUDENÉHO CHMELENÍ NA STABILITU PIVNÍ PĚNY

EFFECT OF THE DRY HOPPING OF THE STABILITY OF BEER FOAM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. David Benda

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1690/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. David Benda**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium vlivu studeného chmelení na stabilitu pивní pěny

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je zhodnotit vliv studeného chmelení na stabilitu pивní pěny u piva plzeňského typu.

V rámci diplomové práce budou řešeny tyto dílčí činnosti:

1. Výroba modelového piva.
2. Selekcce a základní charakterizace chmelového materiálu.
3. Realizace chmelení za studena v různých dávkách a časech v období do ležáckých tanků.
4. Základní chemická charakterizace vyrobených vzorků z hlediska obsahu fenolických látek, hořkých kyselin a prvků.
5. Analýza stability pивní pěny pomocí zařízení NIBEM.
6. Vyhodnocení naměřených dat.
7. Definování závěrů práce.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.

Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. David Benda
student

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem studeného chmelení na stabilitu pивní pěny. Byl sledován vliv studeného chmelení na základní charakteristiky piva, obsah hořkých chmelových kyselin, proteinů, fenolických látek, vybraných mikro- a makroprvků, organických kyselin a stabilitu pивní pěny. V teoretické části jsou charakterizovány suroviny pro výrobu piva, látky ovlivňující stabilitu pивní pěny a postup přípravy piva. Dále je popsána pěna z fyzikálního hlediska, je popsán její vznik, odvodňování a jevy, které vedou k jejímu zániku. Blíže jsou popsány i použité analytické metody. Experimentální část popisuje postup přípravy modelového piva a realizaci studeného chmelení českou odrůdou Kazbek. Studené chmelení bylo provedeno v časech 3, 5 a 10 dní s navážkami 3 g/l a 6 g/l. Připravené pivo bylo následně analyzováno z hlediska základních pивních charakteristik, stability pивní pěny, hořkých chmelových kyselin, fenolických látek, proteinů, vybraných mikro- a makroprvků a organických kyselin. Z naměřených dat byly zjištěny korelace mezi sledovanými parametry piva a stabilitou pивní pěny. Bylo zjištěno, že studené chmelení v pivu zvyšuje obsah fenolických a hořkých látek, jeho vliv na stabilitu pивní pěny je ale negativní.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the influence of dry hopping on the stability of the beer foam. It was observed how this effect affected general characteristics of beer, the content of hop bitter acids, proteins, phenolic compounds, selected micro- and macro elements, organic acids and the stability of the beer foam. Theoretical part characterises raw materials for beer production, the substances affecting the stability of beer foam and the beer brewing process. Furthermore the beer foam is described from a physical point of view together with the steps of its formation and drainage as well as other phenomena that lead to its disappearance. A detailed description of used analytical methods is included. The experimental part illustrates the preparation of the model beer and the implementation of dry hopping with the Czech hop variety called Kazbek. Dry hopping was carried out on day 3, day 5 and day 10 with a 3 g/l and a 6 g/l hop dose. The prepared beer was subsequently analysed for general characteristics, the beer foam stability, bitter hop acids, phenolic compounds, protein, selected micro- and macroelements and organic acids. Based on the measured data, there were found correlations between the observed beer parameter and the stability of the beer foam. The results revealed that dry hopping in beer increases the content of the phenolic compounds and bitter substances, but its effect on the beer foam stability is negative.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pivo, stabilita pивní pěny, chmel, studené chmelení, iso- α -kyseliny, proteiny, fenolické látky, ICP-OES, IC, UV-VIS, NIBEM

KEY WORDS

Beer, beer foam stability, hop, dry hopping, iso- α -acids, proteins, phenolic compounds, ICP-OES, IC, UV-VIS, NIBEM

CITACE

BENDA, David. *Studium vlivu studeného chmelení na stabilitu pивní pěny*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139174>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jaromír Pořízka.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za odborné rady a pomoc při zpracování výsledků. Děkuji Ing. Lence Punčochářové za odborné rady, pomoc při měření, konzultace, ochotu a trpělivost. Moje poděkování patří také Pivovaru Zubr, a.s. za umožnění měřit na jejich přístrojích. V neposlední řadě děkuji rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Suroviny pro výrobu piva.....	8
2.1.1	Slad	8
2.1.2	Chemické složení sladu	8
2.1.3	Parametry jakosti sladu.....	10
2.1.4	Druhy sladů	11
2.1.5	Složky sladu ovlivňující stabilitu pивní pěny	11
2.1.6	Voda.....	13
2.1.7	Pivovarské kvasinky	15
2.1.8	Metabolismus kvasinek	16
2.1.9	Senzoricky aktivní látky vznikající během fermentace	17
2.1.10	Chmel.....	18
2.1.11	Složky chmelu ovlivňující stabilitu pивní pěny.....	22
2.2	Technologie výroby piva.....	23
2.2.1	Šrotování sladu.....	23
2.2.2	Vystírání.....	23
2.2.3	Rmutování.....	23
2.2.4	Scezování	24
2.2.5	Chmelovar.....	25
2.2.6	Kvašení mladiny a dokvašování piva	25
2.2.7	Studené chmelení	27
2.3	Fyzikální vlastnosti pěny.....	30
2.3.1	Vznik pěny	31
2.3.2	Nukleární aktivita.....	31
2.3.3	Vysychání pěny	32
2.3.4	Koalescence	32
2.3.5	Disproporcionace.....	33
2.3.6	Stabilita pěny.....	34
2.3.7	Interakce v pивní pění.....	34
2.4	Metody pro analýzu parametrů piva	38
2.4.1	NIBEM	38
2.4.2	Iontová chromatografie.....	38
2.4.3	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	39
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1	Laboratorní pomůcky a vybavení	41
3.1.1	Seznam chemikálií	41
3.1.2	Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů	43
3.2	Technologie výroby piva.....	44
3.2.1	Rmutování.....	44
3.2.2	Chmelovar.....	44
3.2.3	Kvašení a zrání	44
3.2.4	Studené chmelení	44
3.3	Specifikace vzorků.....	46
3.4	Použité analytické metody	46
3.4.1	Stanovení stability pивní pěny metodou NIBEM.....	46
3.4.2	Stanovení hořkosti piva	46

3.4.3	Stanovení obsahu bílkovin Hartree-Lowryho metodou.....	46
3.4.4	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	47
3.4.5	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	47
3.4.6	Stanovení pH a barvy piva.....	47
3.4.7	Analýza prvkového složení pomocí ICP-OES.....	47
3.4.8	Stanovení organických kyselin pomocí iontové chromatografie	48
3.4.9	Stanovení základních pivních charakteristik	49
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	50
4.1	Vliv studeného chmelení na základní charakteristiky piva.....	50
4.2	Vliv studeného chmelení na barvu piva	51
4.3	Vliv studeného chmelení na pH piva	51
4.4	Vliv studeného chmelení na IBU piva	52
4.5	Vliv studeného chmelení na obsah proteinů v pivu.....	54
4.6	Vliv studeného chmelení na obsah fenolických látek.....	55
4.7	Vliv studeného chmelení na prvkové složení piva	57
4.8	Vliv studeného chmelení na obsah organických kyselin v pivu.....	58
4.9	Stanovení stability pivní pěny	59
4.9.1	Vliv hořkosti na stabilitu studeně chmelených piv	61
4.9.2	Vliv fenolických látek na stabilitu pivní pěny	62
4.9.3	Vliv bílkovin na stabilitu pivní pěny	62
4.9.4	Vliv prvkového složení na stabilitu pivní pěny.....	63
4.9.5	Vliv pH a organických kyselin na stabilitu pivní pěny	63
4.9.6	Vliv ethanolu na stabilitu pivní pěny.....	63
5	ZÁVĚR	65
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	73

1 ÚVOD

Nejen v České republice, ale i v zahraničí patří pivo k jednomu z nejvíce populárních alkoholických nápojů. Pro český trh jsou typická především spodně kvašená piva ležáckého typu, která se vyznačují bohatou a krémovou pěnou. Pro řadu konzumentů je právě pивní pěna jedním z prvních kvalitativních znaků, a proto by měla být stabilní, bohatá, měla by mít správnou barvu a měla by kroužkovat po stěnách sklenice.

Pивní pěna je disperzí plynu v kapalině, jejíž stabilita je ovlivněna řadou faktorů. Stabilitu pивní pěny podporují především určité bílkoviny, hořké chmelové kyseliny, některé polysacharidy a kationty některých kovů. Pивní pěna je negativně ovlivněna lipidy, bazickými aminokyselinami a některými organickými kyselinami.

Metod pro zhodnocení kvality pивní pěny existuje celá řada. Pивní pěna může být posuzována podle kroužkování a ulpívání na skle. Její stabilita může být měřena metodou NIBEM, metodou dle Rudina nebo Rosse a Clarka, případně i třepáním.

Studené chmelení je poměrně moderní technika přípravy piva, která postupně získává na popularitě. Jedná se o možnost, kterou lze pivu udělit zajímavé chuťové vlastnosti a upravit jeho senzorický profil tak, aby co nejvíce odpovídal zvolenému chmelovému materiálu. Jedná se ale také o techniku, které je u spodně kvašených piv poměrně neobvyklá a u které doposud není dostatečně prostudovaný vliv na stabilitu pивní pěny, která je právě pro typicky česká piva jedním ze stěžejních parametrů.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv má studené chmelení na stabilitu pивní pěny. Pro tyto účely bylo připraveno spodně kvašené pivo, u kterého bylo následně provedeno studené chmelení ve druhé fázi kvašení v různých časech s různými navážkami chmelového materiálu. U připraveného piva byla sledována stabilita pивní pěny metodou NIBEM, byl sledován vliv studeného chmelení na základní pивní charakteristiky, obsah hořkých a fenolických látek, ale i na obsah proteinů, vybraných organických kyselin a prvků. Pro zpracování dat a zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita statistická analýza dat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Suroviny pro výrobu piva

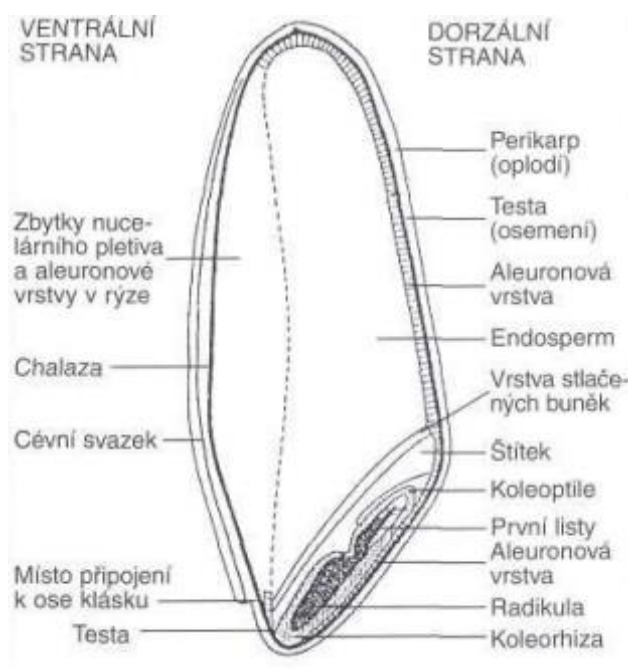
Základními surovinami pro výrobu piva jsou obilné slady, voda, chmel a výrobky z něj a pivovarské kvasinky. Jednotlivé suroviny budou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

2.1.1 Slad

První ze čtyř základních surovin pro výrobu piva je slad. Sladem se rozumí specificky naklíčená a sušená obilovina. Nejčastěji se jedná o slad ječmene dvouřadého (lat. *Hordeum distichum*) [1].

Obilku ječmene tvoří tři části – obal, zárodek a endosperm. Obal je tvořen oplodím a osemením, hřbetní část chrání plucha, břišní část je chráněna pluškou. Největší část obilky zaujímá endosperm, jehož svrchní vrstva, tzv. aleuronová, je složena z hranolových buněk uspořádaných v řadách. Obsah těchto buněk je tvořen bílkovinami, tukem a škrobovými zrny. Aleuronová vrstva je při vhodných podmínkách aktivována regulátory růstu [2].

Vlhkost u světlých sladů je asi 3,5 %, u tmavých sladů přibližně 2 %. Vyšší vlhkost může být příčinou nižší extraktivnosti sladu, případně může negativně ovlivňovat skladování. Celková vlhkost sladu by neměla přesáhnout 6 % [1].



Obrázek 1: Řez obilkou ječmene [2]

2.1.2 Chemické složení sladu

Nejvíce zastoupenou složkou ječmene jsou sacharidy, které tvoří až 80 % hmotnosti zrna. Majoritním sacharidem v endospermu ječmene je škrob, který se zde nachází v rozmezí 60–65 %. Škrob je zde uložen ve formě nerozpustných granulí a slouží jako rezervní polysacharid a zásoba živin pro klíčení zrna. Skládá se ze dvou polymerních jednotek – amylozy a amylopektinu. Amylóza je polysacharid s nízkým stupněm větvení tvořený glukózovými jednotkami spojenými α -1,4-glykosidovými vazbami. Amylopektin je tvořen glukózovými jednotkami, které se vážou α -1,4 a α -1,6-glykosidovými vazbami, přičemž k větvení dochází

každých sedm až osm jednotek. Základní uspořádání amylopektinu je větvené. Amylóza je méně zastoupenou složkou škrobu, tvoří asi 20–25 %, amylopektin tvoří asi 75–80 % [1, 2, 3].

Neškrobové polysacharidy tvoří přibližně 10–14 % ječného zrna. Patří mezi ně celulózy, hemicelulózy a gumovité látky, lignin a pentozany. Obsah celulózy se v ječném zrna pohybuje v rozmezí 4–7 %, a to především v obalových vrstvách. Nerozpustné hemicelulózy a gumovité látky, tj. neškrobové a necelulóзовé polysacharidy typu β -glukanů, tvoří průměrně 10 % hmotnosti zrna. Vysoký obsah β -glukanů je v pivovarství považován za nežádoucí, jelikož může docházet k zvýšení viskozity roztoků, což negativně ovlivňuje filtraci piva a stabilitu piva při skladování, tj. tvorbu zákalů [1, 2, 3].

Ječmen obsahuje 0,85–4,8 % lipidů v sušině, kdežto slad dosahuje průměrně 3,4 % lipidů v sušině. Rozdíl v obsahu lipidů u ječmene a sladu je způsoben klíčením, při kterém dochází až k 30% poklesu zejména v důsledku hydrolýzy. Asi 70 % lipidů se v ječmeni i sladu nachází ve formě triglyceridů, přibližně 8 % jsou volné mastné kyseliny [4]. Lipidy jsou zastoupeny nejvíce v pluchách a aleuronové vrstvě. Mezi nejvíce zastoupené mastné kyseliny v ječmeni a sladu patří kyseliny linolová (okolo 50–60 %), linolelaidová, linolenová, palmitová, olejová a stearová [1, 4, 5]. V ječmeni a sladu se kromě volných tuků nachází i lipidy vázané na sacharidy či bílkoviny, tzv. lipoidy. Mezi lipoidy řadíme fytosteriny, fosfatidy a estery fosfolipidů s cukernatými sloučeninami [2]. Lipidy mají v pivovarnictví pozitivní vliv na metabolismus kvasinek a jsou spojeny s eliminací senzorycky aktivních esterů [1].

Další skupinou látek, jež se nachází ve sladu, jsou dusíkaté látky. Dusíkaté látky sladu tvoří komplex sloučenin od jednoduchých aminokyselin po vysokomolekulární složky včetně proteinů. Bílkoviny se podle molekulové hmotnosti dělí do dvou frakcí – HMW (High Molecular Weight), do kterých spadají bílkoviny o hmotnosti v rozmezí 35–50 kDa a LMW (Low Molecular Weight), což jsou bílkoviny o 5–15 kDa. Molekulovou hmotnost vyšší než 50 kDa vykazuje jen malá skupina bílkovin [6]. Nízkomolekulární dusíkaté látky ovlivňují metabolismus kvasinek, ale slouží i jako prekurzory pro tvorbu aldehydů, které způsobují tzv. starou chuť piva. Vysokomolekulární dusíkaté látky společně s polyfenoly mohou způsobovat nebiologické zákal. Bílkoviny ovlivňují plnost chuti piva, mají vliv na jeho barvu a stabilitu pивní pěny [1]. Obsah bílkovin v ječmeni se pohybuje v rozmezí 8–16 %, za optimální hodnotu je různými autory považováno 10,0–11,5 % nebo 10,5–11,7 % [2, 7]. Množství bílkovin menší než 7,5 % je nepříznivé, více než 13% zastoupení bílkovin je abnormálně mnoho. Ječmeny s nižším než 10% obsahem bílkovin nejsou sladařsky vhodné, jelikož jsou enzymaticky méně aktivní a je složité u nich dosáhnout požadovaných hodnot relativního extraktu. Pivo vyrobené ze sladu s nízkým obsahem bílkovin bude méně pěnivé, stabilita pěny bude nízká a pivo se bude vyznačovat slabým tělem. Obsah dusíkatých látek je dán především agroekologickými podmínkami [7]. Lepkové bílkoviny jsou obsaženy v aleuronové vrstvě, vnější strana endospermu je tvořena rezervními bílkoviny, v membránách endospermu se nacházejí bílkoviny histologické. Dusíkaté látky v ječmeni a sladu jsou děleny do dvou skupin. První skupina je tvořena dusíkatými látkami typu bílkovin a jejich štěpnými produkty (aminokyseliny, peptidy a proteiny), druhou skupinu tvoří dusíkaté látky, které nemají bílkovinnou povahu (některé z dusíkatých bází, amonné soli) [2]. Proteiny jsou na základě rozpustnosti děleny na čtyři skupiny – albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny, jejichž procentuální zastoupení se v odborné literatuře poměrně liší [1, 2, 7]. Albuminy tvoří 4–12 % bílkovinné složky ječmene. Jsou to vysokomolekulární bílkoviny o $M_r = 70\,000$, jsou rozpustné ve vodě a ve zředěných solných roztocích. Globuliny jsou z celkového obsahu bílkovin zastoupeny 8,4–18,0 %. Stejně jako albuminy jsou i globuliny rozpustné v roztocích elektrolytů. Globuliny lze podle molekulové hmotnosti

rozdělit na α -globuliny ($M_r = 26\,000$), β -globuliny (M_r přibližně $100\,000$), γ -globuliny ($M_r = 166\,000$) a δ -globuliny ($M_r = 300\,000$). Největší technologický význam mají v pivovarství β -globuliny, které způsobují nebiologické chladové zákaly piva. Další frakcí bílkovin jsou prolaminy, které tvoří 25–37 %, dle některých autorů až 50 % proteinové složky v závislosti na obsahu přijatelného dusíku v půdě. Tvoří hlavní zásobní bílkovinu a z aminokyselinového složení jsou bohaté především na prolin a glutamin. Prolaminy jsou ve vodě a roztocích solí nerozpustné, rozpouští se v 50–90 % ethanolu. Jejich relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 55 000–77 000 [1, 2, 3, 7]. Nejvíce zastoupenou bílkovinou v ječmeni je prolamin hordein, který tvoří 40–50 % všech ječných proteinů. Podle různých autorů jsou hordeiny rozděleny do několika skupin na základě jejich elektroforetických mobilit a aminokyselinového složení. Někteří autoři rozdělují hordeiny podle jejich elektroforetických mobilit na 4 skupiny – B, C, D a γ [8]. Zatímco Fox (2009) rozděluje hordeiny na D, C, B a A skupinu a tvrdí, že hordeiny ze skupiny A jsou možné trypsin-amylázové inhibitory [3], Gupta et al. (2010) na základě elektroforetických mobilit a aminokyselinového složení rozeznává 5 skupin hordeinů – B, C, D, Z a γ . B-hordeiny tvoří 70–80 % hordeinové frakce, C-hordeiny 10–20 %, D-, Z- a γ -hordeiny tvoří nanejvýš 5 % celkového obsahu hordeinů [9, 10]. Hordeiny skupiny B a γ jsou bohaté na síru, skupina C obsahuje jen málo sirných komponent [9, 11]. Gluteliny jsou rozpustné v alkalických roztocích, tvoří 30–55 % bílkovin. Jejich relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 40 000–95 000 [1, 2, 7]. Další skupinu bílkovinných látek tvoří konjugované bílkoviny – proteidy. Mezi proteidy patří fosfoproteiny, glykoproteiny, lipoproteiny, chromoproteiny a nukleoproteiny [2].

Zastoupení enzymů se v různých částech obilky liší. Aleuronová vrstva obsahuje především hydrolázy (endo- a exopeptidázy), transferázy a oxidoreduktázy, v subaleuronové vrstvě a endospermu se nachází převážně β -amyláza. V zárodku a štítku se vyskytuje velké množství enzymů, především transferázy a oxidoreduktázy, které mají významnou roli při dozrávání, klíčení a sladování ječmene. Ve sladovnictví a pivovarství mají nejdůležitější úlohu amylolytické enzymy – α -amyláza a β -amyláza, které štěpí škrob na jednodušší cukry [2].

Z hlediska vitaminů je sladovnický ječmen bohatý především na vitaminy skupiny B. Vitamin B1 (thiamin) je v ječmeni obsažen v množství 0,12–0,74 mg/100 g sušiny, vitaminu B2 (riboflavinu) obsahuje sladovnický ječmen přibližně 0,10–0,37 mg/100 g sušiny. Vitaminu B3 (kyseliny nikotinové) obsahuje ječmen více, přibližně 8,0–15,0 mg/100 g sušiny. Sladovnický ječmen dále obsahuje vitamin B6, vitamin C, vitamin H (biotin), kyselinu listovou a vitamin E (ve formě α -, β -, γ -, δ -tokoferolů). Vitaminy C a E působí ve sladu a následně i pivu jako antioxidační činidla udržující organoleptickou stabilitu piva [2].

2.1.3 Parametry jakosti sladu

Kvalitativní znaky ječmene jsou výrazně ovlivněny lokalitou pěstování, ročníkem, ale i úrovní hnojení a odrůdou. Jelikož na kvalitě ječného zrna a následně i sladu závisí kvalita piva, která by měla být ze spotřebitelského hlediska v průběhu času stabilní, určují se tzv. ukazatele sladovnické jakosti. Prvním z ukazatelů jakosti je obsah dusíkatých látek, ten by se měl pohybovat v rozmezí 10,2–11,0 %. Výrazně vyšší, ale i nižší obsah dusíkatých látek, vede k nutným úpravám technologie sladování. Dalším ukazatelem jakosti sladu je extrakt v sušině, který vyjadřuje, kolik procent extraktivních látek je schopno se uvolnit do sladiny kongresním rmutovacím postupem. Optimální hodnota extraktu v sušině sladu je 82 %. Relativní extrakt při 45 °C je poměrem extraktu při teplotě 45 °C a extraktu při kongresním rmutování. Optimální hodnoty extraktu při 45 °C jsou dle různých autorů 37–41 %, resp. 40–48 %. Dosažitelný stupeň prokvašení informuje o obsahu zkvasitelných látek, jeho optimální hodnota se pohybuje v rozmezí 79–82 %. Kolbachovo číslo udává stupeň rozluštění dusíkatých látek, tj. poměr dusíkatých rozpustných látek a celkového počtu dusíkatých látek.

Optimální hodnoty Kolbachova čísla jsou v rozmezí 42–48 %. Dalším parametrem určujícím kvalitu sladovnického ječmene je diastatická mohutnost, která podává informaci o aktivitě enzymů, a to především β -amyláz. Diastatická mohutnost je udávána v jednotkách Windische-Kolbacha, optimální rozmezí je 220–300. Friabilita udává křehkost sladu při protlačení sítem. Sítem friabilimetru by mělo projít minimálně 75 %, optimálně pak 85 % moučnatého podílu sladu. Posledním z ukazatelů jakosti ječmene je obsah β -glukanů ve sladince. β -glukany jsou neškrobové polysacharidy uložené v buněčných stěnách endospermu. Jejich obsah by měl být maximálně 150 g/l. Při jejich nedostatečném rozštěpení, tj. obsahu nad 200 g/l, může dojít ke zvýšení viskozity piva, což může vést ke snížené efektivitě při filtrování, scezování piva nebo ke snížení varního výtěžku [2, 12].

2.1.4 Druhy sladů

Pro světlá piva typu ležák je využíván především světlý plzeňský slad, jehož znakem je nízká hodnota barvy kongresní sladiny. Plzeňské světlé slady musí být dostatečně amylolyticky aktivní, aby došlo k dokonalému zcukření rmutů při vaření piva. Pro tmavá piva jsou využívány tmavé slady mnichovského typu, které jsou typické vysokou hodnotou barvy kongresní sladiny, vyšším obsahem bílkovin, nižší extraktivností a nižší enzymatickou aktivitou. Vzhledem k vyšší teplotě při hvozdění a dotahování sladu obsahují slady mnichovského typu více produktů Maillardovy reakce. Přechodem mezi slady tmavého a světlého typu je slad vídeňský, který je používán především k úpravě barvy světlých piv. Pro výrobu speciálních piv či k úpravě vlastností běžného sladu jsou využívány speciální slady, které se liší barvou, enzymovou aktivitou, ale i kyselostí. Mezi speciální slady patří např. slad barvicí, diastatický, nakuřovaný nebo karamelový [1].



Obrázek 2: Druhy sladů podle barvy (zleva plzeňský, karamelový, barvicí)

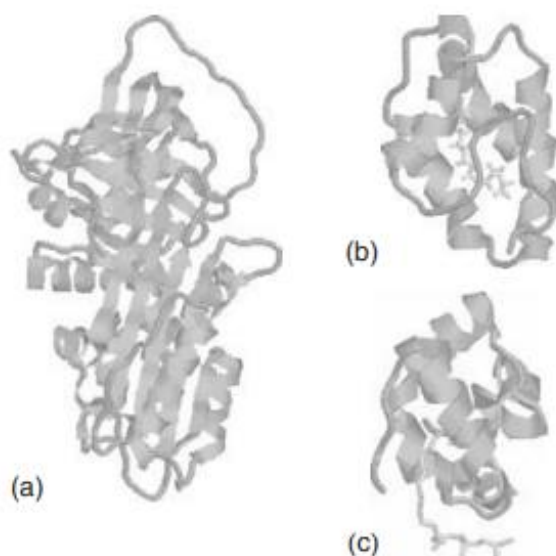
2.1.5 Složky sladu ovlivňující stabilitu pивní pěny

První sladovou bílkovinou, která byla spojena s ovlivněním stability pивní pěny, byl albuminový protein Z (viz obr. 3 (a)). Jedná se o ječný serpin, jehož molekulová velikost je přibližně 40 kDa, spadá tudíž do frakce HMW proteinů. V ječném zrně je přítomen ve třech formách – volné, vázané a skryté. Během klíčení je určitý podíl vázané a skryté formy převedena na formu volnou, která je lépe extrahovatelná do sladiny během rmutování. Protein Z je tvořen dvěma izoformami – Z4 a Z7, které jsou částečně homologní. Forma Z4 je

dominantní a představuje přibližně 80 % proteinu. Odhaduje se, že protein Z reprezentuje 10–25 % všech nedialyzovatelných proteinů v pivu. Ze všech bílkovin obsažených v pivu vykazuje protein Z nejvyšší povrchovou viskozitu a elasticitu. I přes schopnost stabilizace pивní pěny nebyl prokázán vyšší výskyt tohoto proteinu v pивní pěně než v samotném pivu. Stabilizační účinky jsou znásobeny pomocí interakcí s ostatními proteiny. Stabilizace pивní pěny pomocí proteinu Z také závisí na charakteru sladu – vliv na pěnivost piva je menší u sladů s nízkým Kolbachovým indexem, u sladů s vyšším Kolbachovým indexem je vliv větší [6, 8].

Na zvýšení stability pивní pěny se podílí i bílkoviny, které jsou schopny vázat lipidy a inhibovat tak jejich destabilizační vliv. Jedná se o proteiny s molekulovou hmotností přibližně 13 kDa, které jsou vázány na buněčných membránách. Jedny z těchto málo známých proteinů jsou ječné hordeindoliny a pšeničné puroindoliny, které vykazují poměrně vysokou hydrofobicitu, jež by mohla souviset s pozitivním působením na stabilitu pивní pěny. Většina z těchto proteinů během rmutování podléhá aktivitě proteolytických enzymů, do výsledného piva se dostávají pouze jako nízkomolekulární štěpné produkty a stabilitu pивní pěny ovlivňují zanedbatelně [6, 8].

K proteinům schopným vázat lipidy se řadí i tzv. přenašeče lipidů – proteiny LTP1 a LTP2 (viz obr. 3 (b, c)). Jedná se o hydrofobní bílkoviny LMW frakce s molekulovou velikostí asi 9,7 kDa nacházející se v aleuronové vrstvě ječného zrna. Tvoří až 1 % celkových proteinů sladu. Protein LTP1 je schopen inhibovat sladové cysteinové endoproteázy. Se stabilitou pивní pěny je spojován spíše protein LTP1, který se koncentruje v pивní pěně, protein LTP2 doposud nebyl v pivu nalezen ve významných koncentracích. Během varu je LTP1 ireverzibilně denaturován, čímž dochází k tvorbě jeho modifikovaných forem o stejné sekvenci aminokyselin, ale s převážně lepším vlivem na stabilitu pивní pěny. Modifikované formy LTP1 se liší strukturou a molekulovou hmotností, která se pohybuje v rozsahu 9,6–9,9 kDa [8]. LTP1 dle některých autorů souvisí spíše s množstvím vygenerované pěny než přímo s její stabilitou, ve spojení s HMW frakcí proteinů či s izolovanou frakcí hordein-glutelinovou vykazuje dobré schopnosti pěnu generovat i stabilizovat [6, 8]. Dle některých autorů může naopak zvýšená úroveň denaturace proteinu LTP1 varem snížit jeho schopnost vázat lipidy, a tím omezit i jeho schopnosti ovlivnit stabilitu pивní pěny [13].



Obrázek 3: (a) Struktura proteinu Z, (b) LTP1, (c) LTP2 [14]

Hordeiny tvoří několik skupin rozdílných proteinů, které mohou odlišně interagovat s proteázami, proto je obtížné určit jejich přesnou úlohu při stabilizaci pивní pěny. Jedním z hordeinů, který by potenciálně mohl podporovat stabilitu pивní pěny, je bílkovinný fragment o velikosti 23 kDa, který vykazuje dobré povrchově aktivní vlastnosti a jeho koncentrace je 2,7 krát vyšší v pивní pěně než v pivu. Částečně homologní k němu je protein o velikosti 17 kDa ϵ -1-hordein, který je velmi bohatý na glutamin a stejně jako předchozí fragment vysoce koncentrovaný v pивní pěně. Někteří autoři uvádí, že tento protein v kombinaci s LTP1 signifikantně koreluje se stabilitou pивní pěny u méně nasycených piv [8].

Mimo jiné jsou ve sladu obsaženy i látky nebiłkovinné povahy, které jsou schopny kladně ovlivnit stabilitu pивní pěny. Těmito látkami jsou vysokomolekulární neškrobové polysacharidy, například β -glukan a arabinoxylan, různé pentozany a melanoidiny. Efekt zvýšení stability pивní pěny pomocí těchto látek ale souvisí s vyšší viskozitou piva, která je kladně spjata s redukcí rychlosti vysychání pивní pěny. Některé z těchto sacharidů jsou taktéž schopny tvorby křížových vazeb s proteiny [8].

Složky ječmene, které ovlivňují stabilitu pивní pěny negativně, jsou lipidy, které urychlují proces koalescence. Obecně platí, že méně negativní vliv vykazují mastné kyseliny s délkou řetězce C6–C10, se zvyšující se délkou řetězce dochází k větší destabilizaci pивní pěny. Taktéž platí, že stabilita pивní pěny je více negativně ovlivněna nasycenými mastnými kyselinami než nenasyčenými mastnými kyselinami [8, 13].

2.1.6 Voda

Voda tvoří více než 90 % piva. Její kvalita a složení tedy velkou mírou ovlivňuje výslednou kvalitu piva. Voda používaná v pivovarství musí odpovídat standardům pitné vody (Vyhláška 70/2018 Sb.), musí být čistá a prostá bakterií a nebezpečných látek [1, 15, 18].

Voda používaná v pivovarnictví se dělí do tří kategorií. Varní voda je základní surovinou pro vaření piva, musí vyhovovat parametrům pro pitnou vodu, musí být zdravotně a hygienicky nezávadná. V případě, že pivovar využívá technologii vaření piva z vysoce koncentrovaných mladin, slouží taktéž jako voda na ředění. Servisní voda je využívána k mytí a sterilaci, např. u CIP (clean in place) stanic. Provozní voda je určena pro jednotlivá zařízení v pivovaru, využívá se ke chlazení, pro přípravu mycích roztoků, pasteraci a pro parní generátory [1, 19].

Podle zdroje se vody dělí na spodní a povrchové. Spodní vody mají původ ve studních, pramenech a vrtech, povrchová pochází z řek, jezer a přehrad. Povrchová voda je obvykle více náchylná k sezónním výkyvům, obsahuje vyšší koncentrace suspendovaných látek, anorganických, organických a mikrobiálních kontaminantů. Kvalita spodní vody je sezónními výkyvy ovlivněna méně a její mikrobiologická kvalita obvykle bývá dobrá. Chemické složení spodní vody záleží na lokalitě [1, 18].

Nejdůležitějšími kationty v přírodních vodách jsou sodné, draselné, amonné, vápenaté, hořečnaté, manganaté, hlinité, železnaté a železité. Z aniontů především chloridy, uhličitany, hydrogenuhličitany, sírany, dusitany a dusičnany, fosforečnany a křemičitany. Největší podíl ve vodách tvoří soli vápníku a hořčíku [1].

Pro charakterizaci vody z hlediska obsahu vápenatých, barnatých a hořečnatých iontů byl využíván pojem tvrdost vody. Tvrdost vody může být karbonátová, dříve označovaná jako přechodná, která odpovídá obsahu hydrogenuhličitanů vápníku a hořčíku. Při chmelovaru je z kovových hydrogenuhličitanů odštěpen oxid uhličitý na více či méně rozpustné uhličitany. Nekarbonátová (nestálá) tvrdost vody je tvořena především hořečnatými a vápenatými solemi kyseliny chlorovodíkové, dusičné a sírové, jež se varem nemění [1].

Tabulka 1: Rozdělení vody podle její celkové tvrdosti [1]

Druh vody	mmol/l	Německý stupeň °D
Měkká voda	<1,3	<7
Středně tvrdá voda	1,3–3,5	7–14
Tvrdá voda	2,5–3,8	14–21,3
Velmi tvrdá voda	>3,8	>21,3

V pivovarství je rozlišováno několik druhů vod v závislosti na jejím složení. Plzeňská voda je vhodná pro spodně kvašená a silně chmelená piva, obsahuje pouze malé množství anorganických látek a z hlediska tvrdosti se jedná o měkkou vodu. Mnichovská voda obsahuje více uhličitánů a vápníku, ale relativně malé množství síranů a chloridů, jedná se o střední až tvrdou vodu. Dortmundská voda je podle chemického složení považována za velmi tvrdou vodu s převažující nekarbonátovou tvrdostí. Pro polotmavá piva je vhodná voda vídeňská, u které převažuje tvrdost karbonátová. Velmi tvrdá voda Burton on Trent je vhodná především pro piva typu Ale, která jsou svrchně kvašená a vysoce chmelená. Jedná se o vodu s vysokým obsahem síranů, který může být ovlivněn tzv. burtonizací, což je úprava obsahu síranů pomocí přidavku síranu vápenatého. Dále rozlišujeme vodu dublinskou a kodaňskou s vyšší karbonátovou tvrdostí [1, 18].

Během rmutování a chmelovaru je do mladiny extrahováno velké množství látek z použitých surovin, které interagují se složkami varní vody, varní voda tedy ovlivňuje všechny procesy během vaření piva [2].

Vápenaté ionty mají v pivovarství významnou úlohu v různých fázích výroby piva. Ve vodě se mohou vyskytovat v množství až 200 mg/l. Vápenaté ionty ovlivňují pH roztoku sladiny a mladiny, reagují s uhličitany a fosforečnany, které se uvolňují ze sladu. Vápenaté ionty jsou důležité také pro vysrážení oxalátů. Tato reakce probíhá i v hotovém pivu skladovaném za nízkých teplot. Vápník se šťavelany reaguje za vzniku málo rozpustného šťavelanu vápenatého, který je příčinou přepěňování piva (tzv. gushing). Vápník také zabraňuje předčasné inaktivaci amylolytických enzymů, čímž dopomáhá ke štěpení škrobu. Přidávky uhličitanu nebo chloridu vápenatého utlumují vyluhování barevných látek, polyfenolů a kyseliny křemičité ve fázi vyslazování a zároveň tlumí přibarvování rmutů, čímž je sníženo nadměrné přibarvování mladiny. Vápenaté ionty také kladně ovlivňují flokulaci kvasnic a koagulaci bílkovin [1, 2, 18].

Větší část hořečnatých iontů přechází do mladiny a piva ze sladu, z varní vody pochází jen asi třetina celkového množství. Funkce hořečnatých kationtů je podobná těm vápenatým – upravuje pH ve sladince a mladině. Jelikož jsou jeho soli více rozpustné, hodnotu pH ovlivňují méně. Hořčík je také kofaktorem a stimulantem některých enzymů účastnících se kvašení [1, 2].

Železnaté a železité ionty se v přírodních vodách vyskytují v poměrně malých koncentracích. Pokud je ve varní vodě železo ve vyšší koncentraci než 0,2 mg/l, dojde ke zhoršení kvality sladu, což se projeví jeho ztmavnutím a také dojde ke zpomalení zcukřování rmutů, které rovněž vede k přibarvování rmutů, mladiny a pивní pěny. Vyšší obsah železa je příčinou snížení plnosti chuti piva a ovlivňuje jeho hořkost. V malých množstvích vykazuje železo pozitivní vliv na syntézu enzymů dýchacího řetězce během fermentace mladiny kvasinkami. Vyšší koncentrace než 0,1 mg/l jsou příčinou degenerace kvasnic. Železnaté ionty se podílí na vzniku nebiologických zákalů. Velká část železnatých iontů je odstraněna společně s kaly a mlátem, ale jejich množství ve varní vodě je i tak nutno regulovat. Podobné negativní

účinky jako železnaté ionty vykazují i ionty měďnaté, které jsou navíc více toxické pro kvasinky [1, 2].

Sodné a draselné ionty se v přírodních vodách vyskytují převážně v množstvích, která nejsou škodlivá. Do piva se dostávají převážně ze sladu. Uhličitan a hydrogenuhličitan sodný mohou nepříznivě zvýšit pH rmutů a mladin. Sodík rovněž ovlivňuje transport draslíku v metabolismu kvasinek. Draslík je taktéž schopen inhibice sladových enzymů a je důležitým prvkem z hlediska kvašení [1, 2].

Manganaté a zinečnaté ionty mají velký význam při kvašení. Manganaté ionty působí jako kofaktory enzymů, jsou důležité pro množení a látkovou výměnu kvasinek. Ve vysokých koncentracích působí stejně negativně jako ionty železnaté. Zinečnaté ionty podporují růst kvasnic a kladně ovlivňují kvašení, při vysokých koncentracích jsou pro kvasničné buňky rovněž toxické, a navíc negativně ovlivňují fyzikálně-chemickou stabilitu piva [1].

Jako rezidua herbicidů se do piva mohou dostávat ionty hlinité, cínaté a olovnaté, které negativně ovlivňují jak životaschopnost kvasnic, tak fyzikálně-chemickou a senzoryckou stabilitu piva [1].

Anionty chloru kladně ovlivňují účinek amyláz. Rovněž jsou schopny inhibice flokulace kvasinek. V nižších koncentracích mohou zvýšit plnost chuti piva, v koncentracích nad 400 mg/l už jejich přítomnost způsobuje chuť drsnou a slanou [1].

Dusitanové ionty poukazují na mikrobiální kontaminaci a taktéž na rozklad bílkovin, jejich přítomnost ve varné vodě je nepříznivá, maximální přípustná koncentrace v pitné vodě je 0,1 mg/l. Koncentrace dusičnanů je ve spodních vodách ovlivněna především intenzivní zemědělskou činností. Jejich negativní účinky se projevují až po redukci na dusitany, které jsou pro pivovarské kvasinky toxické [1, 2].

2.1.7 Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou eukaryotní heterotrofní organismy z říše hub náležící do třídy *Ascomycetes*, které jsou od ostatních eukaryot odlišeny pevnou buněčnou stěnou. Jelikož nejsou v současné době kvasinky pivovarské odlišeny od kvasinek divokých, existuje více využívaných taxonomických variant [2, 20].

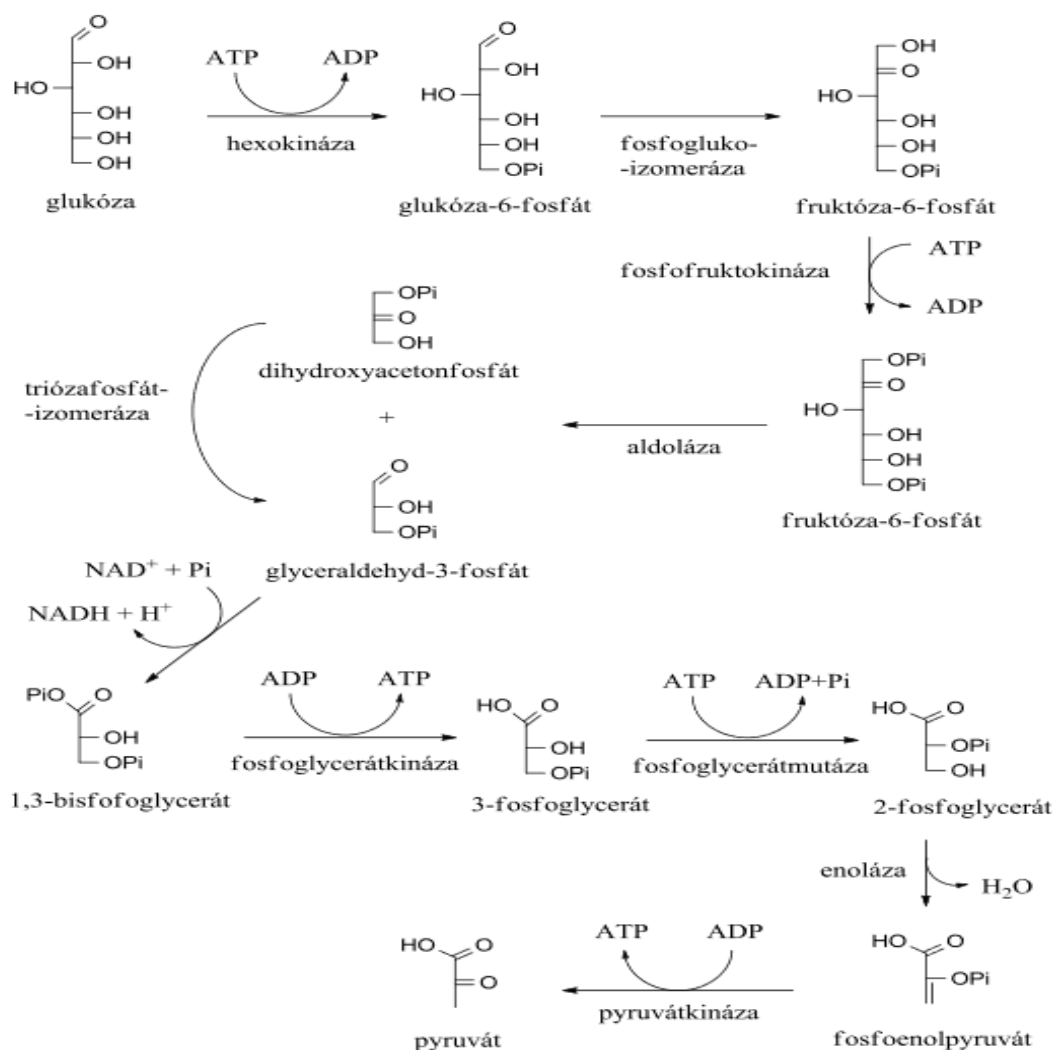
Velikost a tvar pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je dán především způsobem kultivace, ale i vnějšími podmínkami, např. složením živného média a povrchovým napětím. Základní tvar buňky je mírně eliptický až kulatý, přibližně 6–10 µm dlouhý a 5–8 µm široký [1, 20].

Chemické složení kvasničné buňky se kromě fyziologického stavu odvíjí od stáří kultury a kultivačních podmínek. Voda tvoří asi 65–80 % protoplasmy, asi tři čtvrtiny tvoří voda intracelulární, zbytek tvoří voda volná a hydratační. Sušina buněk je zpravidla tvořena z 45–60 % dusíkatých látek, 15–37 % cukrů, 6–12 % minerálních látek a 2–12 % lipidů [1]. Dle Briggse (2004) je sušina kvasničné buňky tvořena z 40–45 % proteiny, z 30–35 % cukry, lipidy tvoří přibližně 4–5 % [21]. Velkou část lipidů tvoří složené tuky, jako glyko- a fosfolipidy. Mezi sacharidy patří glukan, manan a v malém množství chitin, které jsou složkou buněčné stěny, a glykogen, který se nachází uvnitř buňky jako zásobní polysacharid [1, 20]. Historicky byla výroba piva z důvodu chlazení spojena především s kvasinkami svrchními. Svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou používány pro výrobu piva typu ale, porter a stout, pro která je typické teplotní rozmezí 18–22 °C. Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae carlbergensis* nebo *uvarum* jsou využívány pro výrobu piva typu ležák při optimální teplotě 7–15 °C. Spodní a svrchní pivovarské kvasinky se dále liší v tvorbě senzorycky aktivních látek a schopnosti zkvašovat rafinósu,

kteřou spodní pivovarské kvasinky zkvašují úplně – štěpí ji na fruktosu a melibiosu, svrchními kvasinkami je štěpena jen asi z jedné třetiny. Dalším rozdílem je složení buněčných stěn a sedimentace během kvašení. Spodní pivovarské kvasinky sedimentují na dno kvasných nádob, svrchní jsou nadnášeny vznikajícím CO₂ do kvasničné deky [1, 2, 21].

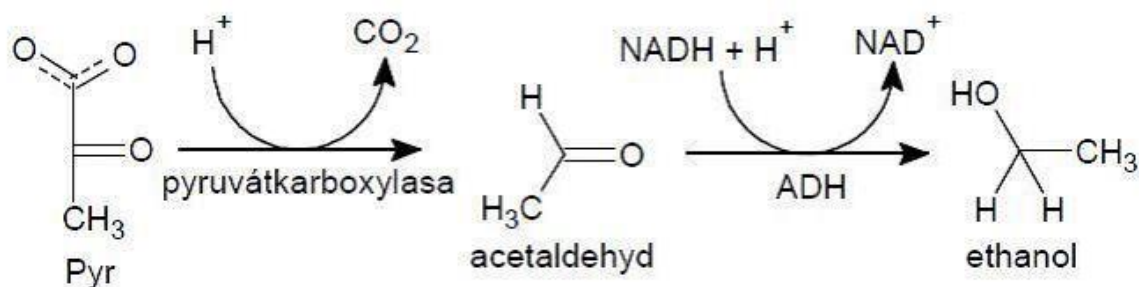
2.1.8 Metabolismus kvasinek

Jelikož jsou kvasinky rodu *Saccharomyces* fakultativně anaerobní, vyskytují se u nich dva způsoby využití cukrů v závislosti na přístupu kyslíku. Energeticky výhodnějším způsobem je aerobní dýchání (respirace), energeticky méně výhodným způsobem je alkoholové kvašení (fermentace). Regulačním mechanismem závislým na koncentraci glukózy je Crabtree efekt. Pokud je v médiu koncentrace glukózy vysoká, dochází k inhibici respirace i v případě, že je dostatek kyslíku. V aerobním prostředí se u kvasinek může vyskytovat tzv. Pasteurův efekt, který vede ke zpomalení glykolýzy, tzn. že pyruvát vznikající glykolýzou je spotřebován v Krebsově cyklu, čímž je potlačena fermentace. Na fermentující kvasinky působí Pasteurův efekt odlišně – v případě, že kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* roste v médiu s dostatkem glukózy a dusíku, fermentace není v exponenciální fázi inhibována. V exponenciální fázi využívá kvasinka *S. cerevisiae* aerobní respiraci v přibližně 3–20 %, a pokud dojde k vyčerpání zdroje dusíku a přechodu buněk do stacionární fáze, dochází ke zvýšení využití aerobního dýchání od 25–100 % a zároveň k potlačení fermentace [20, 22].



Obrázek 4: Schéma glykolýzy [23]

Hlavními metabolickými produkty kvasinek jsou ethanol a oxid uhličitý, které vznikají při katabolismu cukrů. Část pyruvátu, který vzniká v průběhu glykolýzy, je dekarboxylován enzymem pyruvátdekarboxylázou na acetaldehyd. Acetaldehyd je následně redukován na ethanol alkoholdehydrogenázou [21]. Elektrony uvolněné během tohoto procesu jsou přijímány ostatními organickými sloučeninami [22]. Pivovarské kvasinky jsou při vaření piva vystavovány ethanolu o koncentraci 3–6 %, v případě vaření piva metodou high gravity brewing (vaření piva o vyšší stupňovitosti) mohou být vystaveny až 10% koncentraci ethanolu [21]. Vystavení kvasinek nadměrnému množství ethanolu vede k negativním změnám metabolismu, inhibici buněčného růstu a případně i k buněčné smrti [21, 22].



Obrázek 5: Schéma ethanolového kvašení [17]

2.1.9 Senzoricky aktivní látky vznikající během fermentace

Během fermentace je kromě ethanolu a oxidu uhličitého produkováno kvasinkami množství dalších senzoricky aktivních látek. Patří mezi ně vyšší alifatické a aromatické alkoholy, karbonylové sloučeniny, organické kyseliny, estery, vicinální diketony, monoterpenoidy a sirné sloučeniny [1, 21].

Vyšší alkoholy vznikají jako vedlejší produkty syntézy a katabolismu aminokyselin. Největší podíl vyšších alkoholů v pivu tvoří 2-methylbutanol a 3-methylbutanol, dalšími významnými vyššími alkoholy v pivu jsou n-propanol, isoamylalkohol a isobutanol. Z heterocyklických alkoholů se v pivu vyskytují například tryptofol, 2-fenylethanol a tyrosol. Vyšší alkoholy se v pivu vyskytují v koncentracích 100–200 mg/l, při vyšších koncentracích získává pivo silnou štiplavou chuť. Vyšší alkoholy vznikají tzv. Ehrlichovou dráhou, která spočívá v transaminaci aminokyseliny na α -ketokyselinu, která je následně dekarboxylována na aldehyd, a potom redukována na alkohol [1, 21, 22].

Další významnou skupinou látek ovlivňujících senzorické vlastnosti piva jsou estery, které mají i přes svou nízkou koncentraci významný vliv na aroma výsledného piva. Estery se v pivu vyskytují v koncentraci 20–100 mg/l a jejich množství vzrůstá se zvyšující se koncentrací původního extraktu a obsahem zkvasitelných sacharidů [1, 22]. Kvasinky jsou schopny vytvářet dva typy esterů – estery mastných kyselin a estery kyseliny octové s ethanolem. Estery ethanolu nebo vyšších alkoholů s mastnými kyselinami vznikají činností acyl-CoA syntetázy a alkoholacyltransferázy. Na vzniku druhé skupiny esterů se podílí alkoholacetyltransferáza. Většina acetyl-CoA nutná pro vznik esterů kyseliny octové a alkoholů vzniká při oxidativní dekarboxylaci pyruvátu [18, 19]. Estery vznikají převážně v první fázi kvašení kondenzací alkoholů a organických kyselin. V pivu bylo nalezeno více než 100 esterů se specifickým aroma. Mezi významné estery patří hexylacetát, isoamylacetát, 2-fenylethylacetát, ethylhexanoát. Přibližně třetinu celkového množství esterů tvoří ethylacetát, který se v pivu ležáckého typu vyskytuje v množství 8–12 mg/l [22].

Látky obsahující síru se do piva dostávají přímo z mladiny v nezměněném stavu nebo činností kvasinek. Oxid siřičitý je vedlejším produktem kvasinek při syntéze aminokyselin, které obsahují síru nebo redukcí síranu obsažených v mladině. Sulfan uděluje pivu nepřijemnou

pachut', která je patrná už při jeho nízkých koncentracích, pivními kvasinkami je produkován zejména při biosyntéze methioninu a cysteinu. Sulfan může s některými aldehydy, alkoholy a ketony reagovat za vzniku thiolů. Ze sirných sloučenin se v pivu může dále vyskytovat dimethylsulfid a dimethylsulfoxid [1, 22].

Karbonylové látky jsou v pivu obsaženy v rozmezí 10–50 mg/l. Nejvíce zastoupeným aldehydem v pivu je acetaldehyd vznikající z pyruvátu pomocí pyruvátdekarboxylázy. Acetaldehyd se v mladině vyskytuje v nejvyšší míře na počátku fermentace, následně je využíván kvasinkami. Prahová koncentrace acetaldehydu v pivu je 10–20 mg/l, při vyšších koncentracích způsobuje nepříjemné aroma. Vicinální diketon diacetyl uděluje pivu nežádoucí aroma čerstvého másla již při nízkých koncentracích (0,1–0,2 mg/l). Diacetyl je pro pivní kvasinky vysoce toxický a bývá jimi odbouráván [1, 22].

V průběhu fermentace vznikají i organické kyseliny. Mezi vznikající netěkavé organické kyseliny patří kyselina mléčná, jablečná, pyrohroznová a citronová. Z těkavých organických kyselin s nižším počtem atomů uhlíku je až z 99 % zastoupena kyselina octová, což odpovídá asi 200 mg/l, následuje kyselina máselná, izomáselná, propionová a hexanová. Vzhledem ke zvyšujícímu se množství organických kyselin a poklesu aminokyselin se v průběhu fermentace zvyšuje acidita mladiny. Vyšší množství volného aminodusíku v mladině vede ke stimulaci růstu kvasničných buněk a k uvolňování organických kyselin. Hodnotou pH je taktéž ovlivněna tvorba dalších senzoryckých významných látek, jako jsou estery, diacetyl a dimethylsulfid [1, 22].

2.1.10 Chmel

Chmel je nenahraditelnou surovinou při výrobě piva, dodávající mu typickou hořkost a aroma [1]. Z botanického hlediska se jedná o rostlinu z čeledi konopovitých, která je rozdělena na tři samostatné druhy – chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), chmel japonský (*Humulus japonicus*) a chmel oplétavý (*Humulus scandens*), někteří autoři uvádějí další samostatný druh *Humulus yunnanensis* [1, 21].

Pro pivovarské účely se pěstují především samičí rostliny chmelu evropského, poddruhu chmelu otáčivého, samčí rostliny jsou využívány pro šlechtění nových odrůd [2, 20]. Podle zbarvení révy se rozlišují rostliny na subvariety červeňáky, které jsou zbarveny červeně až fialově, jejichž pigmentaci ovlivňují anthokyany, a zeleňáky, u kterých tato pigmentace chybí [1].

Základ rostliny tvoří zdřevnatělá babka, ze které vyrůstají hlavní kulovité kořeny do hloubky až šesti metrů a postranní kořeny, které se nacházejí jen mírně pod povrchem. Z babky taktéž každé vegetační období vyrůstá samotná réva, která se při dosažení výšky 50 cm vine pravotočivě podle vodícího drátu do výšky sedmi až osmi metrů. Z révy vyrůstají tzv. pazochy, což jsou postranní větévky, u jejichž paty rostou květonosné větévky se samičím květenstvím. V průběhu zrání je květenství přeměněno na plody – hlávky vejčitého tvaru, které obsahují chmelové pryskyřice a silice a jsou následně sklizeny pro pivovarské účely [1, 2].

Z hlediska pěstování je chmel náročný na světlo, teplotu, půdní podmínky a vzhledem k rychlému přírůstku zelené hmoty i na vlhkost. Pro pěstování chmelu jsou vhodné oblasti s průměrnou roční teplotou 8–10 °C s výskytem jílovito-hlinitých půd o pH 5,6–7,5 s dostatkem fosforu, draslíku, dusíku, hořčáku a vápníku [1, 2]. V České republice se nachází tři povolené pěstitelské oblasti – Žatecko, Ústěcko a Tršicko. Největším světovým producentem chmelu je Německo, následují Spojené státy americké, Anglie, Polsko, Slovinsko a Austrálie. V Evropě jsou pěstovány především červeňáky, v Anglii, USA a Austrálii zeleňáky [1].

Odrůdy chmelu se od sebe liší obsahem chmelových pryskyřic (především α - a β -hořkých kyselin) a silic (farnesen, karyofylen, myrcen). Na základě pivovarských vlastností, obsahu chmelových pryskyřic a silic a genetické příbuznosti jsou v současné době odrůdy chmelu rozděleny do čtyř skupin:

- Jemné aromatické odrůdy obsahují přibližně 3,5–4,0 % hm. α -hořkých kyselin v sušině, z čehož až 25–30 % tvoří kohumulon. Farnesen je v silicích obsažen v rozmezí 10–15 %, u Žateckého poloraného červeňáku tvoří až 18 % celkového obsahu silic. Do skupiny patří chmel Tettang, Spalt a Lublin [1, 2].
- Aromatické odrůdy obsahují 3,5–6,5 % α -hořkých kyselin s 20–40% obsahem kohumulonu, podíl farnesenu je obvykle nižší a tvoří přibližně 5 %. Aromatické odrůdy chmelu jsou Hersbrucker, Hallertauer, Golding, Perle a česká odrůda Sládek [1, 2].
- Hořké chmely obsahují asi 8 % α -hořkých kyselin s 30% podílem kohumulonu. Farnesen tvoří asi 2 % silic. Některé z chmelů této skupiny jsou zdrojem příznivého aroma, a proto jsou označovány jako poloaromatické nebo dvouúčelové. Do skupiny hořkých chmelů spadají české odrůdy Bor a Premiant a anglický chmel Northern Brewer [1, 2].
- Vysokoobsažné odrůdy chmelu jsou převážně hybridní rostliny s až 15% obsahem α -hořkých kyselin s méně výrazným aroma, které jsou zpracovávány převážně na chmelové extrakty. Do této skupiny chmelů patří odrůdy Nugget, Taurus a Columbus [1, 2].

Chmel obsahuje řadu technologicky významných, ale i balastních a nežádoucích látek. Obsah těchto látek se odvíjí od odrůdy, ročníku, místa pěstování a posklizňových úpravách. Nejvýznamnější technologickou složku tvoří polyfenoly, silice, a především chmelové pryskyřice [1, 2].

Tabulka 2: Chemické složení chmelu [1, 2, 25]

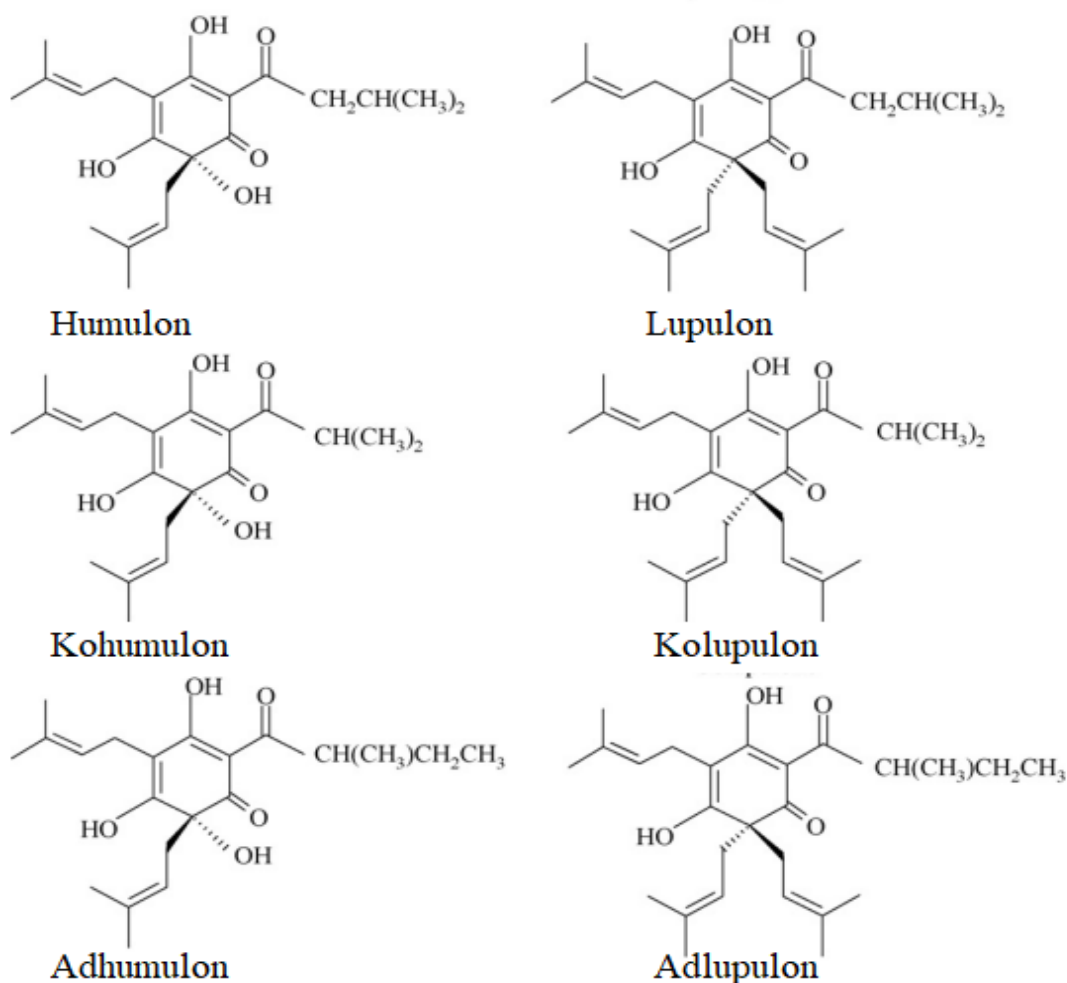
Složka	Obsah [% hm.]
Voda	8–12
Celkové pryskyřice	15–20
α -hořké kyseliny	2–12
β -hořké kyseliny	2–10
Fenolické látky	2–6
Silice	0,2–2,5
Vosky a lipidy	1–3
Dusíkaté látky	12–15
Celulóza	40–50
Monosacharidy	2
Minerální látky	6–8
Popel	8

Po posklizňových úpravách obsahuje chmel přibližně 10 % vody. Pokud chmel obsahuje méně než 10 % vody, dochází k jeho drolení a ke ztrátám technologicky významných látek, především těch hořkých. Pokud chmel obsahuje více než 12 % vody, snadno podléhá mikrobiální kontaminaci a oxidačním změnám [1].

Technologicky nejdůležitějšími složkami chmelu jsou chmelové pryskyřice, které tvoří až 30 % hmotnosti chmelových výrobků [1]. Jedná se o deriváty floroglucinolu, dělí se do dvou skupin – α -hořké kyseliny a β -hořké kyseliny, které se vzájemně liší přítomností prenylové skupiny [24]. Chmelové pryskyřice odpovídají za intenzitu a charakter hořkosti piva. Chmelové pryskyřice se dělí na měkké chmelové pryskyřice, do kterých spadají α -hořké kyseliny a β -hořké kyseliny, dále na nespecifické měkké a tvrdé pryskyřice. Většinou se jedná o chemicky velmi podobné látky, které jsou nepolární a lehce podléhají oxidačním změnám [1].

Chmelové α -hořké kyseliny jsou slabé kyseliny, které jsou poměrně málo rozpustné ve vodě a vodných roztocích. Hořké α -hořké kyseliny tvoří směs sedmi analogů humulonů [1]. Majoritní podíl α -hořkých kyselin je tvořen humulonem (35–70 % celkových α -hořkých kyselin), přibližně 20–65 % tvoří kohumulon a 10–15 % adhumulon (viz obr. 3). Chmelové α -hořké kyseliny jsou hlavními látkami, které ovlivňují kvalitu chmelu, mají významný podíl na stabilizaci pивní pěny a také vykazují antimikrobiální aktivitu. Při vyšším pH a vysoké teplotě izomerují α -hořké kyseliny na odpovídající iso- α -hořké kyseliny, které stejně jako α -hořké kyseliny ovlivňují výsledný charakter hořkosti piva, stabilitu jeho pěny a antimikrobiální vlastnosti [20]. Izomerované α -hořké kyseliny odpovídají asi za 85 % hořkosti piva. Při chmelovaru vznikají dvě formy iso- α -hořkých kyselin, z toho přibližně 68 % těchto kyselin bude ve stabilnější cis-formě, 32 % ve formě trans- [1].

Méně pivovarsky významnou složku chmelových pryskyřic tvoří β -hořké kyseliny [2]. Majoritní složkou β -hořkých chmelových kyselin je lupulon, který tvoří 30–55 % celkového množství [24]. Kolupulon tvoří přibližně 20–55 %, adlupulon 5–10 %, minoritní podíl β -hořkých chmelových kyselin tvoří prelupulon a postlupulon [1, 24, 26]. První tři nejzastoupenější analogy β -hořkých kyselin jsou na obr. 3. Chmelové β -hořké kyseliny mají oproti α -hořkým kyselinám v molekule větší počet postranních hydrofobních řetězců, které snižují jejich rozpustnost. Oproti α -hořkým kyselinám vykazují nižší stabilitu v přítomnosti kyslíku [1]. Jelikož jsou β -hořké kyseliny strukturně odlišné od α -hořkých kyselin – neobsahují terciární alkoholovou skupinu v aromatickém jádru – nedochází při chmelovaru k jejich izomeraci. Nejvýznamnější transformační produkty β -hořkých kyselin jsou hulupony, které dosahují 50–75 % hořkosti izomerovaných α -hořkých kyselin. Při chmelovaru vznikají hulupony velmi omezeně, vznikají především při skladování a posklizňových úpravách chmelu. Jejich obsah ve chmelu se pohybuje v rozmezí 0,5–3 %. Charakter hořkosti u piva chmeleného β -hořkými kyselinami a jejich oxidačními produkty je popisována jako příjemný a rychle dozívající [27].



Obrázek 6: Strukturní vzorce nejzastoupenějších α - a β -hořkých kyselin chmele [24]

Chmelové silice tvoří zhruba 0,5–3 % hm. chmelu. Jedná se převážně o terpenické látky, které se dělí na frakci uhlovodíkovou, kyslíkatou a frakci sirných sloučenin. Chmelové silice jsou směsí chemicky rozlišných látek, jejichž zastoupení v chmelu závisí na podmínkách pěstování, odrůdě, sklizni a posklizňových úpravách [1, 2].

Uhlovodíková frakce tvoří 70–80 % chmelových silic. Do uhlovodíkové frakce chmelových silic se řadí alifatické uhlovodíky, monoterpeny (myrcen, α - a β -pinen, limonen), seskviterpeny (β -farnesen, β -karyofylen). Obsah těchto látek v chmelu je dán geneticky. Během chmelovaru velká část uhlovodíkové frakce chmelových silic vytěká, a proto do výsledného výrobku přechází nepatrně [1, 2, 29]. Zhruba třetina chmelových silic je tvořena kyslíkatou frakcí. Složení kyslíkové frakce je silně závislé na posklizňových úpravách a skladování chmelu, jelikož vzniká převážně oxidačními přeměnami frakce uhlovodíkové. Do kyslíkaté frakce patří směs terpenových, seskviterpenových, alifatických a aromatických alkoholů, kyselin, esterů a různých karbonylových sloučenin. Složky kyslíkaté frakce jsou v porovnání s frakcí uhlovodíkovou více rozpustné, a proto s některými kvasnými metabolity tvoří aroma piva [1, 2].

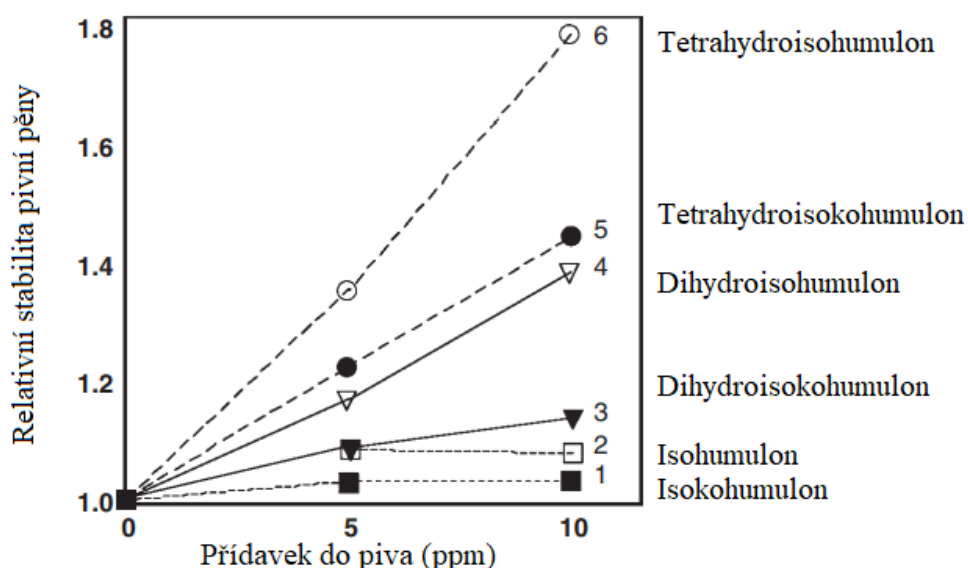
Sirné sloučeniny tvoří jen asi 0,1 % chmelových silic. Většinou se jedná o látky s nízkým prahovým vnímáním, které ovlivňují aroma piva spíše negativně [1]. Množství sirných sloučenin, které chmel obsahuje, je ovlivněn především ošetřováním chmelnic pomocí

pesticidů. Mezi sirné sloučeniny obsažené v chmelu patří např. thioly, sulfidy a thioestery [30].

Skupina fenolických látek chmelu je tvořena směsí flavonových glykosidů, anthokyanogenů, katechinů a fenolových kyselin. Chmelových polyfenolů je v pivu přibližně 20–30 %, zbylé množství tvoří polyfenoly sladové. Obsah chmelových polyfenolů je dán především odrůdou. Jemné aromatické odrůdy chmelů obsahují vyšší množství polyfenolů než odrůdy s vysokým obsahem hořkých kyselin. Jelikož mají chmelové polyfenoly redukční vlastnosti, jsou schopny zabránit oxidaci chmelových pryskyřic. Jedná se o ve vodě dobře rozpustné látky s vysokou reaktivitou s bílkovinami, se kterými reagují za vzniku třísko-bílkovinných komplexů. Vzhledem ke svému antioxidačním schopnostem se podílejí na zabránění tvorby nebiologických zákalů. Pokud polyfenoly podlehnou oxidačním nebo kondenzačním změnám, mohou tvorbu nebiologických zákalů naopak podporovat [1, 2].

2.1.11 Složky chmelu ovlivňující stabilitu pивní pěny

Kromě dodání typické chuti a hořkosti jsou hořké chmelové kyseliny důležité i pro tvorbu a stabilizaci pивní pěny, na které se podílí společně s bílkovinami. Stejně jako u bílkovin platí, že vyšší schopnost tvorby a stabilizace pивní pěny mají chmelové kyseliny, které jsou více hydrofobní. Dalším faktorem, který u chmelových kyselin ovlivňuje schopnost stabilizace pивní pěny, je stupeň jejich modifikace hydrogenací. Pokud je hořká chmelová kyselina hydrogenována, dochází k redukci karbonylové skupiny nebo k hydrogenaci dvojných vazeb na postranních řetězcích, čímž dochází ke zvýšení jejich hydrofobicity. Hydrofobní postranní řetězce takto modifikovaných hořkých chmelových kyselin následně interagují se zbytky aminokyselin na polypeptidových řetězcích pomocí hydrofobních interakcí. Hořké chmelové kyseliny jsou schopny ovlivnit stabilitu pивní pěny i snížením povrchového napětí a tvorbou reverzibilních křížových vazeb s polypeptidy přítomnými v pивní pěně [8, 35].



Obrázek 7: Porovnání relativní stability pивní pěny při použití různých forem isohumulonu [8]

2.2 Technologie výroby piva

2.2.1 Šrotování sladu

Šrotování je technologický proces, při kterém dochází k mechanickému rozdrčení sladových zrn na různé podíly jemných a hrubých částic. Při šrotování sladu by mělo dojít k dokonalému vymletí endospermu, a tím ke zpřístupnění extraktivních látek pro fyzikální a biochemické změny probíhající při následném rmutování a dalších krocích při přípravě mladiny [1]. Při šrotování sladu by mělo dojít k co nejmenšímu poškození pluch sladového zrna. Pokud dojde k výraznému poškození pluch, bude snížena porozita mláta, čímž může být ovlivněna i chuť výsledného piva, jelikož se zvyšující se dobou scezování dochází k vyluhování většího množství hořkých a barevných látek, pentosanů a polyfenolů. Optimální výsledek rmutování závisí především na jemném vymletí endospermu, jelikož ječné zrnko není stejnoměrně rozluštěno po celé své délce – míra rozluštění klesá od spodní části zrna po špičku. Při šrotování vzniká ze špičky převážně hrubá krupice, která je málo rozpustná a málo zcukřitelná. Pokud bude sladový šrot obsahovat vysoký podíl hrubé krupice, bude zvýšeno množství nez cukřeného extraktu v mlátě a taktéž klesne dosažitelný stupeň prokvašení mladiny. Optimální šrot by se měl skládat z nepoškozených obalových částí zrna a vysokým podílem jemné krupice [2].

Mletí sladu může probíhat vícero způsoby. Prvním ze způsobů je mletí za sucha, ke kterému jsou využívány dvou až šestiválcové šrotovníky s hladkými nebo rýhovanými válci. Další způsob šrotování sladu je spojen s jeho kondicionováním – kropením sladu vodou o teplotě 30 °C, které zvyšuje elasticitu pluch, čímž je zajištěna jejich vyšší odolnost vůči rozemletí. V případě mletí sladu za mokra je slad máčen ve vodě o teplotě 10–50 °C po dobu 10–30 minut. Při mletí za mokra je vlhkost sladu zvýšena až na 30 %. V případě mletí sladu za mokra dochází k extrakci některých látek do máčecí vody, která se následně používá i pro vystírání [1].

2.2.2 Vystírání

Roze mletý sladový šrot je následně smíchán s částí varní vody. Pro výrobu českých piv z dobře rozluštěných sladů za použití dekokčního postupu rmutování je optimální vystírací voda o teplotě 35–38 °C. Teplota vystírací vody se může pohybovat v rozmezí 20–60 °C v závislosti na míře rozluštění sladu. Při vystírání je důležité, aby se do nálevu převedlo co nejvíce rozpustných látek, což ovlivní další proces vaření piva a následně i jeho organoleptické vlastnosti. Mezi rozpustné látky sladu patří především cukry, některé neškrobové polysacharidy, nízkomolekulární dusíkaté látky a malé množství sladových enzymů. Množství vystírací vody je závislé i na typu piva. Pro podporu činnosti amylolytických enzymů je pro světlá piva vhodný vyšší podíl vystírací vody pro získání řidšího rmutu. Pro tmavá piva se naopak volí menší podíl vystírací vody, jelikož hustý rmut výrazně podporuje činnost proteolytických enzymů [1].

2.2.3 Rmutování

Extraktu, který se při rmutování vylouží přímo do vody pouze pomocí zvýšené teploty a míchání, je přibližně 15–17 %. Po vystírce tedy následuje proces rmutování, při kterém je možno vyšší podíl vysokomolekulárních látek endospermu sladového zrna extrahovat do roztoku za pomoci enzymaticky katalyzovaných reakcí, kterých se účastní enzymy amylolytické, proteolytické a kyselinotvorné [1, 2]. Převedení optimálního množství sladového extraktu, především z kvasitelných cukrů, které vznikají amylolytickým štěpením škrobu, je důležitým krokem ovlivňujícím další technologické operace při vaření piva [1].

Amylolytické štěpení škrobu probíhá ve třech stupních. Bobtnání a mazovatění škrobu se odvíjí od rychlosti zahřívání, teploty, ale i od druhu použitého ječmene. U sladu z ječmene

z chladnějších oblastí dochází k mazovatění již při 50 °C, u ječmene z oblastí teplejších může k mazovatění dojít až při 57 °C [1].

Při ztekucení škrobu dochází vlivem enzymaticky katalyzovaných reakcí ke zkracování řetězce škrobu, resp. amylozy a amylopektinu, k postupnému zcukření. Optimálního zcukření lze dosáhnout správnou volbou teploty rmutování [1]. Na štěpení škrobu se podílí především enzymy α -amyláza a β -amyláza. α -Amyláza je škrobovým endoenzymem, který náhodně hydrolyzuje složky škrobu uvnitř řetězce. Substrát nejprve štěpí na dextriny, tzn. lineární oligosacharidy o šesti až sedmi glukózových jednotkách, které jsou nadále štěpeny na glukózu, maltózu a maltotriózu, případně oligosacharidy s 1,6-glykosidovou vazbou [2, 31]. β -Amyláza je exoenzym, který hydrolyzuje molekulu škrobu od neredukujícího konce. Pomocí β -amylázy dochází k téměř dokonalé hydrolýze amylozy, kdy vedle maltózy vzniká maltotrióza, která je následně štěpena na maltózu a glukózu. Amylopektin bývá hydrolyzován jen částečně, jelikož dojde k pozastavení enzymu v místě větvení [2].

Pro správnou aktivitu sladových enzymů je při rmutování nutno dodržovat několik technologických teplotních rozmezí:

- Kyselinotvorná teplota 35–38 °C, podpora rozpouštění látek v extraktu, zpřístupnění těchto látek sladovým enzymům [1].
- Peptonizační teplota 45–50 °C, proteolýza, štěpení fosforečnanů a neškrobových polysacharidů typu β -glukanů [1].
- Nižší cukrotvorná teplota 60–65 °C, optimum pro působení β -amylázy, zvýšení množství redukujících cukrů v roztoku [1].
- Vyšší cukrotvorná teplota 70–75 °C, optimální pro působení α -amylázy, pokles viskozity roztoku, málo výrazný přírůstek redukujících cukrů [1].
- Odrmutovací teplota 76–78 °C, dochází k inaktivaci enzymů [1].

Rmutování se v závislosti na způsobu přechodu mezi technologickými teplotami dělí na dekokční a infuzní. Dekokční rmutování je provedeno dílčím zahříváním jednotlivých částí rmutů. Rmut je oddělená část vystírky, která je povařena a následně navracena do vystírací pánve. Objem rmutu je volen tak, aby po jeho povaření a navrácení zpět do vystírací pánve došlo ke zvýšení teploty zbytku díla na další požadovanou technologickou teplotu. Proces je podle potřeby opakován několikrát. Dekokční způsob rmutování se dělí na jednorumutový, dvourumutový a třírumutový [1, 2]. Infuzní rmutování je energeticky i časově méně náročné a k provedení postačuje jedna rmutovací nádoba. Infuzní rmutování spočívá v zahřívání celého objemu díla bez povařování částí rmutu. Piva uvařená infuzním způsobem mají světlejší barvu a vyznačují se méně výraznou chutí [1, 2].

2.2.4 Scezování

Po odrmutování je nutno oddělit nerozpustný podíl mláta od vodného roztoku extrahovaných látek procesem scezování. Jedná se v podstatě o filtraci, která se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem scezování je oddělení předku, což je sladina zadržovaná v mlátě. Druhým krokem je vyslazování, kdy je promýváním zbytku mláta horkou vodou získána zředěná část sladiny, tzv. výstřelky. Pomocí scezování je získána čirá sladina s maximem extrahovatelných látek ze vstupních surovin. Získaný předek a výstřelky spolu tvoří celkový objem sladiny, která je následně použita při chmelovaru [1, 2].

Scezování a filtrovatelnost sladiny jsou ovlivněny vstupní kvalitou sladu a složením sladového šrotu, stupněm degradace vysokomolekulárních látek (převážně polysacharidů typu β -glukanů a polyfenolů), teplotními podmínkami a technologickým vybavením [1].

2.2.5 Chmelovar

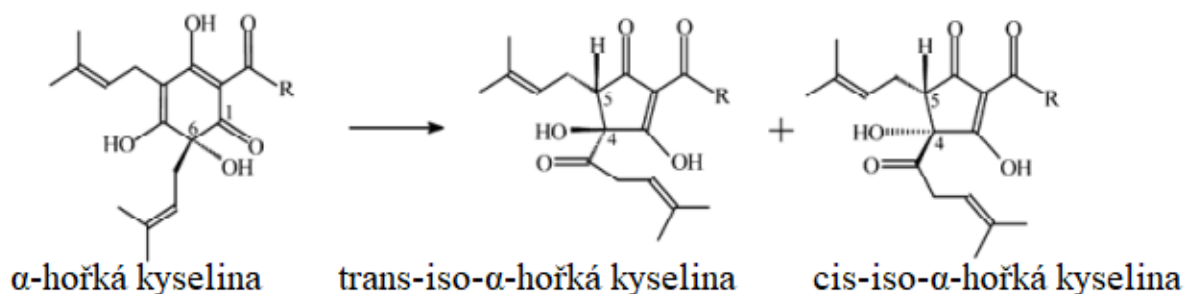
Při chmelovaru se sladina získaná v předchozím kroku vaří v mladinové pánvi s chmelem přibližně 90–120 minut. Během chmelovaru dochází k odpaření přebytečné vody, čímž je získána mladina o požadované koncentraci, v závislosti na době a teplotě dochází k odpaření těkavých látek, kterými jsou některé chmelové silice, oxidační produkty a dimethylsulfid. Dalším cílem je inaktivace enzymů, inhibice reziduální mikroflóry a sterilace mladiny. Varem mladiny taktéž dochází k tvorbě produktů Maillardovy reakce, zvýšení barvy a poklesu pH. Důležitým dějem je izomerace hořkých látek chmele, především chmelových α -hořkých kyselin, které se během varu mění na iso- α -hořké kyseliny. Po chmelovaru vzniká horká mladina, kterou je nutno oddělit od chmelového mláta a následně zchladit na zákvasnou teplotu [1, 2].

Ke chmelení byl využíván lisovaný chmel, v současnosti se kvůli lepší manipulaci ve velké míře přechází k využívání granulovaných chmelových výrobků. Intenzita a charakter hořkosti výsledného piva ovlivňují především α - a β -hořké kyseliny, které jsou částečně rozpustné. Důležitým faktorem ovlivňujícím výslednou organoleptickou kvalitu piva je právě izomerace hořkých chmelových látek. Izomerace těchto látek je ovlivněna převážně pH mladiny a teplotou prostředí. Platí, že s nižší hodnotou pH se rozpustnost hořkých chmelových kyselin snižuje, s rostoucí hodnotou pH se zvyšuje obsah iso- α -hořkých kyselin. Pokud je pH příliš vysoké, může dojít k výskytu hořkých kyselin ve formě solí, které negativně ovlivní charakter hořkosti [1].

Z hlediska hořkosti jsou nejvíce významné α -hořké kyseliny, jejichž rozpustnost při pH 5,9 je asi 480 mg/l, při pH 5,2 klesá na 84 mg/l a při pH 5,0 klesá jejich rozpustnost až na 60 mg/l. Hořké chmelové β -kyseliny jsou oproti α -hořkým kyselinám podstatně méně rozpustné. Při pH 5,9 se rozpouští přibližně 12 mg/l β -hořkých kyselin, při pH 5,2 jen 8 mg/l. pH mladiny se běžně pohybuje v rozmezí 5,4–5,6 [1].

Obsah extrahovaných hořkých látek je ovlivněno i chemickým složením varné vody. Pivo připravené z tvrdé vody bude vykazovat drsnou hořkost i při nižším chmelení. Charakter hořkosti piva, které bylo uvařeno z měkké vody s malým obsahem uhličitánů, bude spíše jemnější [1].

Během chmelovaru je izomerováno přibližně 40–60 % α -hořkých kyselin a 5–15 % jich zůstává v nezměněné podobě [1]. Izomerace hořkých kyselin není stereospecifická, mírnou převahu mají cis-formy hořkých chmelových kyselin, kterých bývá 50–60 % [29]. Výslednou hořkostí se homology liší minimálně [1].



Obrázek 8: Izomerační produkty α -hořkých kyselin [28]

2.2.6 Kvašení mladiny a dokvašování piva

Kvašení mladiny probíhá ve dvou stupních. Prvním stupněm je hlavní kvašení, při kterém dochází k množení pivovarských kvasinek, přičemž je využita velká část látek obsažených

v mladíně. V prvním stupni fermentace vznikají vedle ethanolu a oxidu uhličitého i ostatní látky, které tvoří výslednou chuť piva. Jedná se o estery, vyšší alkoholy a mastné kyseliny, ale i diacetyl, různé aldehydy a sirné sloučeniny. Druhou fází kvašení je dokvašování a ležení piva. V této fázi dochází ke zkvašování zbylého extraktu pod mírným tlakem, dochází k číření piva a jeho sycení pomocí oxidu uhličitého. Zároveň dochází k vyrovnání obsahu senzoričky aktivních látek [1].

Hlavní kvašení je ovlivněno především složením mladiny a její koncentrací, teplotním průběhem a regulací teplot, stupněm provzdušnění mladiny, dobou kvašení, stupněm homogenizace směsi kvasnic a mladiny, ale i druhem fermentoru a jeho tvarem. V mladíně by mělo být obsaženo dostatečné množství fermentovatelných látek, vhodné množství dusíkatých a minerálních látek, vitaminů a růstových látek [1].

Důležitým regulačním faktorem kvašení je teplota, která se liší v závislosti na použití svrchních nebo spodních pivovarských kvasinek. Teplotní optimum pro spodní pivovarské kvasinky se pohybuje v rozmezí 5–9 °C. Při tzv. teplém vedení, které je využíváno pro intenzivní postupy, bývá teplotní rozmezí až 12–16 °C. Pro svrchní pivovarské kvasinky je teplotním optimum 15–22 °C. Doba hlavního kvašení při použití spodních pivovarských kvasinek je přibližně 7–12 dní, hlavní kvašení u svrchních pivovarských kvasinek trvá 2–8 dní. [1, 2]. Hlavní kvašení se dělí do čtyř technologických úseků:

- Při zaprašování dochází během 12–24 hodin vlivem vznikajícího oxidu uhličitého k tvorbě pěny na povrchu mladiny. Pěna je tvořena nejdříve u stěn kvasné kádě. Současně dochází k poklesu pH a zkrasitelného extraktu a k mírnému nárůstu teploty. U kvasinek toto období odpovídá lag-fázi [1].
- Nízké až vysoké bílé kroužky jsou důsledkem velkého množství vznikajícího oxidu uhličitého. Jsou typické vývojem bílé pěny na povrchu mladiny během 24–40 hodin hlavního kvašení. Současně dochází k dalšímu poklesu pH z 5,2–5,6 na 4,7–4,9. Extrakt klesá přibližně o 0,8–1,2 % a teplota dále stoupá přibližně o 0,5–0,8 °C během 24 hodin. Kvasinky se nachází v exponenciální fázi [1].
- Během třetího až pátého dne dochází k zabarvování kroužků vlivem vynášených kalů kvasičího média. Kroužky vzniklé pěny tak získávají hnědou barvu. pH klesá přibližně na 4,6–4,4, extrakt klesá o dalších 1,0–1,8 % za 24 hodin. Dochází taktéž ke zvyšování teploty, kterou už je nutno regulovat. Kvasinky se v této fázi nachází ve stacionární fázi [1].
- Pokud dojde k maximální míře aglutinace a sedimentace kvasinek, vzniklá kvasničná deka se začne propadat. Extrakt se snižuje přibližně o 0,2 % za 24 hodin a vzniklá deka na povrchu má asi 2–3 cm. Vzhledem k riziku negativního ovlivnění hořkosti vznikajícího piva je nutno deku sbírat. Růstová křivka kvasinek v této fázi odpovídá zpomalení růstu [1].

Hlavní kvašení je realizováno v tepelně izolovaných chlazených prostorách spilky v kvasných kádích, které jsou vyrobeny z materiálu indiferentního vůči pivu. Konstrukce kvasných kádí může být otevřená i uzavřená. Další možností kvasných nádob jsou cylindrokónické tanky, které jsou méně náročné na pracovní plochu a zajišťují snadnější automatizaci procesu, ale neumožňují sběr kvasničné deky [1, 2].

Při dokvašování a ležení piva dochází k fermentaci zbylého extraktu a sycení piva oxidem uhličitým. Teplota při dokvašování klesá z původních 5 °C na 2–0 °C. Úbytek extraktu je nejvíce patrný během prvních třech dnů, kdy klesá asi na polovinu, jeho následný pokles už je velmi pozvolný. Dochází taktéž k několika změnám v původním složení v závislosti na tlaku a teplotě ležení, čímž je ovlivněna především výsledná chuť a vůně piva. Dokvašování je

realizováno ve sklepních prostorách s teplotou okolo $-2-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, ve kterých je kladen důraz na vysoké hygienické standardy. Běžná doba ležení výčepních piv je 21 dní, u piva ležáckého typu až 70 dní [1].

2.2.7 Studené chmelení

Studené chmelení je způsob výroby piva, pomocí kterého je možno obohatit pivo větším množstvím aromatických látek chmele tak, aby jeho organoleptický profil co nejvíce odpovídal použitému chmelovému materiálu [32]. Studené chmelení spočívá v extrakci těkavých a netěkavých látek do alkoholického roztoku, které může zároveň zlepšit jeho mikrobiální a chuťovou stabilitu [33]. Dosažení požadovaného a intenzivního chmelového aroma může být ovlivněno technikou studeného chmelení – studené chmelení může probíhat tzv. statickou nebo dynamickou metodou, dále je ovlivněno typem chmelového výrobku, ale i přítomností kvasinek. Na výsledném sensorickém profilu studeně chmelených piv má vliv i teplota extrakce, složení mladiny a množství použitého chmelu [32, 33].

Příprava studeně chmelených piv se odvíjí z mladiny připravené klasickým způsobem, kdy je chmel standardně přidáván v průběhu chmelovaru, případně až do vířivé kádě. Finální dávkování chmele ale probíhá za studena, tzn. až po hlavním kvašení nebo během hlavního kvašení. Silice z takto přidaného chmelového materiálu přechází do piva za nízkých teplot, přibližně v rozmezí $1-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, proto jsou jejich ztráty nebo případné transformace minimální [32, 33, 34].

Podle způsobu extrakce jsou metody studeného chmelení děleny na statické a dynamické. Statické metody jsou založeny na prosté maceraci, při které je chmelový materiál vložen do kvasné nádoby. Při dynamických metodách je pivo čerpáno přes vrstvu chmele, čímž je docíleno vyššího přestupu sensoricky aktivních látek a snížení doby extrakce [32].

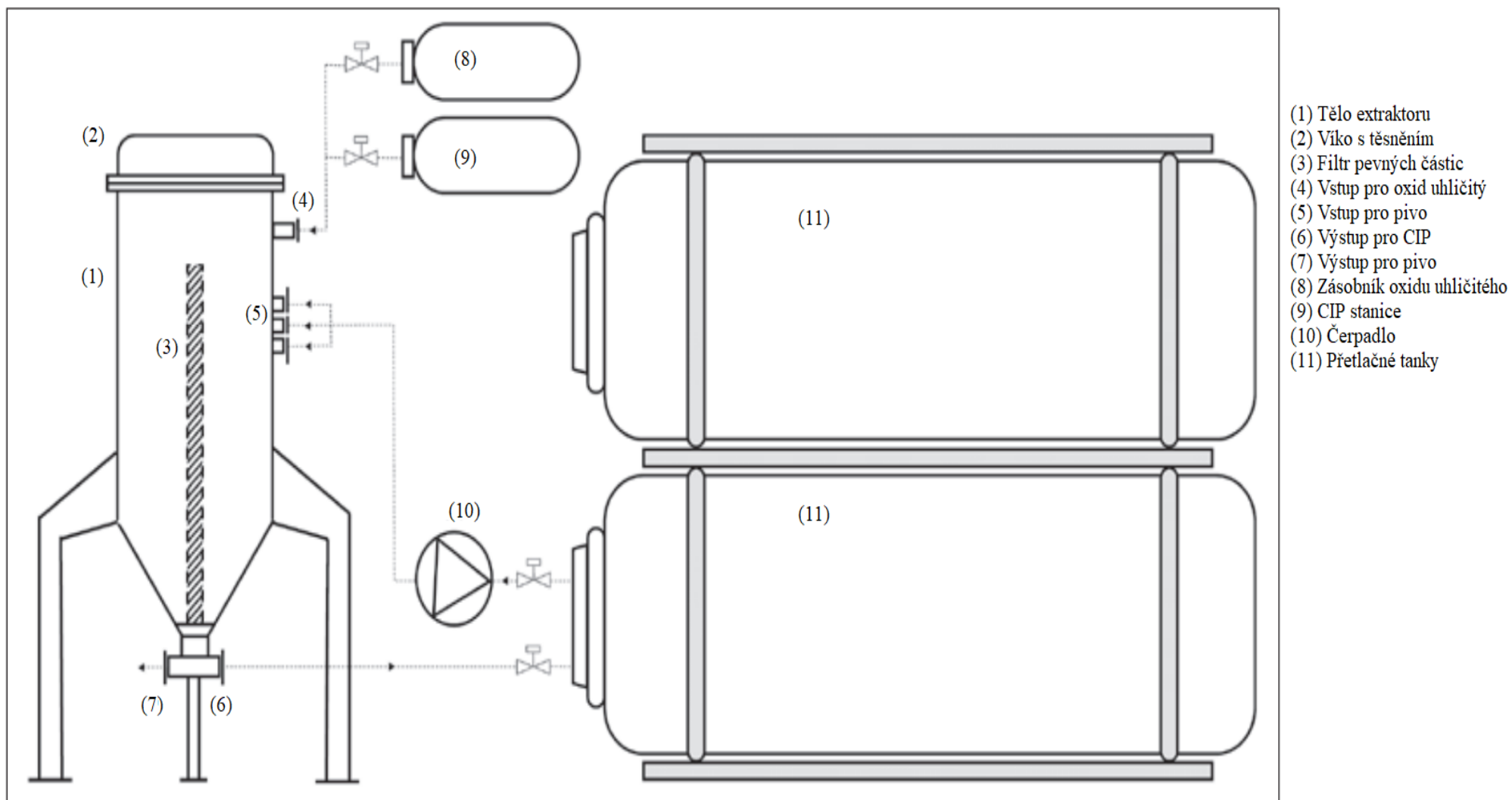
Statické metody studeného chmelení jsou založeny na pouhém vložení chmelového materiálu do nádoby s pivem tak, aby mohly sensoricky aktivní látky volně difundovat do roztoku. Chmelový materiál je při statických metodách vkládán do nádob s pivem v uzavřených permeabilních obalech, případně volně. Pokud je chmel ale vkládán volně, může dojít k technologickým problémům vlivem vzniklého sedimentu. Studené chmelení statickou metodou může být provedeno během hlavního kvašení a zrání, ale i do hotového piva. Nevýhodou přidání chmele v době hlavního kvašení je velké množství vznikajícího oxidu uhličitého, který se chová jako nosný plyn, a tudíž může unášet velké množství chmelových silic, stejně tak mohou být některé silice sorbovány na povrch kvasničných buněk. Pokud proběhne studené chmelení až ve fázi zrání piva, kdy je množství kvasinek a vznikajícího oxidu uhličitého menší, může dojít k eliminaci problémů s úbytkem chmelových silic. K vyšší extrakci silic do piva až ve fázi ležení taktéž napomáhá alkohol, který během hlavního kvašení vznikl. Aby bylo zabráněno oxidaci chmelových silic, a tím i narušení sensorického profilu daného chmele, je vhodné provést evakuaci vzduchu z nádoby inertním plynem tak, aby neobsahovala vzdušný kyslík. Jelikož jsou chmelové silice nepolární a studené chmelení probíhá za nízkých teplot, je tato metoda časově náročná a možnost regulace doby kontaktu chmelového materiálu s pivem obtížná. V případě, že je chmel vložen do cylindrokónického tanku, je možnost dobu kontaktu ukončit odstřelením sedimentu ze dna, případně přečerpáním do jiné nádoby [32].

Pro dynamické metody studeného chmelení je nutný pohyb extrakčního činidla, kterého je dosaženo čerpáním nebo mícháním. Výměna piva coby extrakčního činidla v okolí chmelového produktu a působení smykových sil, které zajišťuje jeho rozpad, výrazně dopomáhá k přestupu chmelových silic do roztoku [32]. Účinnost extrakce chmelových silic při dynamické metodě studeného chmelení závisí kromě rychlosti proudění kapaliny a charakteristice toku především na množství použitého chmelového materiálu a jeho úpravě,

době extrakce, velikosti smykových sil ovlivňujících rozpad chmelového materiálu a na vlastnostech piva [33].

Základní metoda studeného chmelení dynamickou metodou vychází z metody statické, kdy je chmelový produkt umístěn do nádoby, ze které byl evakuován vzduch a následně byla naplněna pivem. Obsah nádoby je následně recirkulován i s chmelovým materiálem. Moderní dynamické metody jsou založeny na využití tzv. chmelového extraktoru, což je většinou konický tank vyrobený z korozivzdorné oceli s filtrem pevných částic, který je schopen separovat pivo od chmelu. Chmelový extraktor bývá vybaven přívodem a odvodem piva, oxidu uhličitého a sanitačních prostředků. Kontrolu procesu extraktoru zajišťují senzory tlaku, teploty a průtoku. Chmelový materiál bývá opět umístěn přímo do extraktoru, ze kterého je pomocí inertního plynu evakuován vzduch. Kvůli eliminaci nasycení piva pracuje chmelový extraktor za zvýšeného tlaku [32].

Účinnost dynamické extrakce ovlivňuje především turbulentní proudění, které je vyvoláno mícháním nebo čerpáním. Vstupní proud piva je regulován spodním nebo tangenciálním nátokem. Přívod piva může být ale umístěn v celé výšce extraktoru. V takovém případě je zapojen tak, aby došlo ke střídavému pravotočivému a levotočivému přívodu, aby bylo zabráněno tvorbě vírů. Chmelové extraktory jsou konstruovány tak, aby je bylo možno zapojit přímo k přetlačným tankům s pivem a zároveň mohou být napojeny na sanitační jednotku [32].

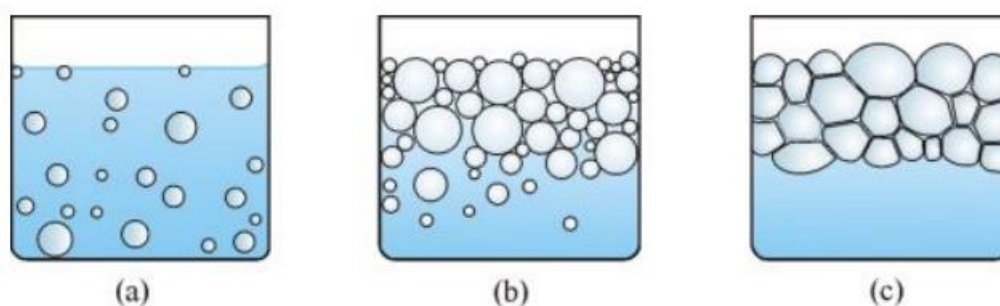


Obrázek 9: Schematické zapojení chmelového extraktoru [32]

2.3 Fyzikální vlastnosti pěny

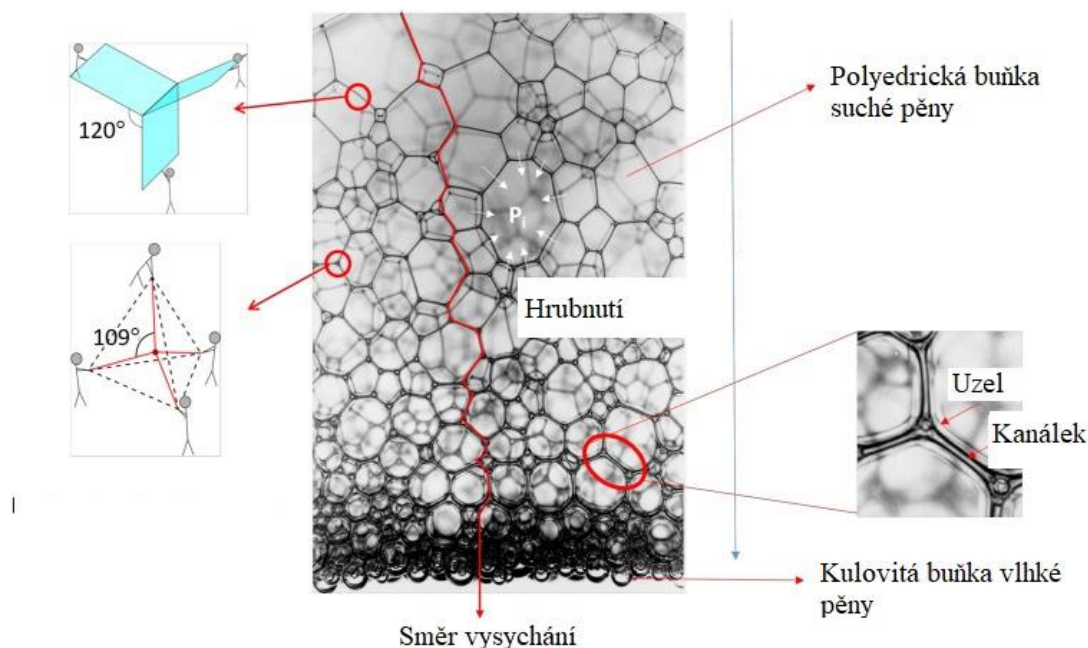
Pěna je obecně definována jako disperze vzduchových bublin v kapalině. Jedná se nejčastěji o dvoufázový systém, ve kterém jsou vzduchové buňky rozptýleny ve spojitě fází ve formě bublin. Tvar jednotlivých bublin i celé struktury pěny je dán poměrem objemů plynu a kapaliny. Bubliny v pěně s vysokým obsahem kapalné frakce jsou kulaté, pokud je obsah vody v pěně nižší, získávají bubliny tvar mnohostěnu [36].

Na základě podílu plynné a kapalné fáze se pěny rozdělují na málo koncentrované (viz obr. 10 (a)), ve kterých jsou od sebe jednotlivé bubliny v kapalině velmi vzdálené, na vlhké (viz obr. 10 (b)), ve kterých jsou bubliny vzájemně odděleny větší vrstvou kapalné fáze a na suché (viz obr. 10 (c)), které vznikají v důsledku odvodnění vlhkých pěn. V suchých pěnách je tvar bublin ovlivněn podílem plynné fáze, která zde tvoří až 90 % objemu. Jejich tvar tudíž v důsledku vzájemného stlačování není kulovitý, ale polyedrický. Objem vlhké a suché pěny se mění minimálně [32].



Obrázek 10: (a) Málo koncentrovaná pěna, (b) vlhká pěna, (c) suchá pěna [37]

Suchá pěna má plástvovitou strukturu a jednotlivé buňky jsou odděleny tenkými filmy disperzního prostředí. V ideálním případě je třemi sousedícími stěnami buněk pěny svírán úhel 120° a tvoří tzv. Gibbsův-Plateauův kanálek, kterým proudí disperzní prostředí. Tyto kanálky jsou po čtyřech propojeny v tzv. uzlu přibližně pod úhlem 109° . Plateauovy kanálky a uzly společně tvoří rozvětvenou soustavu, skrz kterou je uskutečněn přenos kapaliny pomocí gravitace a kapilárních jevů, čímž dochází k vysychání pěny [36, 37].



Obrázek 11: Struktura a děje v pивní pěně [36]

2.3.1 Vznik pěny

Pěna může být připravena dvěma způsoby. Prvním způsobem je dispergování plynu v kapalině s přítomností pěnidel, kdy se z velkých bublin mechanickým namáháním stávají malé bubliny, nebo kondenzačními metodami, při kterých dochází k tvorbě pěny v přesycené kapalině chemickou reakcí nebo heterogenní nukleací [37, 38].

I přesto, že je pivo nasyceno oxidem uhličitým, nevzniká jeho pěna samovolně. Pro vznik pěny je důležitá katalytická neboli nukleační poloha. Bubliny se tudíž mohou tvořit v plynně vyplněné prasklině či oděrci na stěně nádoby (obr. 12), případně na již existující bublině. Katalytická poloha by měla být ideálně malá, aby další vzniklé bubliny byly co nejmenší a tvořily tzv. krémovou pěnu. Velikost bublin pивní pěny je taktéž ovlivněn úhlem, pod kterým kapalina proudí do nádoby [6, 37, 39]. Pokud je nukleační centrum dokonale smáčeno kapalinou, vzniklá bublina bude konkávní a bude zaujímat co možná nejmenší povrch. V případě, že bude vzniklá bublina příliš malá, tlak uvnitř bude vyšší než v okolní kapalině, což bude mít za následek prasknutí bubliny a přechod plynu do okolní kapaliny a zároveň zánik katalytické polohy. V případě, že povrch nukleačního centra není smáčen dokonale, vznikají bubliny s konvexním povrchem a plyn je transportován difúzí z nasycené kapaliny do bubliny, která následkem toho roste. K uplatnění difuze v tomto případě dochází z toho důvodu, protože je Laplaceův tlak uvnitř bubliny přibližně 800 Pa (v případě, že se jedná o bublinu o poloměru 0,1 mm) a tlak v nasyceném pivu se pohybuje v rozmezí 0,3–0,4 MPa [6, 34]. Na velikost vznikajících bublin má kromě poloměru nukleačního centra v menší míře vliv i povrchové napětí, relativní hustota piva a gravitační zrychlení [39].

Velikost vznikajících bublin je popsána rovnicí [39]:

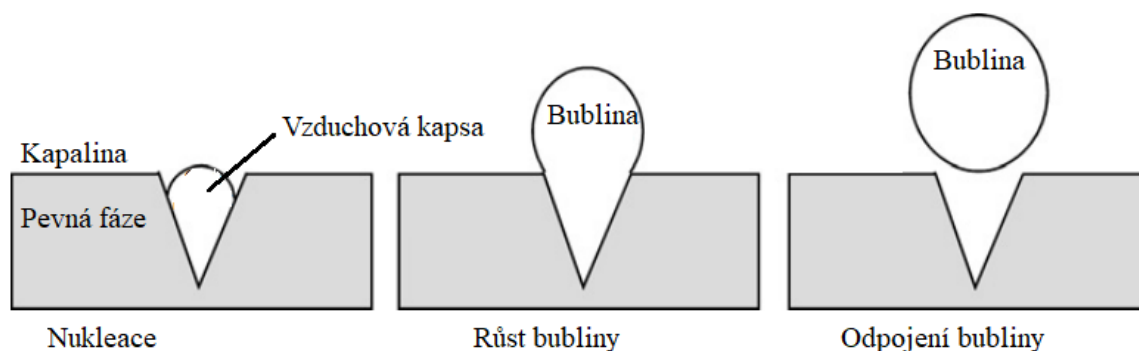
$$\text{Poloměr bubliny} = [3 \cdot R_m \cdot \gamma / 2 \cdot \rho \cdot g]^{1/3} \quad (1)$$

kde R_m je poloměr nukleační polohy (m),

γ je povrchové napětí ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$),

ρ je relativní hustota ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$),

g je gravitační zrychlení ($9,8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$).



Obrázek 12: Schematické znázornění vzniku bubliny [8]

2.3.2 Nukleační aktivita

Nukleační aktivita je jeden ze znaků ovlivňujících atraktivnost piva. Jedná se o jev, při kterém dochází k doplňování pивní pěny nově vzniklými bublinami, které by mělo ideálně trvat po celou dobu konzumace piva [39]. Na základě doplňování vrstvy pěny je možno rozdělit typy pěn na statickou a dynamickou. Statická pěna není doplňována plynem, tudíž dochází k jejímu postupnému rozpadu. Dynamická pěna je naopak doplňována a nachází se v ustáleném stavu, tzn. že rychlost vzniku a zániku bublin jsou si rovny [37].

Nukleační aktivita je popsána rovnicí [39]:

$$\alpha_n^0 = 3,11C + 0,0962\gamma - 218\rho + 216, \quad (2)$$

kde α_n^0 je počáteční nukleační aktivita (-),

γ je povrchové napětí ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$),

ρ je hustota ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$),

C je podíl CO_2 v pivu ($V_{\text{CO}_2}/V_{\text{Pivo}}$).

Pokud je přesně definovaná katalytická poloha, má na nukleaci největší vliv množství oxidu uhličitého, jelikož obvyklé hodnoty povrchového napětí a hustoty piva nejsou dostatečně velké na to, aby byl jejich vliv pozorovatelný [8, 39].

2.3.3 Vysychání pěny

Pokud není pěna kontinuálně doplňována, dochází k její destrukci. První z jevů, který ovlivňuje opadávání pěny je její vysychání. K vysychání pěny dochází v důsledku gravitačních a kapilárních jevů prakticky ihned po jejím vzniku – horní část pěny je odvodněna nejrychleji, spodní část, která je v kontaktu s kapalinou, zůstává mokrá. S postupným vysycháním pěny dochází ke ztenčení filmů mezi bublinami, a tím i k jejich zániku, koalescenci a celkovému hrubnutí pěny. Vysychání pивní pěny závisí na objemové a povrchové viskozitě piva. Vysychání pивní pěny je negativně ovlivněno látkami s hydrofobním charakterem a složkami, které zvyšují viskozitu [6, 8, 39]. Vysychání pěny je schematicky znázorněno na obrázku 11.

Vysychání pěny popisuje rovnice [38, 39]:

$$Q = 2 \cdot \rho \cdot g \cdot q \cdot \delta/3 \cdot \eta \quad (3)$$

kde Q je objemový průtok kapaliny ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$),

η je viskozita kapaliny tvořící film ($\text{Pa}\cdot\text{s}$),

ρ je relativní hustota piva ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$),

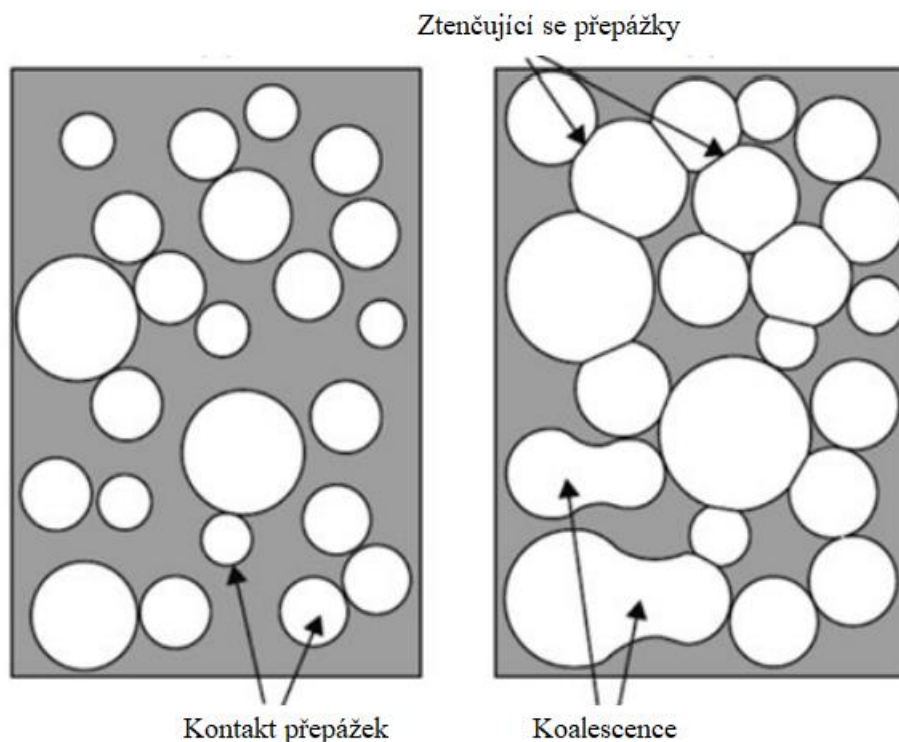
q je délka Plateauovy přepážky (m),

g je gravitační zrychlení ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$),

δ je tloušťka filmu (m).

2.3.4 Koalescence

Po tom, co jsou filmy mezi bublinami vlivem vysychání ztenčeny, dochází k tzv. koalescenci (viz obr. 13). Jedná se o nevratný jev, při kterém se dvě menší bubliny sloučí do jedné větší méně stabilní, která může být konzumentem považována za méně přitažlivou. Koalescenci pивní pěny urychlují vysoce hydrofobní látky, které narušují stabilitu filmů mezi bublinami. Jedná se především o lipidy, ale i rezidua mycích prostředků a nedokonale vymyté pивní sklo [8, 40]. Čas koalescence, tj. doba od kontaktu dvou bublin po prasknutí filmu a jejich splynutí, může být výrazně prodloužen přidávkem surfaktantů [41].



Obrázek 13: Schematické zobrazení koalescence [44]

2.3.5 Disproporcionace

Na rozdíl od koalescence má disproporcionace daleko větší význam při destrukci pěny. K disproporcionaci dochází, pokud přechází plyn z menší bubliny do větší na základě rozdílu Laplaceova tlaku [39, 42]. Hodnota tlaku je nepřímo závislá na velikosti bubliny, tudíž je tlak v menších bublinách vyšší. Výsledkem disproporcionace je zánik malých bublin a zároveň další zvětšení bublin velkých. V horních vrstvách pěny dochází k difuzi oxidu uhličitého z pивní pěny do atmosféry a difuzi kyslíku a dusíku do pěny. Jelikož je kyslík i dusík méně rozpustný než oxid uhličitý, vznikají na povrchu pěny menší bubliny [6, 8, 43].

Disproporcionace je popisována rovnicí podle De Vries [8, 39]:

$$r_t^2 = r_0^2 - \frac{4 \cdot R \cdot T \cdot D \cdot S \cdot \gamma \cdot t}{P \cdot \theta}, \quad (4)$$

kde r_t (m) je poloměr bubliny v čase t (s),

r_0 je poloměr bubliny na počátku (m),

R je plynová konstanta ($8,3 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$),

T je absolutní teplota (K),

D je plynový difuzní koeficient ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

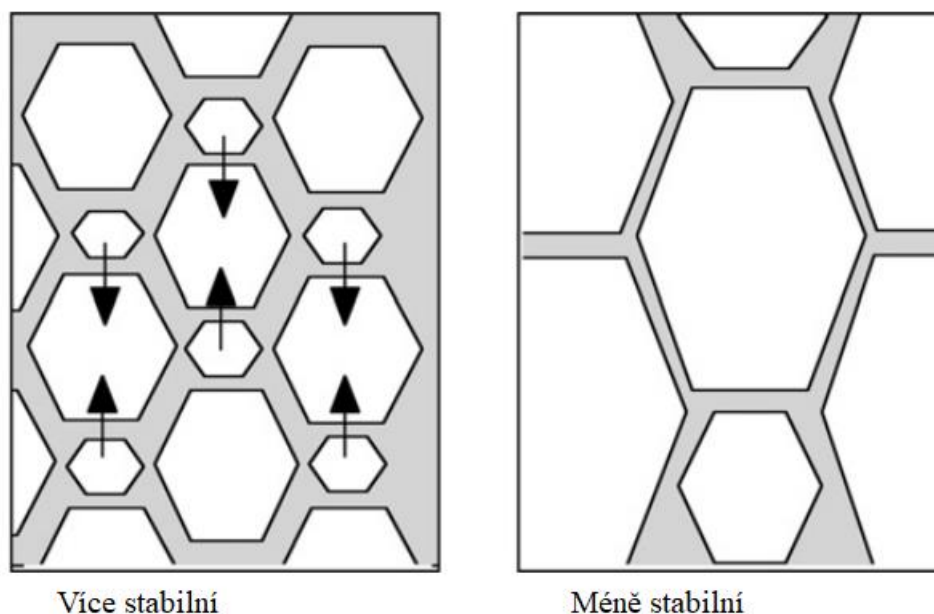
S je rozpustnost plynu ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$),

γ je povrchové napětí ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$),

t je čas (s),

P je tlak (Pa),

θ je tloušťka filmu mezi bublinami (m).



Obrázek 14: Schematické zobrazení disproportionace [8]

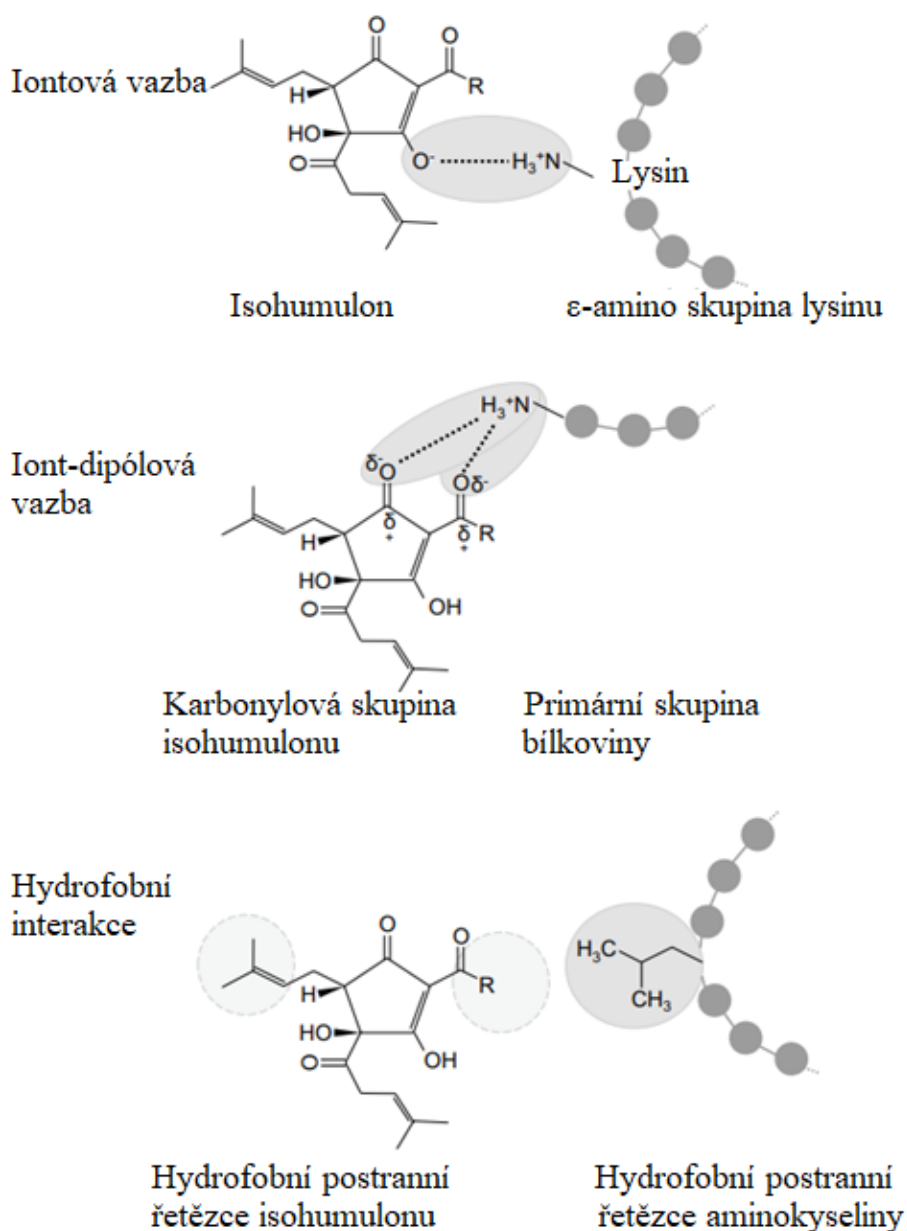
2.3.6 Stabilita pěny

Aby byla vzniklá pěna stabilní, je vyžadována přítomnost pěnотvorného činidla, což je látka, která je schopna okolo částí plynu v kapalině vytvářet stabilizující film. Stabilita pěny závisí na celkové soudržnosti, pružnosti a stálosti daného filmu, na jeho tloušťce a viskozitě disperzního prostředí, která ovlivňuje odtok kapaliny z mezivrstev. Dalším faktorem ovlivňujícím stabilitu pěny je tlak nasycené páry disperzního prostředí nad pěnou a elektrický náboj povrchového filmu. Stabilita pивní pěny je taktéž dána závislostí povrchového napětí roztoku na koncentraci povrchově aktivní látky. Povrchově aktivní látky v disperzním prostředí jsou schopny snižovat mezifázové napětí, tudíž i rozdíl tlaku v částicích s rozdílnou velikostí. Tyto látky adsorbované na povrchu jednotlivých bublin slouží taktéž jako stérická zábrana, která brání difuzi molekul kapalné fáze skrz rozhraní [37].

Látky, které jsou schopny pomocí adsorpce na povrchovém rozhraní schopny tvořit stabilizující film, se nazývají pěnотvorná činidla. Jimi vytvořený stabilizující film zajišťuje pevnost a pružnost přepážky, což zvyšuje její schopnost odolávat mechanickým vlivům a umožňuje jí reagovat na změny povrchového napětí roztoku. Kvůli zachování tloušťky přepážek mezi bublinami by mělo pěnотvorné činidlo taktéž difundovat z Plateauových kanálků do přepážek a zpět [37]. Mezi pěnотvorná činidla patří látky, které jsou v kapalině schopny snížit povrchové napětí. Patří mezi ně mýdla a detergenty s vysokou povrchovou aktivitou, tuhé práškovité látky s lyofobním povrchem, saponiny a různé polymerní látky, například proteiny, amfifilní polymerní látky (chitosan), modifikovaná celulóza, pektiny a některé galaktomanany. [34, 37, 44]. Mýdlovité látky, které vykazují vysokou povrchovou aktivitu, jsou nízkomolekulární surfaktanty s hydrofobním řetězcem. Mezi nejpoužívanější nízkomolekulární surfaktanty patří fosfolipidy a jednoduché formy glyceridů [44].

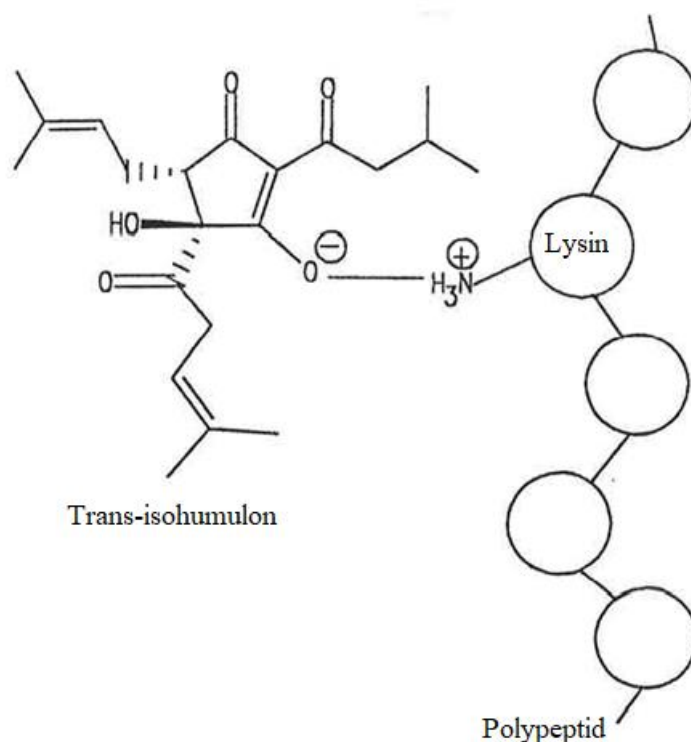
2.3.7 Interakce v pивní pěně

V pивní pěně bylo objeveno několik interakcí, které by mohly dopomáhat ke zvýšení její stability. Jedná se především o interakce mezi izomerovanými α -hořkými kyselinami a proteiny nebo některými aminokyselinami. Tyto sloučeniny mezi sebou mohou interagovat za vzniku iontových, iont-dipólových nebo hydrofobních vazeb [45].



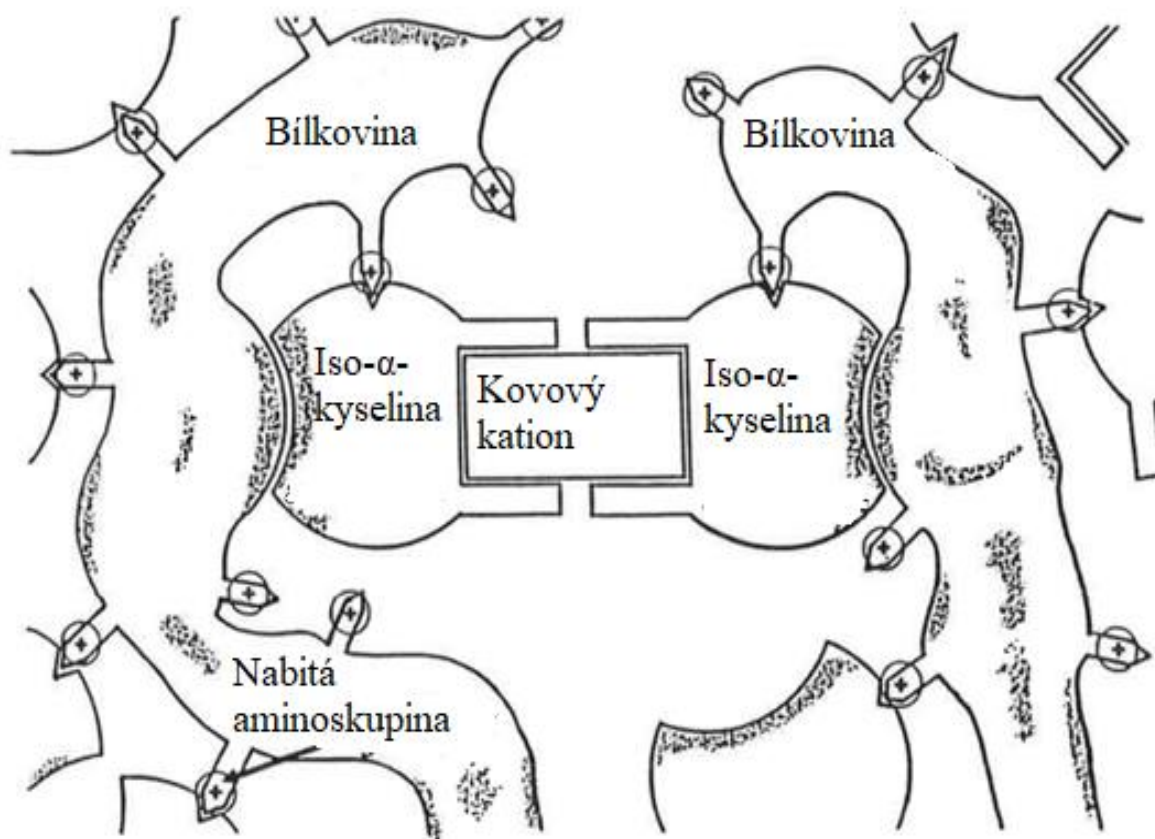
Obrázek 15: Přehled interakcí stabilizujících pивní pěnu [40]

Asano a Hashimoto (1976, 1980) provedli výzkum pивní pěny zaměřený na interakce mezi izomerovanými hořkými kyselinami a proteiny o různých molekulárních frakcích. Ve své práci se zaměřili na tři frakce proteinů o velikostech $M_r = 15\,000$, $40\,000$ a $90\,000$ – $1\,000\,000$, jejichž mechanismy se při tvorbě a stabilizaci pивní pěny značně lišily. Proteiny se střední až vyšší molekulární hmotností ($M_r = 10\,000$ – $100\,000$) při kombinaci s hořkými kyselinami tvořily více povrchově aktivní komplexy, což dopomáhalo ke zvýšení stability pивní pěny. Proteiny s nižší molekulovou hmotností naopak tyto sloučeniny tvořily poměrně málo. Tvzení je podpořeno tím, že proteiny o středních a vyšších molekulových hmotnostech tvořily dané komplexy s isohumulony častěji z důvodu vyššího obsahu ε-amino skupin lysinu, které elektrostaticky interagovaly právě s kyselými skupinami izomerovaných α-hořkých kyselin [46, 47]. Roberts (1976) následně na základě kalorimetrie tvrdí, že isohumulony s proteiny obsaženými v pивu sice interagují, ale poměrně slabě, pravděpodobně jsou interakce hydrofobní a vodíkové. Zároveň říká, že je nepravděpodobné, aby hořké kyseliny vykazovaly nějakou specifitu vůči jednotlivým proteinům [48].

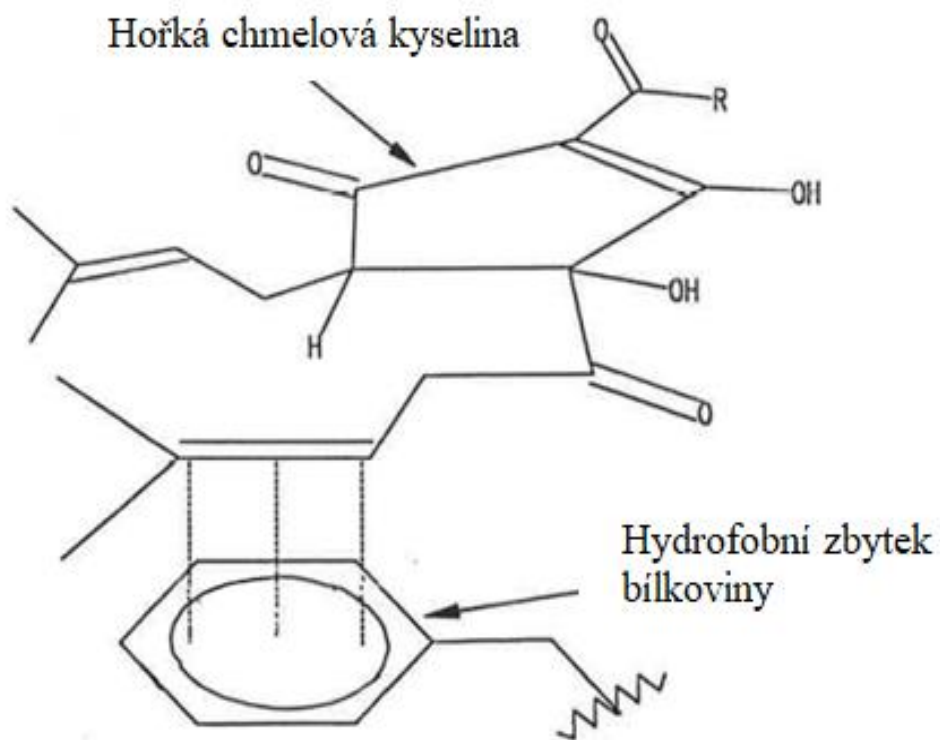


Obrázek 16: Model pивní pěny podle Asana a Hashimota [49]

Simpson a Hughes (1994) navrhli nový model struktury pивní pěny, který spočívá v reverzibilní vazbě proteinů na hořké chmelové kyseliny. V tomto modelu jsou proteiny propojeny vzájemně přes hořké kyseliny a kovový kation. Model vychází z předpokladu, že interakce mezi jednotlivými komponentami struktury nejsou iontové povahy, jelikož kovové kationty jsou schopny se vázat jak na ionizovanou, tak na neionizovanou formu chmelových kyselin. Na jednom dvojmocném kationtu kovu musí být navázány dvě molekuly izomerovaných hořkých kyselin, což následně zvýší afinitu hořké kyseliny k aminoskupinám proteinů. I když pro tento model pивní pěny není nutný záporný náboj na hořké kyselině, kladný náboj na aminoskupinách proteinů je naopak důležitý – pokud by byl kladný náboj nějakým způsobem eliminován (např. acetylací nebo zvýšením pH), interakce mezi proteinem a izomerovanou hořkou α -kyselinou by byla přerušena. Simpson a Hughes navíc uvádí, že interakce mezi hořkými kyselinami a proteiny jsou dvojího typu. První je interakce aminoskupiny proteinu s hořkou kyselinou na základě ion-dipólové vazby, druhá možnost stabilizace pивní pěny probíhá pomocí hydrofobní vazby postranních řetězců hořkých kyselin a hydrofobních zbytků aminokyselin [45, 49].



Obrázek 17: Struktura píví pěny podle Simpsona a Hughese [44]

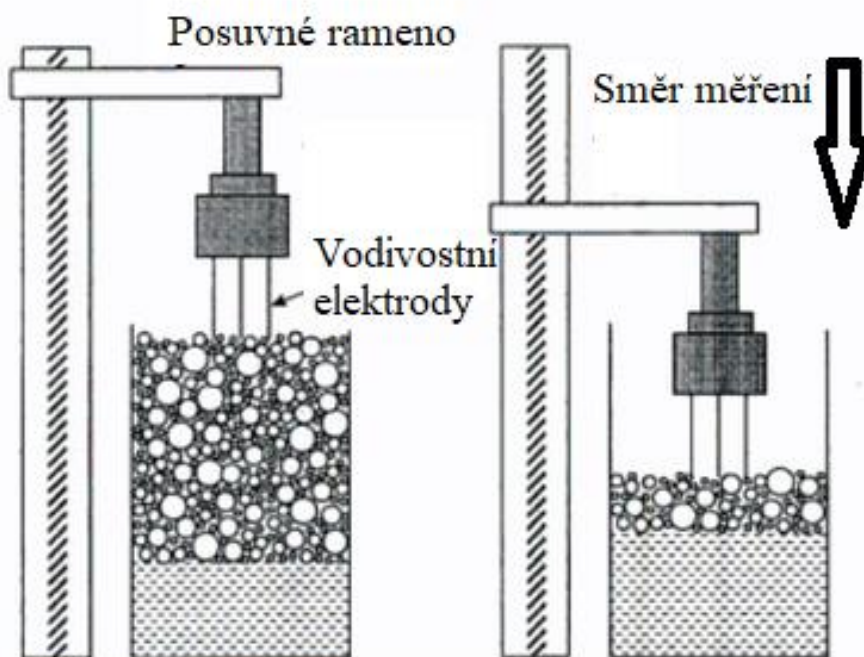


Obrázek 18: Hydrofobní interakce stabilizující píví pěnu [49]

2.4 Metody pro analýzu parametrů piva

2.4.1 NIBEM

NIBEM je metoda měření stability pивní pěny založena na měření vodivosti, kterou je sledován interval poklesu hladiny pивní pěny o 10, 20 a 30 mm v závislosti na čase. Pivo je nejdříve napěněno za pomoci trysky do kyvety, vzorek je následně umístěn pod měřicí elektrody přístroje. Měření začíná až v době, kdy pěna klesne o 10 mm pod okraj kyvety a následně je měřen pokles hladiny pивní pěny o dalších 30 mm, celkový nutný pokles je tedy 40 mm od okraje kyvety. Měření poklesu hladiny pивní pěny je měřeno pomocí systému elektrod. Centrální elektroda je zanořena v pěně, pomocí ostatních elektrod je sledován pokles hladiny pивní pěny směrem dolů. V případě, že hladina pивní pěny klesne a kontakt mezi elektrodami je přerušen, soustava elektrod klesá až do doby, dokud opět nejsou všechny elektrody v kontaktu s hladinou pивní pěny a cyklus je opakován. Pro reprodukovatelný odběr vzorku pивní pěny je používán rozpěňovač. Varianty přístroje NIBEM-T a NIBEM-TPH měří navíc teplotu, resp. teplotu, atmosférický tlak a vlhkost vzduchu, které slouží ke korekci naměřených hodnot propadu pивní pěny [50, 51, 52].



Obrázek 19: Schéma metody NIBEM [50]

2.4.2 Iontová chromatografie

Chromatografie je separační technikou, která spočívá v interakcích analytu se stacionární fází (náplní kolony) a mobilní fází (rozpouštědlem), ke které má specifickou afinitu. V průběhu separace je analyt unášen pomocí mobilní fáze chromatografickou kolonou a na základě difúze reaguje s fází stacionární [53].

Iontově-výměnná chromatografie je analytická technika určená pro separaci a determinaci rozdílně nabitých nebo ionizovatelných sloučenin. Stacionární fáze obvykle bývá vyrobena z inertního organického materiálu s ionizovatelnými funkčními skupinami, které nesou přemístitelné opačně nabitě ionty. Mobilní fází bývá vodný pufr. Ve stavu rovnováhy mezi

mobilní a stacionární fázi se nacházejí tzv. protiionty. Iontoměniče s negativně nabitou funkční skupinou, které vážou pozitivně nabité protiionty, jsou nazývány katexy. Anexy jsou naopak nabitě kladně a vážou záporně nabité protiionty. Separační mechanismus je založen na elektrostatických přitažlivých silách mezi opačně nabitými skupinami analytu a stacionární fází [54].

Nejčastěji používanými detektory v iontově-výměnné chromatografii jsou detektory vodivosti, které poskytují vysokou citlivost u vzorků s výrazně nižší vodivostí elučního činidla. Pokud nemá eluční činidlo výrazně nižší vodivost než analyzovaný vzorek, mělo by být schopno převedení na neiontovou formu pomocí tlumicího systému. V některých případech mohou být použity i UV detektory [54].

2.4.3 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

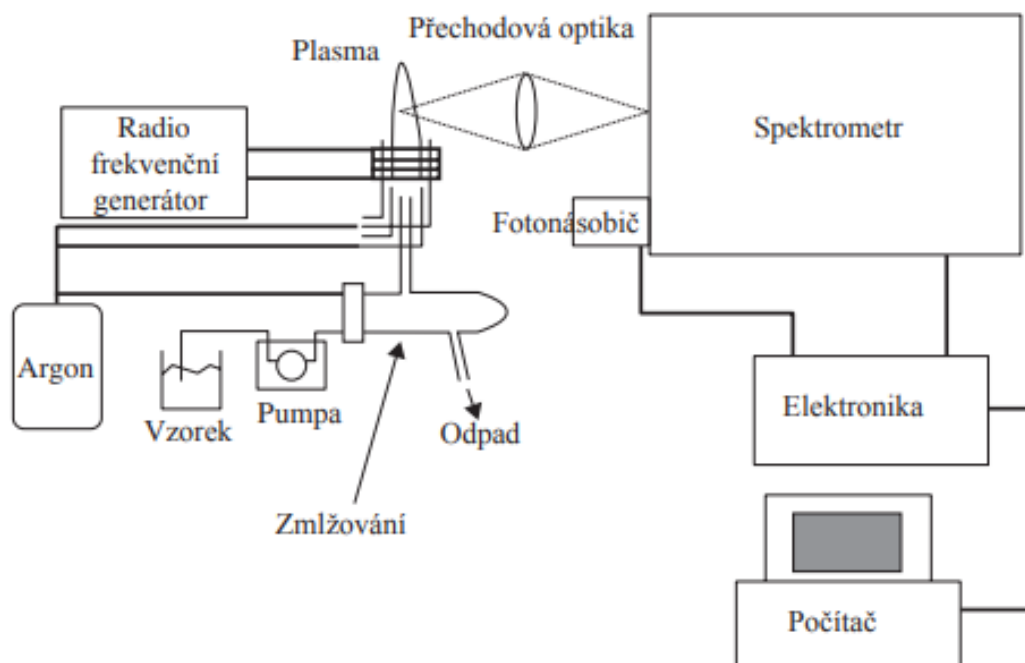
ICP-OES je metodou prvkové analýzy, která spočívá v měření čárových spekter vznikajících při přechodu elektronů z vyšší energetické hladiny do základního stavu. K atomizaci, ionizaci a uvedení vzorku do excitovaného stavu je využito plazma o teplotě až 10 000 K. Plazma je ionizovaný elektroneutrální plyn s vysokou elektronovou hustotou [55, 56].

Kapalně vzorky je nejprve nutno převést zmlžovačem do formy aerosolu, který je složen z co nejmenších kapek, které by bylo možno reprodukovatelně desolvatovat, odpařit, atomizovat, ionizovat a excitovat. Nejvíce používaným typem zmlžovače je zmlžovač pneumatický, který k tvorbě aerosolu využívá vysokorychlostní proud plynu. Pneumatické zmlžovače se dělí do tří skupin – koncentrický, cross-flow a Babingtonův. Dalším typem zmlžovače pro ICP-OES je ultrazvukový zmlžovač, který k tvorbě aerosolu využívá oscilační piezoelektrický snímač [55].

K transportu vzniklého aerosolu do hořáku slouží mlžná komora, jejímž primárním účelem je odstranění velkých kapek z aerosolu. Mlžná komora propouští kapénky o průměru 10 μm a menší, což je asi 1–5 % ze všech vzniklých kapek. Zbývající množství je převedeno do odpadu [55, 56].

Hořák je složen ze tří koncentrických trubic. Vnitřní trubice zajišťuje přívod vzniklého vzorku do plazmatu. Vnější a střední trubici tangenciálně proudí chladicí a pomocný plyn, který má za úkol ochlazovat křemenné stěny hořáku a následně podporovat tvorbu plazmatu, jehož vznik a udržení zajišťuje radiofrekvenční generátor o síle 700–1500 W [56, 57].

Vzniklé záření se následně měřeno axiálně nebo radiálně směrem k plazmatu, některé přístroje umožňují snímání z obou směrů. Separaci vlnových délek následně zajišťuje disperzní systém (monochromátory nebo polychromátory). Pro detekci jsou využívány fotonásobiče, případně CCD a CID detektory [56, 57].



Obrázek 20: Schéma ICP-OES

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní pomůcky a vybavení

3.1.1 Seznam chemikálií

Tabulka 3: Seznam použitých chemikálií

Název	Mr [g·mol ⁻¹]	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
(+)-Katechin hydrát	290,27	≥98 %	Sigma-Aldrich	USA	225937-10-0
Dusitan sodný	69,00	p.a.	PENTA, s.r.o.	Česká republika	7632-00-0
Folin-Ciocalteu činidlo	–	–	Sigma-Aldrich	Švýcarsko	–
Hovězí albumin	ca. 67 000	>99.0 %	Serva	Německo	9048-46-8
Hydroxid sodný	40,00	p.a.	PENTA, s.r.o.	Česká republika	1310-73-2
Chlorid hlinitý	133,34	p.a.	PENTA, s.r.o.	Česká republika	7446-70-0
Chlorid sodný	58,44	p.a.	PENTA, s.r.o.	Česká republika	7647-14-5
Isooktan	114,23	p.a.	PENTA, s.r.o.	Česká republika	540-84-1
Kyselina gallová	170,12	>97.5 %	Sigma-Aldrich	Německo	149-91-7
Kyselina chlorovodíková	36,46	36 %	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7647-01-0
Lugolův roztok	–	–	–	–	–
Oxid uhličitý potravinářský	44,01	Potravinářský	Linde Gas a.s.	Česká republika	124-38-9
Síran měďnatý pentahydrát	249,68	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	7758-99-8
Uhličitán sodný bezvodý	105,99	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	497-19-8
Vinan draselno-sodný tetrahydrát	282,10	p.a.	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	6100-16-9

Tabulka 4: Standardy použité pro elementární analýzu pomocí ICP-OES

Název	Mr [g·mol ⁻¹]	Čistota [g·dm ⁻³]	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Vápník	40,078	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-70-2
Draslík	39,0983	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-09-7
Hořčík	24,305	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7439-95-4
Sodík	22,98977	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-23-5
Fosfor	30,973	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7723-14-0
Křemík	28,0855	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-21-3
Hliník	26,98154	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7429-90-5
Baryum	137,33	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-39-3
Kobalt	58,9332	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-48-4
Železo	55,845	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7439-89-6
Mangan	54,93805	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7439-96-5
Nikl	58,6934	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-02-0
Zinek	65,409	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	7440-66-6

Tabulka 5: Standardy použité pro stanovení organických kyselin

Název	Mr	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Kys. citronová	192,124	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	5949-29-1
Kys. mléčná	90,08	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	50-21-5
Kys. octová	60,052	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	64-19-7
Kys. jantarová	118,09	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	110-15-6
Kys. jablečná	134,087	1,000 ± 0,002	Analytika, s.r.o.	Česká republika	617-48-1

3.1.2 Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů

- Rmutovací a mladinová pánev
- Scezovací kád'
- Šrotovník, dvouválcový
- Refraktometr
- Fermentační nádoby 25 l (Grainfather, Nový Zéland)
- Kvasné zátky
- Chladicí zařízení
- Kombinovaný hustoměr a teploměr TILT
- Běžné laboratorní sklo
- Zkumavky plastové, 10 ml
- Centrifugační zkumavky (50 ml)
- Kyvety
- Injekční stříkačky, 10 ml
- Mikrofiltry nylonové (velikost pórů 0,45 μm)
- PET lahve, 1 l
- Uzávěry PET lahví pro sycení oxidem uhličitým
- Předvážky
- Analytické váhy Kern AES 200-4C
- Pasteurovy pipety
- Laboratorní třepačka
- pH metr
- Automatické pipety Finn timer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Špičky Finntip (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ultrazvuk PS03000A Powersonic (PowerSonic s r.o., Slovensko)
- Centrifuga ROTOFIX 32 A (Hettich, Německo)
- NIBEM-T, Foam Stability Tester (Pentair Haffmans, Nizozemsko)
- Inpack 2000 Flasher (Pentair Haffmans, Nizozemsko)
- Inpack 2000 Sampler (Pentair Haffmans, Nizozemsko)
- Pivní analyzátor Anton Paar 4500 M (Anton Paar, Rakousko)
- ICP-OES ULTIMA 2 (Horiba Scientific, Japonsko)
- Iontový chromatograf Metrohm 850 Professional (Metrohm, Švýcarsko)
- UV-VIS Spektrofotometr Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Německo)

3.2 Technologie výroby piva

Pro studium vlivu studeného chmelení na stabilitu pivní pěny bylo připraveno spodně kvašené pivo ležáckého typu. Na výrobu piva byl použit plzeňský slad ze sladovny Rodinného pivovaru Bernard v Rajhradu u Brna, za účelem chmelení referenčního piva byl použit peletizovaný chmel odrůdy Sládek ($\alpha = 7,5$). Připravená mladina byla zakvašena kvasinkami Saflager W-34/70 (Fermentis, Francie). Studené chmelení bylo provedeno aromatickou odrůdou chmele Kazbek ($\alpha = 5,6$).

3.2.1 Rmutování

Rmutování bylo provedeno víceetapovým infuzním způsobem ve rmutovací pánvi. Pro přípravu piva bylo použito 20 kg plzeňského sladu, který byl šrotován pomocí dvouválcového šrotovníku a následně smísen a promíchán se 100 l vody. Podmínky rmutování jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Rmutovací schéma

×	Teplota [°C]	Čas [min]
Kyselinotvorná teplota	38	10
Peptonizační teplota	52	30
Nižší cukrotvorná teplota	62	30
Vyšší cukrotvorná teplota	72	30
Odrmutovací teplota	78	10

Pro ověření úplného zcukření rmutu byla provedena jodová zkouška Lugolovým roztokem. Po odrmutování byl obsah přečerpán do scezovací kádě, kde byl rmut prokypřen a scezován asi 20 minut.

3.2.2 Chmelovar

Získaná sladina byla ze scezovací kádě přečerpána do mladinové pánve, kde byla zahřívána k varu. Chmelení bylo provedeno v časech 90 a 45 minut navážkou 70 g, resp. 65 g peletizovaným chmelem odrůdy Sládek s obsahem 7,5 % α -hořkých kyselin. Navážky chmele byly voleny tak, aby bylo IBU výsledného piva rovno 30. Po dokončení chmelovaru bylo refraktometricky změřeno EPM vzniklý odpar byl kompenzován vodou tak, aby výsledné EPM bylo 12,5 %. Následně byla připravená mladina ochlazená na zákvasnou teplotu, rovnoměrně přečerpána do kvasných nádob.

3.2.3 Kvašení a zrání

Zchlazená mladina byla při zákvasné teplotě 12 °C zaočkována kvasinkami Saflager W-34/70 tak, aby na každý litr mladiny připadlo 0,9 g sušených kvasnic. Primární fermentace byla ukončena po 10 dnech v době, kdy se hustota piva ustálila na hodnotě přibližně 1,021 g·cm⁻³. Poté byl za účelem sedimentace kvasnic a vyčerení piva proveden tzv. cold crashing – pivo bylo po dobu dvou dní ochlazené na 4 °C.

Po cold crashingu bylo pivo stočeno do PET lahví o objemu 1 l, opatřeno syticím uzávěrem, nasyceno na 1,5 bar a uloženo do chladicího boxu s teplotou 7 °C na 30 dní.

3.2.4 Studené chmelení

Studené chmelení bylo realizováno přímo v PET lahvích ve druhé fázi kvašení. Pro účely studeného chmelení byla použita česká aromatická odrůda chmelu Kazbek o $\alpha = 5,6$ %.

Studené chmelení probíhalo v časových intervalech 3, 5 a 10 dní s navážkami 3 a 6 g·l⁻¹. Navážky chmelu byly vloženy do chmelových sáčků, které byly umístěny do PET lahví na stanovenou dobu. Po vložení chmelového materiálu bylo pivo v PET lahvi opět dosyceno na 1,5 bar. Po ukončení procesu studeného chmelení byl chmelový materiál z PET lahví odstraněn a pivo bylo dosyceno na 1,7 bar po dobu sedmi dní. Jako referenční vzorek bylo použito pivo, u kterého nebylo realizováno studené chmelení.

3.3 Specifikace vzorků

Podle postupu uvedeného výše bylo připraveno celkem 24 vzorků piva, u kterých bylo provedeno studené chmelení a 4 vzorky referenční. Pro analýzu piva byly následně využity metody, které budou popsány podrobněji níže. Vzorky byly analyzovány vždy ve dvou opakováních.

Tabulka 7: Seznam analyzovaných vzorků

Označení vzorku	Čas studeného chmelení [dny]	Navážka chmelu [g·l ⁻¹]
V33	3	3
V36	3	6
V53	5	3
V56	5	6
V103	10	3
V106	10	6
REF	×	×

3.4 Použité analytické metody

Pro analýzu vzorků piva bylo použito několik technik. Stabilita pивní pěny byla měřena metodou NIBEM, IBU bylo měřeno pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Spektrofotometricky byl měřen také obsah bílkovin, fenolických látek, flavonoidů a barva piva. Prvková analýza vzorků piva byla provedena metodou ICP-OES, organické kyseliny byly stanoveny pomocí iontové chromatografie. Základní pивní charakteristiky byly stanoveny pomocí pивního analyzátoru.

3.4.1 Stanovení stability pивní pěny metodou NIBEM

Stabilita pивní pěny byla zjištěna pomocí metody NIBEM na zařízení NIBEM-T. Vzorky piva byly na přístroj napojeny přes uzávěr PET lahve, který byl proražen hrotem vzorkovací trubice Inpack Sampleru 2000. Hrot vzorkovací trubice byl spuštěn na dno láhve a následně byl do PET láhve přiveden potravinářský oxid uhličitý o tlaku 3 bar, kterým byl vzorek vytěsněn. Reprodukovatelný odběr pивní pěny byl zajištěn rozpěňovačem Inpack Flasher. Po vytěsnění pěny byla kyveta se vzorkem umístěna do přístroje NIBEM-T a byl měřen čas, během kterého klesla hladina pивní pěny o 30 mm. Princip měření stability pивní pěny je popsán v kapitole 2.4.1.

3.4.2 Stanovení hořkosti piva

Hořkost piva byla stanovena metodou EBC 9.8. Vzorky piva byly odplyňovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Pro analýzu bylo pipetováno 10 ml vzorku piva do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml, vzorek byl okyselen 1 ml 3 mol·l⁻¹ HCl a bylo přidáno 20 ml isooktanu. Směs byla následně protřepávána po dobu 5 minut. Vzniklá emulze byla 5 minut centrifugována při 5 000 ot·min⁻¹, supernatant byl pipetován do křemenné kyvety a jeho absorbance byla následně měřena proti isooktanu při 275 nm. Hodnota IBU byla následně vypočítána podle vztahu:

$$\text{IBU} = A_{275} \cdot 50 \quad (5)$$

3.4.3 Stanovení obsahu bílkovin Hartree-Lowryho metodou

Před analýzou bylo pivo odplyňováno po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni. Do zkumavky bylo pipetováno 50 µl vzorku piva, které bylo doplněno fyziologickým roztokem na 3 ml. Ke směsi bylo přidáno 5 ml roztoku 1 a směs se nechala 10 minut odstát. Po uplynutí 10 minut bylo přidáno 0,5 ml roztoku 2, směs byla protřepána a ponechána dalších 10 minut při

laboratorní teplotě. Absorbance vzorku byla měřena spektrofotometricky při 650 nm. Roztok 1 byl připraven z 50 ml 2% Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH + 2 ml 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ v 1% vínanu sodno-draselném, roztok 2 bylo 3x zředěné Folin-Ciocalteu činidlo. Kalibrační roztok byl připraven z hovězího albuminu v koncentračním rozmezí $0,015 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ – $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Vzorky piva byly odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Pro stanovení TPC byl pipetován 1 ml 10x zředěného Folin-Ciocalteu činidla do zkumavky, objem byl doplněn 1 ml deionizované vody a 100 μl vzorku piva. Směs byla promíchána na vortexu a ponechána v klidu po dobu 5 minut. Poté byl přidán 1 ml 7,5% roztoku Na_2CO_3 a směs byla ponechána 30 minut v temnu. Absorbance byla měřena při 765 nm a výsledek byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové. Kalibrační roztoky kyseliny gallové byly připraveny v rozmezí $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

3.4.5 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Před analýzou byly vzorky odplyňovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Do zkumavek bylo pipetováno 100 μl vzorku piva, které byly doplněny 4 ml deionizované vody. Ke směsi bylo přidáno 0,3 ml 5% NaNO_2 a vzorek byl ponechán 5 minut v klidu. Následně bylo přidáno 0,3 ml 10% AlCl_3 a po další minutě byly přidány 2 ml $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH. Směs byla doplněna 3,3 ml deionizované vody a byla protřepána. Absorbance byla měřena při 510 nm. Kalibrační roztok katechinu byl připraven v koncentračním rozmezí $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ – $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.4.6 Stanovení pH a barvy piva

Vzorky pro stanovení pH piva nebyly před analýzou nijak upravovány, hodnota pH byla měřena pomocí pH metru. Před analýzou barvy byly vzorky piva odplyněny pomocí laboratorní třepačky při $160 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 20 min. Vzorky piva byly přefiltrovány pomocí skládaného filtračního papíru s křemelinou a barva byla následně stanovena spektrofotometricky při 430 nm. Barva piva v jednotkách EBC je vypočtena dle vztahu:

$$\text{Barva EBC} = A_{430} \cdot 25 \quad (6)$$

3.4.7 Analýza prvkového složení pomocí ICP-OES

Před analýzou prvkového složení byly vzorky piva 30 minut odplyňovány v ultrazvukové lázni. Vzorky pro stanovení makroprvků (vápník, hořčík, sodík, draslík, fosfor) byly 25x zředěny demineralizovanou vodou, vzorky pro stanovení mikroprvků (baryum, mangan, zinek, křemík, hliník, nikl, kobalt, měď, železo) byly ředěny 2x. Pro stanovení makroprvků byla sestrojena kalibrační řada v rozmezí $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ – $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v deionizované vodě, kalibrační řada pro mikroprvky byla sestrojena v rozmezí $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ – $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ve 2% ethanolu. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Podmínky měření ICP-OES

×	Makroprvky	Mikroprvky
Výkon [w]	1100	1300
Rychlost otáček čerpadla [ot·min ⁻¹]	15	15
Průtok plazmového plynu [dm ³ ·min ⁻¹]	13,2	13,2
Průtok pomocného plynu [dm ³ ·min ⁻¹]	0,2	0,2
Průtok stínícího plynu [dm ³ ·min ⁻¹]	0,59	0,25
Průtok zmlžovače [ml·min ⁻¹]	0,84	0,84
Tlak ve zmlžovači [bar]	2,99	2,99
Zmlžovač	Pneumatický dle Meinharda	
Detektor	Fotonásobič	

Tabulka 9: Vlnové délky použité při ICP-OES

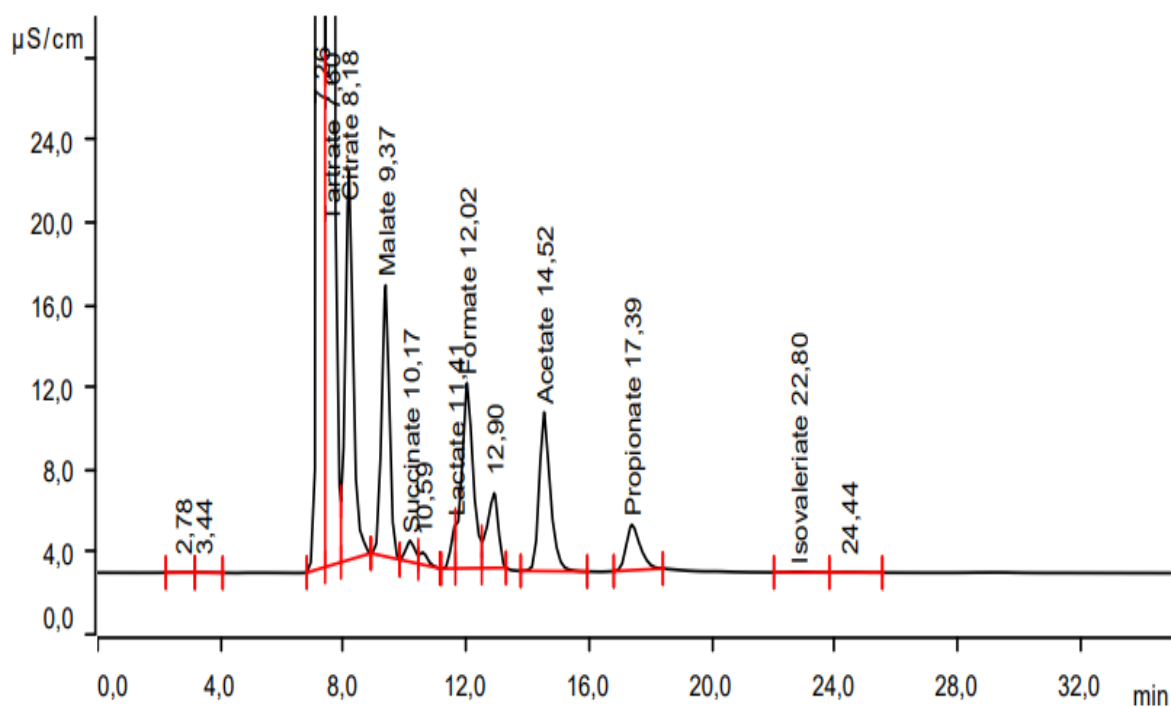
Prvek	Vlnová délka [nm]
Vápník	422,673
Draslík	766,490
Hořčík	285,213
Sodík	588,995
Fosfor	214,914
Hliník	396,152
Baryum	230,424
Kobalt	228,616
Měď	327,396
Železo	259,940
Mangan	257,610
Nikl	221,647
Křemík	251,611
Zinek	206,191

3.4.8 Stanovení organických kyselin pomocí iontové chromatografie

Před analýzou organických kyselin byly vzorky piva odplyňovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Odplyněné vzorky byly následně přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry s velikostí pórů 0,45 μm . Následně bylo 5 ml vzorku pipetováno do zkumavky a množství bylo doplněno 5 ml deionizované vody. Z organických kyselin byla sledována kyselina citronová, kyselina jablečná, kyselina jantarová, kyselina mléčná a kyselina octová. Retenční čas kyseliny citronové byl 8,12 min, kyseliny jablečné 9,3 min, kyseliny jantarové 10,11 min, kyseliny mléčné 11,58 min a retenční čas kyseliny octové byl 14,47 min. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Podmínky měření IC

Objem nástriku	20 μl
Průtok mobilní fáze	0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Složení mobilní fáze	0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HClO_4
Teplota	30 $^{\circ}\text{C}$
Kolona	Metrosep Organic Acids 250/7,8
Detektor	Vodivostní



Obrázek 21: Chromatogram vzorku V106

3.4.9 Stanovení základních pivních charakteristik

Vzorky byly před analýzou odplyněny na laboratorní třepačce při 160 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 20 minut. Po odplynění byly vzorky filtrovány přes skládaný filtr s přídatkem křemeliny. Následně byly převedeny do kyvet o objemu 50 ml a vloženy do autosamploru pivního analyzátoru. Sledovanými parametry byl zdánlivý, původní a skutečný extrakt a obsah alkoholu v hmotnostních a objemových procentech.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem práce bylo ověřit, jaký vliv má studené chmelení na různé parametry piva a jak ovlivňuje stabilitu pивní pěny. Studené chmelení bylo provedeno aromatickou odrůdou chmelu Kazbek v různých časech a navážkách podle schématu, který je uveden v tabulce 7.

4.1 Vliv studeného chmelení na základní charakteristiky piva

V tabulce 11 jsou uvedeny naměřené hodnoty základních parametrů piva, které byly měřeny vždy ze dvou odpovídajících vzorků. Na základě analýzy rozptylu s hladinou významnosti 0,05 se mezi sebou vzorky v žádném parametru výrazně nelišily. Pomocí korelační analýzy lze vypočítat, že s hodnotou zdánlivého, původního, ale i skutečného extraktu koreluje především navážka chmele ($r > 0,64$), nikoliv však doba studeného chmelení. Naopak je tomu u obsahu alkoholu. Mezi obsahem alkoholu a dobou studeného chmelení byla nalezena středně silná pozitivní korelace ($r > 0,56$), navážka chmelu na obsah alkoholu v pivech neměla významný vliv.

Tabulka 11: Stanovení základních parametrů piva

Vzorek	Zdánlivý extrakt [%]	Původní extrakt [%]	Alkohol [% hm.]	Alkohol [% obj.]	Skutečný extrakt [%]
V33	2,50±0,01	12,66±0,001	4,245±0,001	5,43±0,001	4,46±0,01
V36	2,54±0,01	12,71±0,01	4,26±0,001	5,44±0,01	4,49±0,01
V53	2,47±0,01	12,64±0,01	4,25±0,001	5,43±0,001	4,43±0,01
V56	2,49±0,03	12,69±0,02	4,27±0,01	5,45±0,01	4,45±0,04
V103	2,45±0,03	12,68±0,01	4,28±0,01	5,46±0,01	4,42±0,03
V106	2,53±0,001	12,74±0,04	4,27±0,02	5,45±0,03	4,49±0,001
REF	2,45±0,03	12,63±0,03	4,26±0,001	5,43±0,001	4,41±0,03

Salamon et al. (2022) ve své práci taktéž pozorovali mírný, ale ne statisticky signifikantní nárůst obsahu ethanolu ve studeně chmelených pivech. V článku uvedená koncentrace alkoholu dosáhla maxima po 22 hodinách studeného chmelení, následně ale klesala [58]. Oladokun et al. (2017), který se ve své práci věnoval porovnávání studeného chmelení při teplotách 4 °C a 19 °C s různě hořkými odrůdami chmele, taktéž prezentuje, že během studeného chmelení dochází ke zvýšení hladiny ethanolu v pivu, a to zejména při vyšší teplotě studeného chmelení. Tento pozvolný nárůst obsahu alkoholu zdůvodňuje mírným výskytem monosacharidů (přibližně 2%) v chmelu, které se mohou v závislosti na množství již obsaženého alkoholu a množství přidaného chmele extrahovat do piva. Takto extrahované monosacharidy by mohly být využity kvasinkami pro další produkci ethanolu [59]. Nárůst obsahu alkoholu u studeně chmelených piv byl sledován i Forsterem (2013), který se věnoval novým německým odrůdám chmelu [60]. Z výsledků práce vyplývá, že pokud je studené chmelení provedeno při nízké teplotě, bude mít na zvyšující se obsah alkoholu větší vliv doba studeného chmelení než dávka přidaného chmelu.

4.2 Vliv studeného chmelení na barvu piva

Výsledky měření barvy piv jsou uvedeny v tabulce 12. Z naměřených dat je patrné, že vzorky, u kterých bylo provedeno studené chmelení, vykazují nárůst barvy v průměru o 2,4 jednotek EBC. Barva a čírost piva jsou jedny z jeho základních senzorických charakteristik, které mohou podvědomě ovlivnit přístup degustátora ke vzorku. Analýzou rozptylu bylo následně zjištěno, že sledované vzorky se od reference významně odlišují ($p < 0,003$).

Tabulka 12: Naměřené hodnoty barvy piva

Vzorek	Barva [EBC]
V33	12,7±0,3
V36	13,2±0,5
V53	12,3±0,4
V56	13±0,01
V103	12,9±0,1
V106	12,7±0,2
REF	10,4±0,3

Se zvýšením barvy vzorků piv pozitivně korelovala jak doba studeného chmelení, tak i navážka použitého chmelu ($r = 0,52$; resp. $0,80$). Jelikož u piv nebyla provedena žádná postfermentační úprava (filtrace a pasterizace), mohlo ke zvýšení absorbance při měření barvy dojít přítomností zbylých kvasinek, případně vlivem vzniklého zákalu. Ten je způsobován vyšším obsahem fenolických látek, jejichž obsah v připraveném pivu taktéž výrazně roste s časem i navážkou. Fenolické látky se v pivu přímo podílí na tvorbě koloidních zákalů, případně mohou být oxidativně polymerizovány na sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností, které nadále interagují s proteiny právě za vzniku zákalu pomocí slabých nekovalentních vazeb [61]. Čejka et al. (1983) uvádí, že barva piva vzroste právě o jednu jednotku EBC s každými 2,15 EBC jednotkami zákalu [65]. Zvýšení barvy přibližně o jeden bod EBC i zvýšení zákalu u studeně chmelených piv pozorovali i Gerhards et al. (2020), kteří prováděli studené chmelení za teploty 11–12 °C a 15–16 °C [67].

4.3 Vliv studeného chmelení na pH piva

Z dat uvedených v tabulce 13 je patrné, že s přidávkou chmelu došlo k mírnému, nikoli však statisticky významnému nárůstu hodnoty pH studeně chmelených piv oproti referenčnímu vzorku. Nárůst pH vykazoval střední pozitivní korelaci ($r > 0,59$) s vyšší navážkou chmele, doba studeného chmelení neměla na hodnotu pH významný vliv.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty pH piva

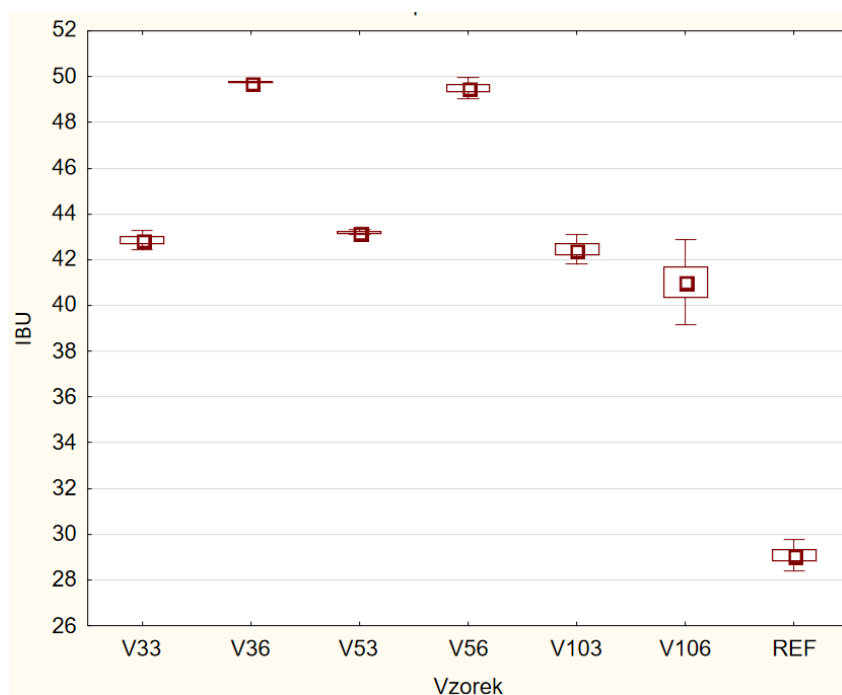
Vzorek	pH
V33	4,61±0,01
V36	4,63±0,001
V53	4,60±0,001
V56	4,65±0,01
V103	4,58±0,02
V106	4,64±0,001
REF	4,59±0,06

Lafontaine a Shellhammer (2018) sledovali při studeném chmelení při teplotách v rozmezí 13,3–15 °C lineární nárůst pH přibližně o 0,14 s každými přidanými 386 g chmele na hektolitr piva nezávisle na pivním stylu a odrůdě chmelu [33]. Obdobných výsledků dosáhl při svých experimentech taktéž Hauser et al. (2019) [64]. Dalšího potvrzení tohoto jevu dosáhl Oladokun (2017), a to jak při provedení studeného chmelení za teploty 4 °C, tak u experimentu, který probíhal při 19 °C s různými odrůdami chmele [59]. Naopak Gerhards et al. (2020) nepozorovali prakticky žádnou změnu pH při provedení studeného chmelení jak za nízké, tak za vyšší teploty [67].

Hodnota pH piva může ve výsledném pivu ovlivňovat senzorické vnímání hořkosti a může taktéž pozitivně ovlivňovat stabilitu iso- α -hořkých kyselin v průběhu skladování piva [59]. Zvýšení hodnoty pH může taktéž vést ke zvýšení chuťové stability piva během skladování a taktéž může maskovat některé nežádoucí chuťové vjemy [33].

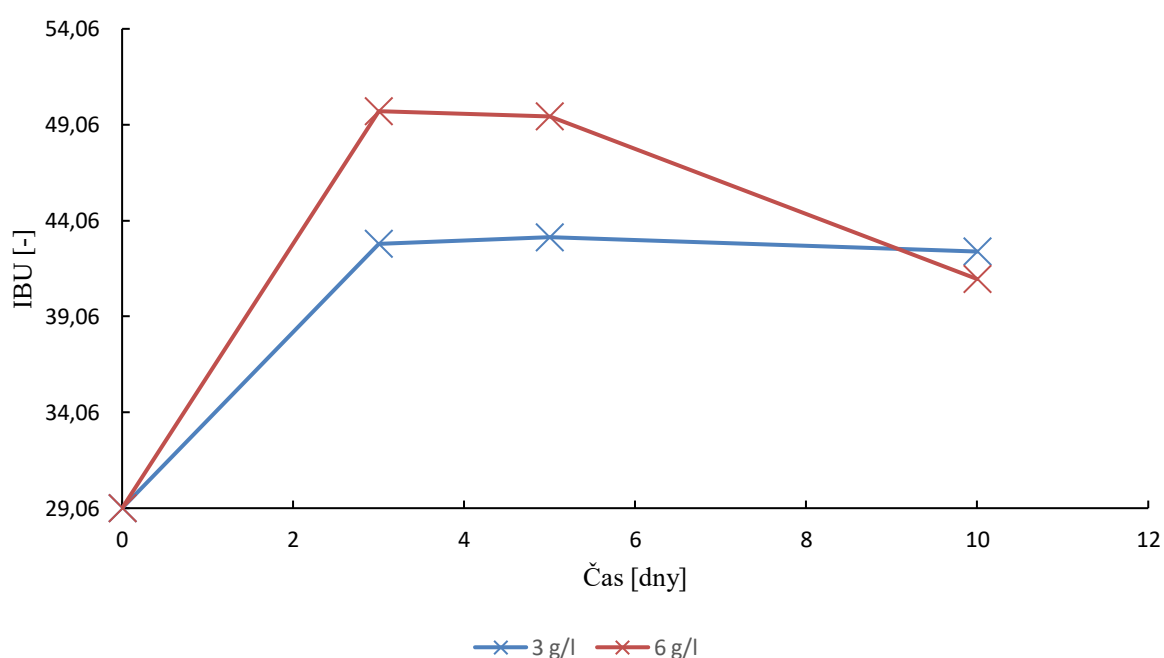
4.4 Vliv studeného chmelení na IBU piva

IBU definují celkovou hořkost piva. Z obrázku 22 je patrné, že ke zvýšení IBU oproti referenčnímu pivu došlo u všech pozorovaných vzorků.



Obrázek 22: Boxový graf IBU ve vzorcích piva

Na zvýšení IBU měla nejvyšší vliv navážka použitého chmele ($r > 0,84$), čas studeného chmelení však z hlediska hořkosti nevykazoval zásadní roli. U všech vzorků, u kterých bylo provedeno studené chmelení $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, byl pozorován nárůst v průměru o $13,8 \pm 0,3$ jednotek hořkosti a vzorky se mezi sebou hořkostí nelišily. V případě vzorků, které byly chmeleny $6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, došlo k výraznému nárůstu jednotek hořkosti jen v případě provedení studeného chmelení v časech 3 a 5 dní, a to průměrně o $20,6 \pm 0,2$ IBU. U vzorku, u kterého bylo provedeno studené chmelení $6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 10 dní, byla hodnota IBU zvýšena o $12,0 \pm 0,7$, jednalo se tak o nejnižší zaznamenaný nárůst hořkosti oproti referenčnímu pivu. Pokles hořkosti je pravděpodobně spojený se snížením obsahu iso- α -hořkých kyselin v důsledku adsorpce těchto látek na přidaný chmelový materiál [68]. Na obrázku 23 je zaznamenán sledovaný vývoj IBU po přidání různých navážek chmelu v závislosti na čase. Hodnota IBU u vzorků chmelených $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ byla v průběhu doby konstantní, při vyšší navážce hodnota IBU s časem klesala.

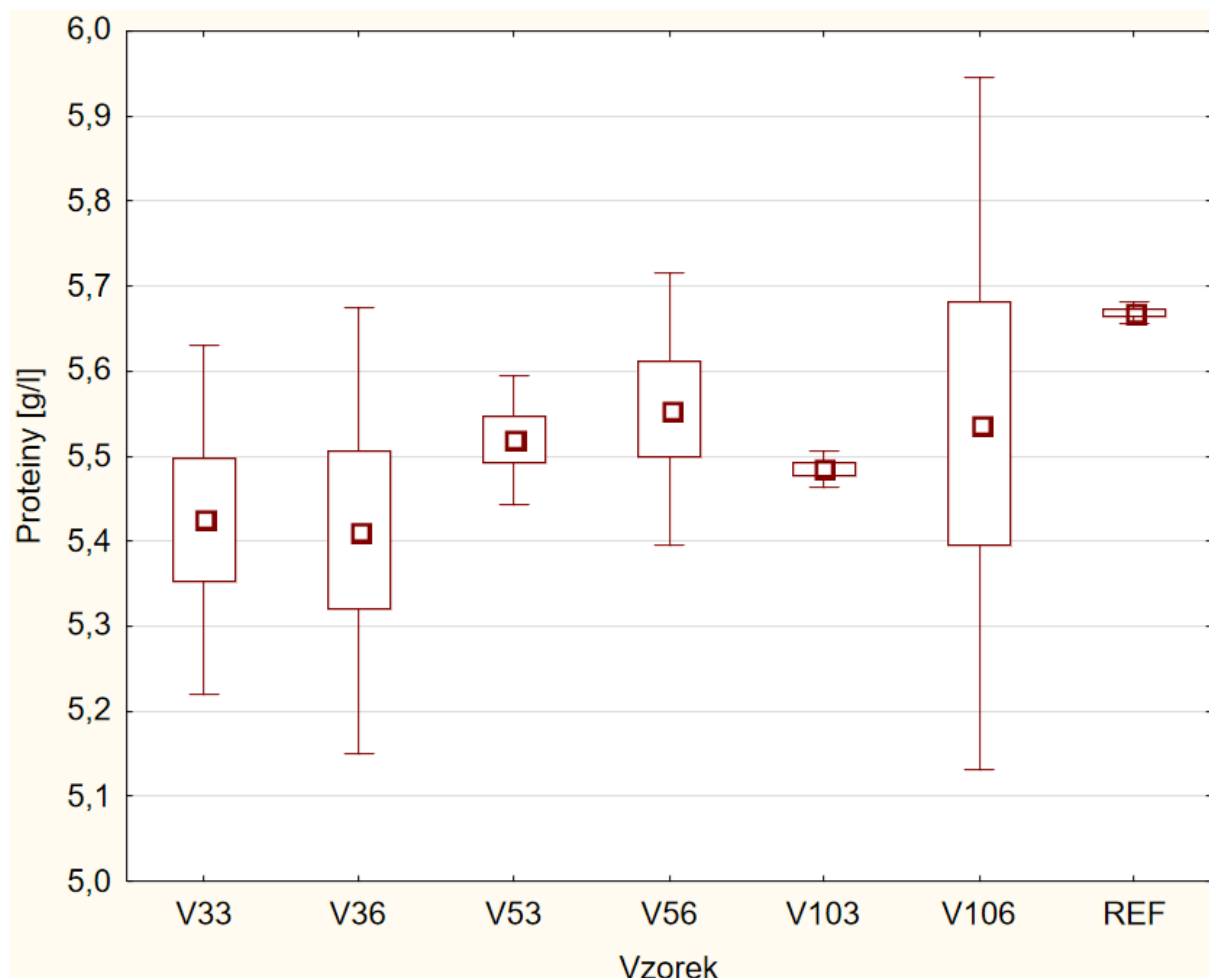


Obrázek 23: Vývoj IBU v čase

Na senzorické hořkosti piva se kromě iso- α -hořkých kyselin podílí i α -hořké kyseliny, humulinony a chmelové polyfenoly. Parkin a Shellhammer (2017) uvádí, že při studeném chmelení dochází k senzorickému i analytickému nárůstu hořkosti u piv. Tvrdí, že senzorická hořkost piv byla zvýšena především kvůli vyššímu obsahu extrahovaných humulinonů a polyfenolů, nikoli však kvůli iso- α -hořkým kyselinám a α -hořkým kyselinám. Zároveň taktéž uvádí pozorovaný pokles iso- α -hořkých kyselin ve studeně chmelených pivech [69]. Lafontaine (2018) předpokládá, že k nárůstu jednotek hořkosti měřených jako sumě obsahu humulinonů a iso- α -hořkých kyselin u studeně chmelených piv může docházet i vlivem extrakce chmelových polyfenolů [33].

4.5 Vliv studeného chmelení na obsah proteinů v pivu

Z obrázku 23 je patrné, že obsah proteinů ve vzorcích piva se pohyboval v rozmezí 5,3–5,7 g·l⁻¹. Nejvyšší koncentrace bílkovin byla zaznamenána v referenčním vzorku. Piva chmelená za studena vykazovala v průměru pokles koncentrace bílkovin. Kvůli vysoké variabilitě v koncentraci bílkovin v paralelních vzorcích však nebyl prokázán signifikantní vliv studeného chmelení na obsah proteinů v pivu ($p = 0,34$).

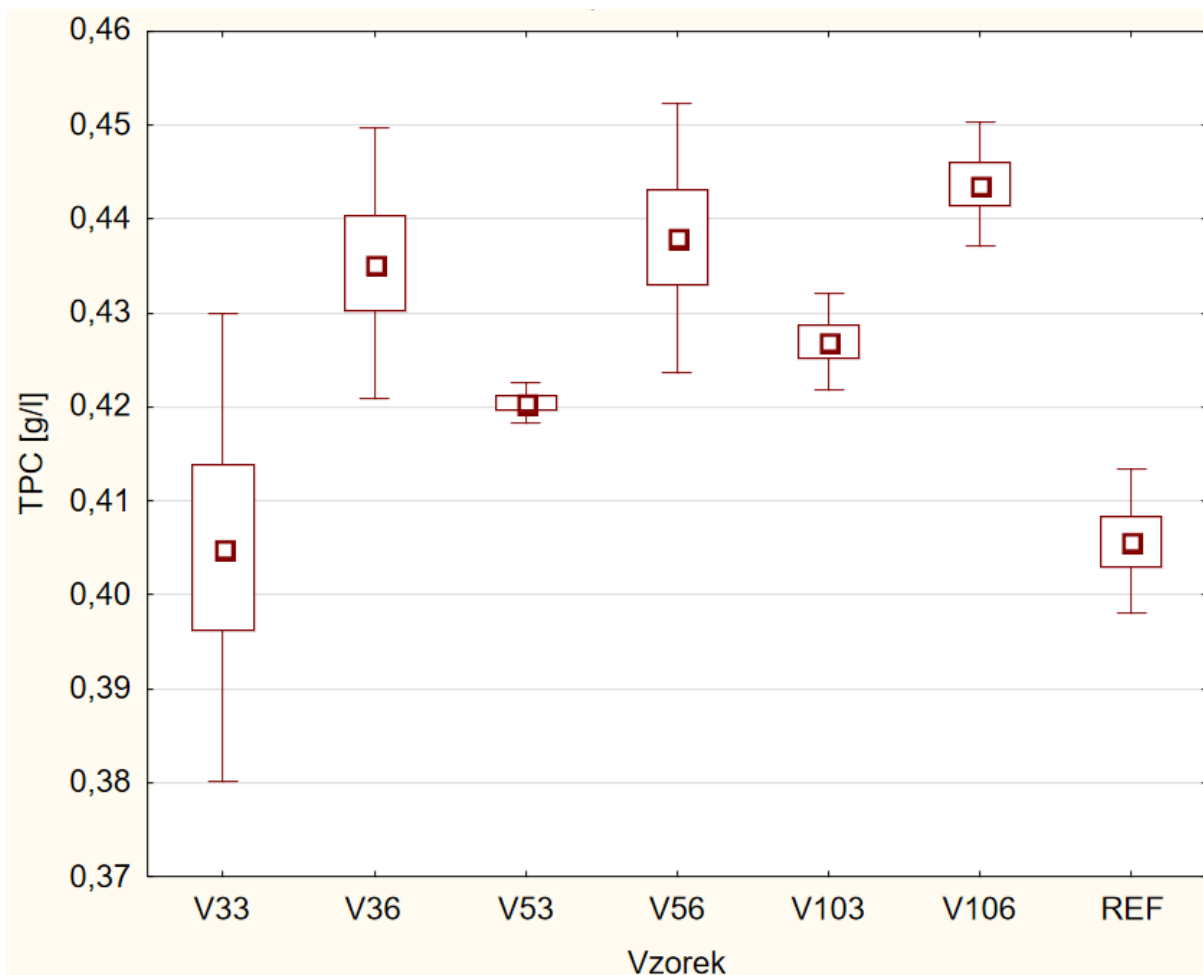


Obrázek 24: Boxový graf obsahu proteinů ve vzorcích piva

Proteiny se do piva dostávají především ze sladu. Jedná se o jednu ze složek, která společně s hořkými chmelovými kyselinami a některými kovovými kationty vytváří strukturu pивní pěny [6]. Obsah proteinů v indických pivech ležáckého typu byl v práci Pai et al. pozorován v rozmezí 2,04–5,41 g/l [62]. Anger et al. sledovali přibližně 2,0–5,5 g/l [63]. Obsah proteinů v pivu je ovlivněn množstvím vstupních surovin a taktéž závisí na stylu piva. Piva připravená v rámci diplomové práce se obsahem proteinů přibližují pivům, která byla zkoumána zahraničními autory.

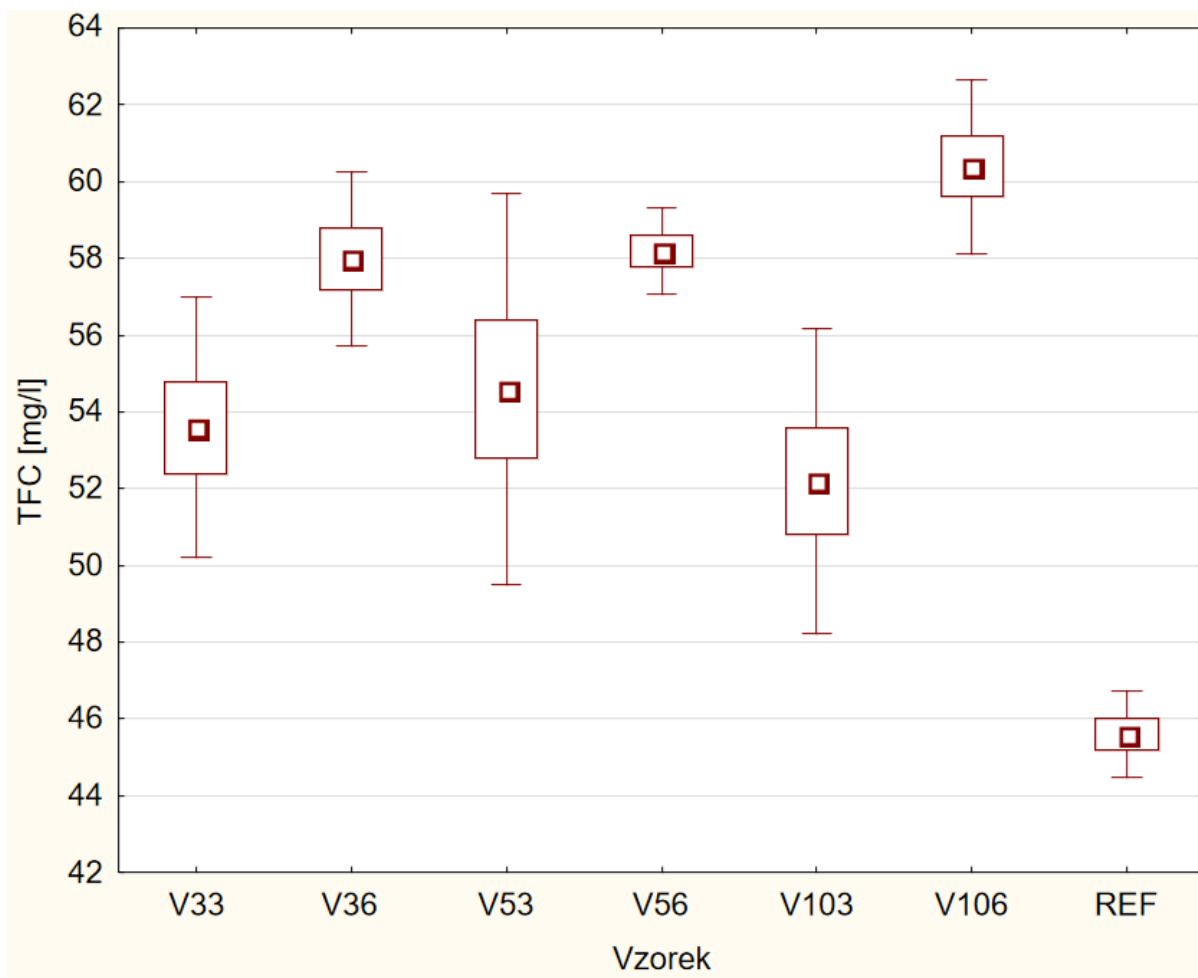
4.6 Vliv studeného chmelení na obsah fenolických látek

Podle dat uvedených na obrázku 25 docházelo k nárůstu obsahu fenolických látek ve studeně chmelených vzorcích oproti referenčnímu pivu. Množství fenolických látek vykazovalo střední pozitivní korelaci s dobou studeného chmelení ($r = 0,61$) a silnou pozitivní korelaci s navážkou chmelu ($r = 0,84$).



Obrázek 25: Boxový graf obsahu fenolických látek ve vzorcích piva

Významnou skupinou fenolických látek v pivu jsou flavonoidy. Z dat uvedených na obrázku 26 vyplývá, že ve všech sledovaných vzorcích studeně chmeleného piva došlo i ke statisticky významnému nárůstu podílu celkových flavonoidů oproti referenci. Patrná je především výrazná pozitivní korelace s množstvím přidaného chmele ($r > 0,94$), důležitá je ale i středně silná pozitivní korelace s časem studeného chmelení ($r = 0,51$).



Obrázek 26: Boxový graf obsahu celkových flavonoidních látek ve vzorcích piva

S obsahem fenolických látek souvisí i celková antioxidační aktivita piva, která dokáže ovlivňovat jeho kvalitu a koloidní stabilitu v průběhu skladování. Z chmelových látek se v pivu nachází flavonoidy jako např. xanthohumol a prenylové flavonoidy, ze sladových látek jsou to fenolové kyseliny a sladové flavonoidy. Konečné množství těchto látek v pivu je ovlivněno původem použitých surovin, jejich posklizňovými úpravami a technologií výroby piva [63, 73]. Mimo fenolické sloučeniny, které dle Paszkot et al. (2021) ovlivňují antioxidační aktivitu až z 88 %, ovlivňují tento parametr ještě melanoidiny, které vznikají při hvozdní slad [73, 78]. Vztahem mezi antioxidační aktivitou a množstvím fenolických látek a melanoidinů se zabýval Gomez et al. (2020), kteří pozorovali nejvyšší antioxidační aktivitu v pivech černých, následně svrchně kvašených, ležáckých a následně nealkoholických [73]. Paszkot et al. (2021) sledovali vliv studeného chmelení u tmavých piv na jejich antioxidační aktivitu a množství celkových polyfenolů. Tmavá piva, u kterých probíhalo studené chmelení při 18 °C po dobu 7 dní za použití 4 různých odrůd chmelu, vykazovala zřetelně vyšší množství xanthohumolu než běžná komerčně dostupná piva a vzájemně se lišila i mezi sebou, a to jak v množství polyfenolů, tak v antioxidační kapacitě [78]. Wang et al. (2022) také sledovali rozdíly mezi studeně chmelenými a běžnými pivy z hlediska obsahu flavonoidů a polyfenolů a jejich vlivu na antioxidační aktivitu. Podobně jako v předchozím případě potvrzují silnou korelaci mezi obsahem xanthohumolu, polyfenolů a antioxidační aktivitou [79].

4.7 Vliv studeného chmelení na prvkové složení piva

Naměřené koncentrace makro- a mikroprvků ve vzorcích piva jsou uvedeny v tabulkách 14 a 15. U všech sledovaných makroprvků kromě křemíku je patrné, že vlivem studeného chmelení došlo k nárůstům jejich koncentrací s časem i navážkou. U pozorovaných mikroprvků došlo s vyšší navážkou a dobou studeného chmelení k nárůstu koncentrace v případě hliníku, barya, mědi a manganu, obsah železa a niklu ve studeně chmelených vzorcích oproti referenčnímu piva klesal.

Tabulka 14: Stanovené obsahy makroprvků ve vzorcích piva

×	Ca (mg/l)	K (mg/l)	Mg (mg/l)	Na (mg/l)	P (mg/l)	Si (mg/l)
V33	24,41±2,95	468,45±7,20	73,34±3,11	23,96±0,32	217,14±2,73	38,49±0,80
V36	28,66±1,52	556,91±25,31	83,54±1,40	23,91±0,26	226,09±4,79	38,82±1,22
V53	28,37±1,75	502,15±19,21	79,22±0,79	23,86±0,09	221,79±4,21	38,71±0,53
V56	27,48±3,31	533,11±9,39	83,38±0,66	22,81±0,10	220,20±6,13	38,57±0,15
V103	23,82±1,25	499,98±20,45	76,72±1,26	23,99±0,20	211,60±1,67	37,49±2,07
V106	30,60±4,00	543,05±15,22	82,10±0,55	22,18±0,25	226,59±10,73	39,36±0,96
REF	14,42±1,07	434,28±25,53	73,39±1,16	21,76±0,11	203,94±6,85	38,70±0,29

Tabulka 15: Stanovené obsahy mikroprvků ve vzorcích piva

×	Al (mg/l)	Ba (mg/l)	Co (mg/l)	Cu (mg/l)	Fe (mg/l)	Mn (mg/l)	Ni (mg/l)	Zn (mg/l)
V33	0,159	0,008	<LOD	0,090	0,009	0,111	0,005	<LOD
V36	0,160	0,012	<LOD	0,139	0,008	0,137	0,006	<LOD
V53	0,157	0,007	<LOD	0,112	0,008	0,107	0,003	<LOD
V56	0,169	0,011	<LOD	0,135	0,008	0,145	0,004	<LOD
V103	0,168	0,009	<LOD	0,113	0,006	0,120	0,005	<LOD
V106	0,173	0,011	<LOD	0,128	0,008	0,156	0,006	<LOD
REF	0,150	0,007	<LOD	0,055	0,011	0,064	0,005	<LOD

Vápník je jedním z nejvíce důležitých prvků během celého procesu výroby piva. Ovlivňuje pH piva, upravuje metabolismus pivovarských kvasinek a je důležitý pro stabilizaci enzymů při kvašení. Jeho vliv na chuť piva je minimální, jeho koncentrace v pivu je v rozmezí 20–15 mg/l [1, 70].

Hořčík upravuje pH podobně jako vápník, jeho přítomnost je důležitá pro správnou funkci kvasinek, působí jako kofaktor mnoha enzymů. Vyšší koncentrace než 30 mg/l jsou příčinou kyselé a hořké chuti [70].

Sodík se v pivu může vyskytovat v rozmezí 75–150 mg/l, při vyšších koncentracích má vliv na slanou chuť piva [70].

Železo se v pivu může vyskytovat ve formě Fe^{2+} , Fe^{3+} nebo ve formě komplexů s organickými sloučeninami, při koncentracích vyšších než 1 mg/l může negativně ovlivňovat

činnost kvasinek. Podobné účinky jako železo má v pivu i měď. Oba prvky by měly být přítomny maximálně v množství 0,1 mg/l [70].

4.8 Vliv studeného chmelení na obsah organických kyselin v pivu

Tabulka 16: Koncentrace organických kyselin ve vzorcích piva

Vzorek	Mléčná (mg/l)	Jablečná (mg/l)	Citronová (mg/l)	Mravenčí (mg/l)	Jantarová (mg/l)	Octová (mg/l)
V33	36,8	206	296	187	21,3	369
V36	60,2	254	322	181	21,2	372
V53	50,8	196	287	174	20,2	352
V56	53,4	237	300	170	19,8	349
V103	43,9	186	248	165	19,3	333
V106	34,4	240	307	183	20,0	354
REF	57,1	171	297	192	23,1	402

V tabulce 16 jsou uvedeny naměřené koncentrace vybraných organických kyselin. Je zřejmé, že oproti referenci došlo ve studeně chmelených vzorcích k nárůstu obsahu kyseliny citronové a jablečné. Nejvyšší nárůst obsahu kyseliny jablečné a citronové byl pozorován u vzorku V36, a to o 83 mg/l, resp. 24 mg/l. Mezi obsahem kyseliny jablečné a navázkou chmelu byla nalezena silná pozitivní korelace ($r = 0,95$), obsah kyseliny citronové s navázkou vykazoval střední pozitivní korelaci ($r = 0,42$). U všech ostatních organických kyselin by zaznamenán pokles. Obsah kyseliny mléčné, mravenčí, jantarové a octové vykazoval negativní korelaci jak s časem, tak i s navázkou použitého chmelu. Obsah uvedených kyselin se v literatuře pohybuje v rozmezí 44–292 mg/l (mléčná), 14–105 mg/l (jablečná), 56–230 mg/l (citronová), 36–166 mg/l (jantarová) a 37–171 mg/l (octová). Z naměřených hodnot je tedy patrné, že piva připravená studeným chmelením obsahují větší množství kyseliny citronové, jablečné a octové, ale výrazně nižší množství kyseliny jantarové a mléčné [71].

Obsah některých organických kyselin je v pivu dán především jejich přítomností v mladině, některé vznikají i během fermentace. Organické kyseliny mají také vliv na výslednou chuť a pH piva [72].

4.9 Stanovení stability pивní pěny

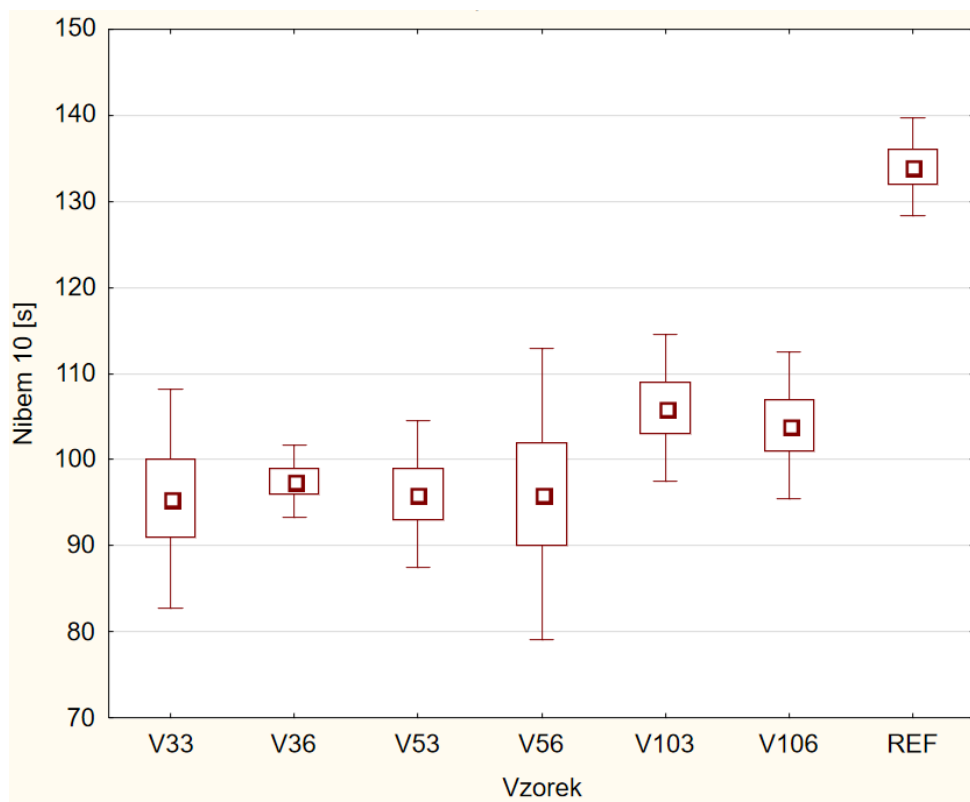
Stabilita pивní pěny byla měřena metodou NIBEM, kterou byl zaznamenán čas, za který se hladina pěny propadla o 10, 20 a 30 mm. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty v tabulce 17.

Tabulka 17: Naměřené hodnoty stability pивní pěny

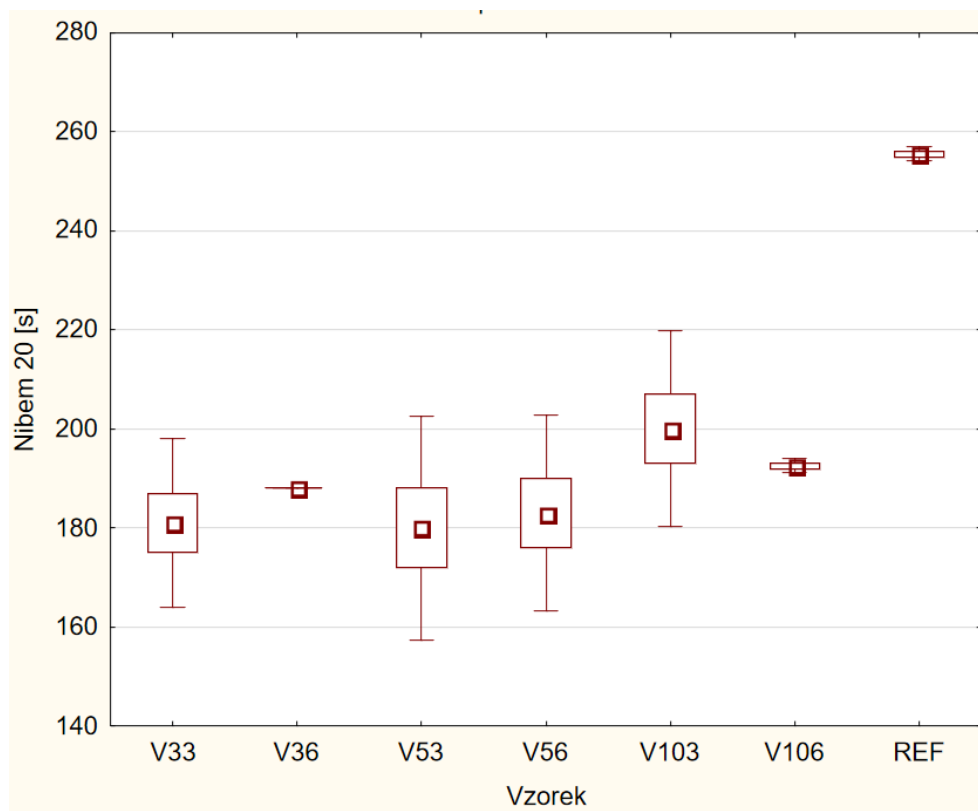
Vzorek	NIBEM 10 (s)	NIBEM 20 (s)	NIBEM 30 (s)
V33	96±5	181±6	252±4
V36	98±2	188±0	266±5
V53	96±3	180±8	244±11
V56	96±6	183±7	258±1
V103	106±3	200±7	273±5
V106	104±3	193±1	256±1
REF	134±2	256±1	352±1

Analýzou rozptylu bylo prokázáno, že studeně chmelené vzorky se od sebe výrazně neliší. Velká odlišnost ve stabilitě pивní pěny je ale patrná při porovnání studeně chmeleného piva a referenčního vzorku (pro všechny hodnoty NIBEM $p < 0,001$). Dále bylo prokázáno, že na stabilitu pивní pěny má v případě studeného chmelení negativní vliv nejen doba studeného chmelení, ale i použitá navážka chmelu. Z korelační analýzy vyplývá, že navážka chmele má konstantní negativní vliv na každý parametr NIBEM ($r = -0,69$). Negativní korelace mezi dobou studeného chmelení a stabilitou pивní pěny se pro každý parametr zvyšovala, $r = -0,34$ pro NIBEM 10, $r = -0,41$ pro NIBEM 20 a $r = -0,51$ pro NIBEM 30. Jelikož nalezený korelační koeficient mezi všemi parametry NIBEM byl $r < 0,94$, docházelo k prakticky konstantnímu propadu pивní pěny u všech pozorovaných vzorků.

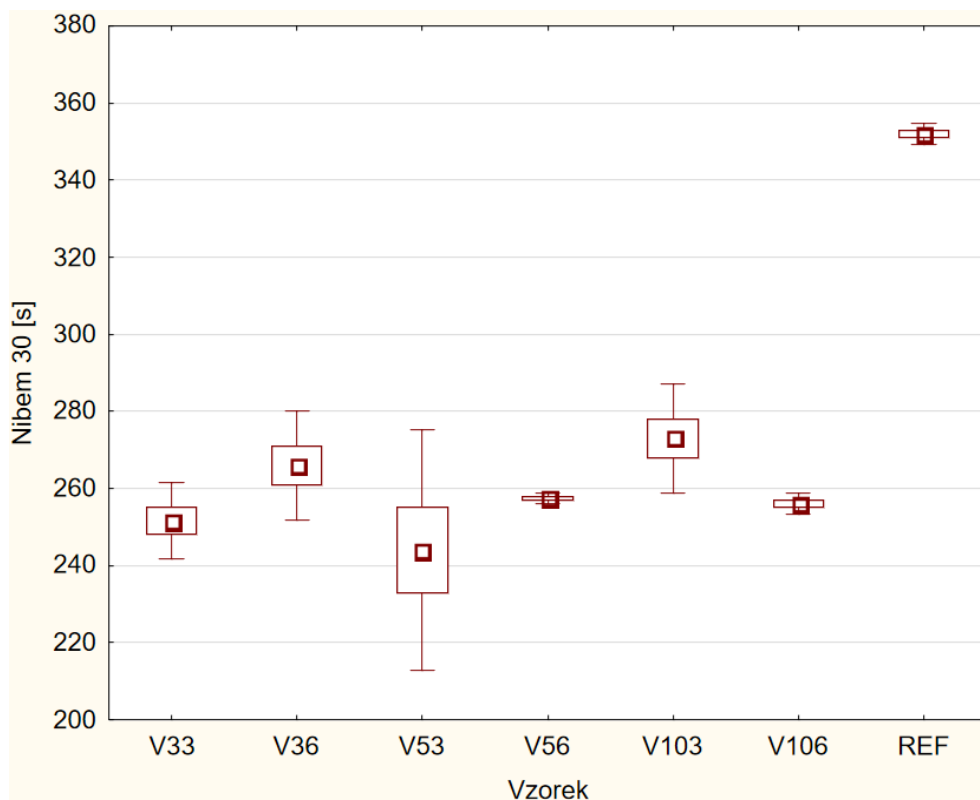
Stabilita pивní pěny (NIBEM 30) byla pozorována několika autory u různých pивních stylů. Wallin et al. (2010) porovnával stabilitu pивní pěny u amerických ležáků a piva typu ale, u kterých byla stanovena stabilita pивní pěny v rozmezí 174–295 s [80]. Ferreira (2003) zkoumal stabilitu pивní pěny u pěti rozdílných pив, kterou změřil v rozmezí 160–310 s [81]. Průměrná hodnota stability pивní pěny u nealkoholických pив byla v práci Gernata et al. (2020) stanovena na 217 s [82]. Evans et al. (2012) sledoval stabilitu pивní pěny u vzorků od 34 různých výrobců pив, u kterých pozorovali stabilitu pěny v rozmezí 211–359 s [83]. Stabilita pивní pěny se odvíjí od použitých vstupních surovin a jejich kvality. I přes rozdílné pивní styly a způsob přípravy vykazují piva připravená v rámci této diplomové práce podobnou stabilitu pивní pěny jako piva zkoumaná zahraničními autory.



Obrázek 27: Boxový graf pro NIBEM 10



Obrázek 28: Boxový graf parametru NIBEM 20



Obrázek 29: Boxový graf parametru NIBEM 30

4.9.1 Vliv hořkosti na stabilitu studeně chmelených piv

Iso- α -hořké chmelové kyseliny ovlivňují nejen chuť piva, ale podílejí se i na tvorbě pивní pěny, jejíž strukturu společně s bílkovinami a některými kovovými kationty tvoří.

Z výsledků uvedených v kapitole 4.4 vyplývá, že se hodnota IBU u všech vzorků vlivem studeného chmelení oproti referenčnímu pivu zvýšila, nicméně nejvyšší stabilita pивní pěny byla naměřena u referenčního vzorku, jehož IBU bylo stanoveno jako nejnižší. Hodnota IBU sledovaná v této diplomové práci vykazovala vysokou negativní korelaci se všemi parametry NIBEM. Korelační koeficient r pro všechny parametry NIBEM dosáhl hodnoty $r \geq -0,80$, což značí silný negativní vliv hořkosti na stabilitu pивní pěny.

Dle studie Evanse et al. (2012), kteří sledovali komerční piva různých stylů od 34 odlišných výrobců, vykazuje parametr NIBEM signifikantní korelaci ($r = 0,595$) s hořkostí piva [77]. Ve své další studii potvrzuje pozitivní vliv IBU na hodnotu NIBEM korelačním koeficientem $r = 0,4$ [86].

Neugrodda et al. (2015) se vzorky 40 piv pozorovali mezi jednotkami hořkosti a stabilitou pивní pěny měřenou metodou NIBEM slabší pozitivní korelaci ($r = 0,33$), pozitivní korelace našel i při měření stability pивní pěny na Steinfurth foam stability testeru, ale ne při měření podle Rosse a Clarka [87].

Korelace mezi jednotkami hořkosti a stabilitou pивní pěny stanovené v této diplomové práci se v porovnání se zahraniční literaturou výrazně liší. Odlišné výsledky s největší pravděpodobností souvisí s různou přípravou piva, jelikož žádný z uvedených autorů se nevěnoval studeně chmeleným vzorkům. U studeně chmelených piv může docházet k adsorpci iso- α -hořkých kyselin na přidaný chmelový materiál, což má za následek relativní snížení stability pивní pěny. Hořkost piva ztrátou iso- α -hořkých kyselin ale nemusí klesat, jelikož z chmelu jsou při studeném chmelení do piva extrahovány α -hořké kyseliny a polárnější humulinony, které absorbují světlo při stejné vlnové délce. Maye et al. (2016)

uvádí, že v průběhu 2–3 dnů studeného chmelení je do piva extrahováno více než 87 % humulinonů [90].

4.9.2 Vliv fenolických látek na stabilitu pивní pěny

Přibližně 70 % fenolických látek, které se nachází v pivu, pochází ze sladu, zbylých 30 % z chmelu [73]. Jejich přítomnost v pivu ovlivňuje kvalitu piva, jeho hořkost a podílí se na plnosti chuti piva [1].

Z výsledků uvedených výše je patrné, že obsah fenolických látek se v pivu zvyšoval s dobou studeného chmelení, ale i s navázkou chmelu. Mezi obsahem celkových fenolických látek a stabilitou pивní pěny byla nalezena nižší negativní korelace pro všechny parametry NIBEM ($r < -0,38$). Flavonoidní látky vykazovaly se stabilitou pивní pěny silnou negativní korelaci ($r < -0,76$).

Názory zahraničních autorů na stabilizaci pивní pěny pomocí fenolických látek se výrazně liší. Bamforth (1999) uvádí, že polyfenoly mohou v pěně působit jako analogy iso- α -hořkých chmelových kyselin, a tím se podílet na zesíťování molekul bílkovin [74]. Dle Asana (1980) se polyfenoly podílí na precipitaci proteinů piva v různých fázích jeho výroby [47]. Mezi obsahem polyfenolů a stabilitou pивní pěny nachází pozitivní korelaci Lewis et al. (2003) [75]. Opačný vztah mezi stabilitou pивní pěny a obsahem polyfenolů dokumentuje Kordialik-Bogacka et al., která mezi stabilitou pивní pěny měřenou metodou NIBEM a obsahem polyfenolů stanovila korelační koeficient ($r = -0,42$) [76]. Evans a Sheehan (2002) u piv s vysokým obsahem polyfenolů (113–309 mg/l) a stabilitou jejich pěny uvádí zápornou korelaci $r = -0,54$ [77]. U piv s nízkou koncentrací polyfenolů (73–212 mg/l) pozoruje Neugrodda et al. (2015) pozitivní korelaci mezi těmito dvěma parametry. Z hlediska stabilizace pивní pěny byla většinou zkoumána pouze suma fenolických látek, nikoli konkrétní fenolické látky. Někteří autoři se domnívají, že u piv s nižším obsahem fenolických látek by mohla stabilita pивní pěny korelovat pozitivně, u piv s vyšším obsahem fenolických látek by tomu mohlo být opačně právě z důvodu účasti fenolických sloučenin na precipitaci proteinů pивní pěny [8], [87].

4.9.3 Vliv bílkovin na stabilitu pивní pěny

Proteiny jsou považovány za jeden z hlavních parametrů podílejících se na stabilizaci pивní pěny. Na stabilizaci pивní pěny se proteiny podílí interakcemi především s iso- α -hořkými kyselinami a některými kovovými kationty.

Mezi obsahem bílkovin a všemi parametry NIBEM byla nalezena středně silná pozitivní korelace $r > 0,50$, což dokazuje kladný vliv bílkovin na tvorbu a stabilizaci pивní pěny. Lewis et al. (2003) uvádí většinou pozitivní korelace mezi různými hmotnostními frakcemi proteinů a stabilitou pивní pěny [75]. Neugrodda et al. (2015) pozoroval pozitivní korelaci vysokomolekulární frakce bílkovin se stabilitou pивní pěny měřenou pomocí zařízení Steinfurth foam tester, podobnou korelaci uvádí však i u měření metodou NIBEM [87]. Evans et al. (2012) pozoroval v závislosti na zvolené metodě měření pивní pěny a celkových bílkovin jak negativní, tak pozitivní vliv [83].

Vliv celkových bílkovin na stabilitu pивní pěny není zcela jednoznačný, jelikož ne všechny bílkoviny působí specificky při tvorbě a stabilizaci pивní pěny. Byla však prokázána existence několika proteinů o několika molekulových hmotnostech, které mají prokazatelně pozitivní vliv jak na tvorbu, tak i na stabilizaci pивní pěny, jedná se o protein Z, LTP1 a některé frakce hordeinů. Obecně mají na stabilitu pивní pěny pozitivní vliv převážně proteiny s hydrofobní strukturou [8].

4.9.4 Vliv prvkového složení na stabilitu pивní pěny

Vysoká variabilita dat z hlediska stabilizace pивní pěny byla pozorována u prvkového složení studeně chmeleného pивa. Bylo zjištěno, že většina sledovaných kovových kationtů ovlivnila stabilitu pивní pěny negativně. Pozitivní korelaci se stabilitou pивní pěny připravených vzorků vykazovaly jen ionty železa ($r > 0,60$) a ionty niklu ($r > 0,92$).

Dle zahraničních autorů je možno rozdělit kovové kationty na 3 skupiny podle jejich afinity k iso- α -hořkým kyselinám. Nejvyšší afinitu vykazují ionty manganu, hliníku, niklu a cínu. Nižší afinita je pozorována u iontů hořčíku, zinku, vápníku a barya, naopak téměř nulovou afinitu k iso- α -hořkým kyselinám vykazují ionty lithia, sodíku a draslíku. Vlivem některých iontů může docházet až k tzv. přepěňování pивa (gushingu) [8]. Kellner et al. (1987) u vápníku nepozoroval významný vliv na stabilitu pивní pěny [84]. Lewis et al. (2003) pozorovali střední korelaci mezi obsahem iontů draslíku, hořčíku, cínu a chromu se stabilitou pивní pěny. U kationtů hořčíku, cínu a chromu se předpokládá, že jsou schopny efektivně zesíťovat molekuly iso- α -hořkých kyselin, a tím zesílit film mezi bublinami pěny [75].

4.9.5 Vliv pH a organických kyselin na stabilitu pивní pěny

Jelikož jsou bílkoviny i hořké chmelové kyseliny látky amfipatické povahy, předpokládá se, že pH bude jedním z parametrů, který bude mít významný vliv na stabilitu pивní pěny.

Při měření nebyl prokázán signifikantní vliv pH na stabilitu pивní pěny ($r < -0,27$). Siebert (2014) u ležáckých pив sledoval schopnost tvorby pěny v rozmezí pH 3,7–4,6. Z jeho závěrů vyplynulo, že pivo bude schopno vytvořit více pěny při vyšším pH [83]. Kosin et al. (2020) sledoval stabilitu pивní pěny u pивa které bylo vystíráno s přidavkem kyseliny mléčné. Z jeho výsledků vyplývá, že pokud je pivo vystíráno vodou s nízkým obsahem kyseliny mléčné, může dojít vlivem nižšího pH k menšímu stupni disociace mastných kyselin, tudíž i jejich snížené rozpustnosti ve sladince [88]. Předpokládá se, že se snižujícím se pH dojde k vyšší disociaci hořkých chmelových kyselin a změnám náboje na molekulách proteinů, které mohou dopomoci k migraci těchto látek do pивní pěny a následně k jejich vzájemným interakcím [89]. Bamforth a Kanauchi (2003) se na základě výzkumu domnívají, že při vyšších hodnotách pH dochází k nárůstu koncentrace záporně nabitých iso- α -hořkých kyselin, které jsou následně síťovány pomocí kovových kationtů [91].

Ze stanovených organických kyselin vykazovala silnou korelaci se stabilitou pивní pěny kyselina jantarová ($r = 0,75$), kyselina octová ($r = 0,72$), nižší vliv na pěnivost měla kyselina mravenčí ($r = 0,51$) a kyselina mléčná ($r = 0,42$). U kyseliny jablečné byla patrná středně vysoká negativní korelace se stabilitou pивní pěny ($r = -0,54$). Kyselina citronová vykazovala jen nepatrnou pozitivní korelaci se stabilitou pивní pěny ($r = 0,02$). Organické kyseliny ovlivňují stabilitu pивní pěny převážně úpravou pH. Organické, především mastné kyseliny, mají na pивní pěnu nežádoucí účinky, jelikož narušují interakce proteinů a hořkých chmelových kyselin, což může urychlit proces koalescence a tím i destrukce pивní pěny. Některé z těchto kyselin mohou být za jistých podmínek syntetizovány i kvasinkami v průběhu fermentace. Obecně platí, že čím více je organická kyselina hydrofobní, tím více narušuje stabilitu pивní pěny [8].

4.9.6 Vliv ethanolu na stabilitu pивní pěny

Ethanol tvořil 5,43–5,46 % obj. v analyzovaných vzorcích pив. V rámci experimentů nebyla prokázána signifikantní korelace koncentrace ethanolu a stability pивní pěny ($r = -0,09$). Dle některých autorů v závislosti na koncentraci může ethanol stabilitu pивní pěny ovlivňovat pozitivně, ale i negativně. V nízkých koncentracích, přibližně 1–3 %, je jeho přítomnost pro stabilitu pивní pěny pozitivní, jelikož snižuje povrchové napětí a zvyšuje viskozitu pивa.

V množství nad 10 % vykazuje ethanol destabilizující účinky na pивní pěnu a působí podobným mechanismem jako lipidy [6, 8, 91].

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověřit, jakým způsobem ovlivní studené chmelení v různých navážkách a časech stabilitu pивní pěny, jeho základní charakteristiky a složení z hlediska hořkých kyselin, fenolických látek, bílkovin, vybraných mikro- a makroprvků a organických kyselin.

V experimentální části byly stanoveny základní charakteristiky piva, jako jsou obsah ethanolu, zdánlivý, původní a skutečný extrakt a barva. Bylo zjištěno, že navážka použitého chmelu pozitivně korelovala se zdánlivým, skutečným i původním extraktem, s množstvím alkoholu ve vzorku souvisela doba studeného chmelení. Rozdíly v obsahu alkoholu u pozorovaných vzorků byly minimální. Vliv alkoholu na stabilitu pивní pěny byl zanedbatelný.

Jednou ze základních charakteristik piva je jeho hořkost. Kromě typické chuti jsou iso- α -hořké kyseliny zodpovědné taktéž za stabilizaci pивní pěny. Bylo zjištěno, že všechna studeně chmelená piva byla výrazně hořčí než referenční vzorek. Při studeném chmelení nižší navážkou byla pozorována konstantní hořkost v čase, při vyšší navážce však došlo v průběhu času k poklesu koncentrace iso- α -hořkých kyselin, s čímž souviselo i snížení stability pивní pěny.

Většina bílkovin, které jsou obsaženy v pivu, pochází z ječmene. Stejně jako iso- α -hořké chmelové kyseliny tvoří proteiny kostru pивní pěny. Bylo zjištěno, že obsah bílkovin se u pozorovaných vzorků významně nelišil od referenčního piva. Taktéž bylo zjištěno, že bílkoviny mají na stabilitu pивní pěny pozitivní, ale ne výrazný vliv.

Většina fenolických látek v pivu pochází z ječmene, menší část z chmele. Některé z fenolických látek by mohly v pивní pění fungovat jako analogy hořkých kyselin a pění tak stabilizovat. Bylo patrné, že se zvyšující se navážkou chmelu a dobou studeného chmelení dochází k nárůstu množství fenolických látek v pivu oproti referenci. Mezi obsahem fenolických látek a stabilitou pивní pěny byla však nalezena slabá negativní korelace.

Z hlediska organických kyselin a pH byl pozorován nárůst obsahu kyseliny jablečné a citronové, pokles byl zaznamenán u kyseliny mléčné, mravenčí a jantarové. Pozitivní vliv na stabilitu pивní pěny byl patrný především u kyseliny jantarové, ostatní kyseliny neměly jako izolované parametry významný vliv na stabilitu pивní pěny, stejně tak nebyl prokázán významný vliv pH, jehož změny byly u studeně chmelených vzorků oproti referenci minimální.

Kovové kationty mají původ ve sladu, varní vodě a chmelu. U některých kovových kationtů se předpokládá, že mohou společně s hořkými látkami a bílkovinami tvořit základní strukturu pивní pěny. Nadměrná přítomnost některých kovových kationtů však může vést až k přepěňování piva nebo k nežádoucím změnám v jeho chuti. V rámci prvkové analýzy bylo sledováno celkem 14prvků, z nichž 2 byly pod limitem detekce. Bylo zjištěno, že pozitivní vliv na stabilitu pивní pěny mají ionty železa a niklu, u všech ostatních byly nalezeny negativní korelace se stabilitou pивní pěny.

Z naměřených dat vyplývá, že stabilita pивní pěny klesá jak se zvyšující se navážkou chmelu, tak i s dobou studeného chmelení. Bylo zjištěno, že s delší dobou a vyšší navážkou chmelu je do piva extrahováno vyšší množství látek, které se podílí spíše na destabilizaci pивní pěny. Předmětem dalšího výzkumu vlivu studeného chmelení na stabilitu pивní pěny by mohla být optimalizace doby a navážky chmelového materiálu tak, aby u piva došlo k vytvoření kompromisu mezi požadovanými senzorickými vlastnostmi a stabilitou pивní pěny.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [2] KOSAŘ, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902-6586-3.
- [3] FOX, G. P. Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality. *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 63-98. Advanced Topics in Science and Technology in China. ISBN 978-3-642-01278-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-01279-2_3.
- [4] ANNESS, B. J. LIPIDS OF BARLEY, MALT AND ADJUNCTS. *Journal of the Institute of Brewing*. 1984, **90**(5), 315-318. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1984.tb04282.x.
- [5] *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS): Comparison of Lipid Content and Fatty Acid Composition of Malted and Non-Malted Barley*. Vol-2. Jan.- 2015. ISSN 2349-6495.
- [6] ČÍŽKOVÁ, Hana, Pavel DOSTÁLEK, Jaromír FIALA a Irena KOLOUCHOVÁ. Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva. *Chemické listy* [online]. 2006, 100(7), 478-485 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: www.chemickelisty.cz/docs/full/2006_07_478-485.pdf.
- [7] PROKEŠ, J. Technological importance of nitrogenic compounds in barley and malt. *Kvasny Prumysl*. **46**(10), 277-279. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2000023.
- [8] EVANS, D. Evan a Charles W. BAMFORTH. Beer foam: achieving a suitable head. *Beer*. Elsevier, 2009, 2009, **46**(10), 1-60. ISBN 9780126692013. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-669201-3.00001-4.
- [9] GUPTA, Mahesh, Nissreen ABU-GHANNAM a Eimear GALLAGHAR. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, **9**(3), 318-328. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x
- [10] MOLINA-CANO, J.L., J.P. POLO, E. ROMERA, J.L. ARAUS, J. ZARCO a J.S. SWANSTON. Relationships Between Barley Hordeins and Malting Quality in a Mutant of cv. Triumph I. Genotype by Environment Interaction of Hordein Content: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Journal of Cereal Science*. 2001, **34**(3), 285-294. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1006/jcrs.2001.0415.
- [11] ŠIMIĆ, G., R. SUDAR, A. LALIĆ, Z. JURKOVIĆ, J. HORVAT a D. BABIĆ. Relationships Between Barley Hordeins and Malting Quality in a Mutant of cv. Triumph I. Genotype by Environment Interaction of Hordein Content: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Cereal Research Communications*. 2007, **35**(3), 285-294. ISSN 0133-3720. Dostupné z: doi:10.1556/CRC.35.2007.3.13.
- [12] HARTMAN, I., I. SVOBODOVÁ, V. SPÁČILOVÁ a P. MÍŠA, 2017. Reakce odrůd sladovnického ječmene na pěstování v režimu nízkých vstupů („low – input“) a ekologickém režimu II. část Sladovnická kvalita. *Obilnářské listy*. Agrotest fyto, s.r.o.,

- Havlíčkova 2787, Kroměříž: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Brno, 25(3-4).
- [13] VAN NIEROP, Sandra N. E., David E. EVANS, Barry C. AXCELL, Ian C. CANTRELL a Marina RAUTENBACH. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(10), 3120-3129. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf035125c.
- [14] DIDIER, Marion a Bakan BÉNÉDICTE, 2009. Soluble Proteins of Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2009, 265-271. ISBN 9780123738912. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-373891-2.00024-9.
- [15] Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů, 2018. In: Částka 35.
- [16] WILDE, P. J., F. A. HUSBAND, D. COOPER, M. J. RIDOUT, R. E. MULLER a E. N. C. MILLS. Destabilization of Beer Foam by Lipids: Structural and Interfacial Effects. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018, **61**(4), 196-202. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-61-0196.
- [17] *Vinařství* [online]. In: [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1186&typ=html.
- [18] EUMANN, M. Water in brewing. *Brewing*. Elsevier, 2006, 2006, 183-207. ISBN 9781845690038. Dostupné z: doi:10.1533/9781845691738.183
- [19] EUMANN, M. a C. SCHAEBERLE. Water. *Brewing Materials and Processes*. Elsevier, 2016, 2016, 97-111. ISBN 9780127999548. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-799954-8.00005-8.
- [20] KOPECKÁ, Jana, Dagmar MATOULKOVÁ a Miroslav NĚMEC. Yeast and its uses. *Kvasny Prumysl*. 2012, **58**(11-12), 326-335. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2012029.
- [21] Briggs, D. E., 2004: *Brewing : Science and practice*. Woodhead Pub. Ltd., Cambridge, England. ISBN 0849325471 (CRC Press).
- [22] VONTROBOVÁ, Eva, Jana KOPECKÁ, Gabriela ROTKOVÁ a Dagmar MATOULKOVÁ. Factors Influencing the Production of Sensory Active Substances in Brewer's and Wine Yeast. *Kvasny Prumysl*. 2017, **63**(4). ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp201720.
- [23] POHANKA, Miroslav. *Přehled biochemie: učební text pro vysokoškolskou výuku*. [V Hradci Králové]: [Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany], 2015. ISBN 978-80-7231-358-7.
- [24] ZANOLI, Paola a Manuela ZAVATTI. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, **116**(3), 383-396. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2008.01.011.
- [25] ROBERTS, T.R. Hops. *Brewing Materials and Processes*. Elsevier, 2016, 2016, 47-75. ISBN 9780127999548. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-799954-8.00003-4.
- [26] ZHANG, Guoqing, Nan ZHANG, Anran YANG, Jingling HUANG, Xueni REN, Mo XIAN a Huibin ZOU. Hop bitter acids: resources, biosynthesis, and applications. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*. 2021, **105**(11), 4343-4356. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-021-11329-4.
- [27] KROFTA, Karel a Alexandr MIKYŠKA. Hop beta acids: Properties, significance and utilization. *Kvasny Prumysl.* 2014, **60**(4), 96-105. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2014010.
- [28] JASKULA, Barbara, Evelien SYRYN, Koen GOIRIS, Gert DE ROUCK, Filip VAN OPSTAELE, Jessika DE CLIPPELEER, Guido AERTS a Luc DE COOMAN, 2018. Hopping Technology in Relation to Beer Bitterness Consistency and Flavor Stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **65**(1), 38-46. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2007-0112-03
- [29] SUN, Shaokang, Xiaochen WANG, Ai YUAN, et al. Chemical constituents and bioactivities of hops (*Humulus lupulus* L .) and their effects on beer-related microorganisms. *Food and Energy Security*. ISSN 2048-3694. Dostupné z: doi:10.1002/fes3.367.
- [30] PEPPARD, T. L. VOLATILE ORGANOSULPHUR COMPOUNDS IN HOPS AND HOP OILS: A REVIEW. *Journal of the Institute of Brewing*. 1981, **87**(6), 376-385. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1981.tb04054.x.
- [31] NENTWICHOVÁ, M. a A. DOLEŽALOVÁ. New methods for malt checking. Determination of α -amylase in malt. *Kvasny Prumysl.* 1984, **30**(2), 25-28. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1984005.
- [32] JELÍNEK, Lukáš, Jana MÜLLEROVÁ, Marcel a Pavel DOSTÁLEK. The secret of dry hopped beers - Review. *Kvasny Prumysl.* 2018, **64**(6). ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp201836.
- [33] LAFONTAINE, Scott R. a Thomas H. SHELLHAMMER, 2018. Impact of static dry-hopping rate on the sensory and analytical profiles of beer. *Journal of the Institute of Brewing*. **124**(4), 434-442. ISSN 0046-9750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.517.
- [34] WOLFE, Peter, Michael C. QIAN a Thomas H. SHELLHAMMER. The Effect of Pellet Processing and Exposure Time on Dry Hop Aroma Extraction. *Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages*. Washington, DC: American Chemical Society, 2012, 2012-01-16, 203-215. ACS Symposium Series. ISBN 9780841227903. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2012-1104.ch013.
- [35] ČEPIČKA, Jaroslav. Vliv chmelových látek na pěnivost piva. In: Chmelařství [online]. 2000 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: http://www.beers.cz/chmelar/2000/ch11_20c.html.
- [36] RITACCO, Hernán A. Complexity and self-organized criticality in liquid foams. A short review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020, **285**. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2020.102282.
- [37] Co je co v povrchové a koloidní chemii [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/.
- [38] WALSTRA, P. Principles of Foam Formation and Stability. *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. London: Springer London, 1989, 1989, 1-15. Springer Series in Applied Biology. ISBN 978-1-4471-3809-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4471-3807-5_1.
- [39] BAMFORTH, C.W. The Relative Significance of Physics and Chemistry for Beer Foam Excellence: Theory and Practice. *Journal of the Institute of Brewing*. 2004, **110**(4), 259-266. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2004.tb00620.x.

- [40] VIANA, Carine, Denise BOHRER, Leandro Machado DE CARVALHO, Paulo Cícero DO NASCIMENTO a Marcelo Barcellos DA ROSA. Emulsified systems for metal determination by spectrometric methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014, **53**, 49-59. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2013.07.009.
- [41] SANADA, Toshiyuki, Masao WATANABE a Tohru FUKANO. Effects of viscosity on coalescence of a bubble upon impact with a free surface. *Chemical Engineering Science*. 2005, **60**(19), 5372-5384. ISSN 00092509. Dostupné z: doi:10.1016/j.ces.2005.04.077.
- [42] RAMASWAMI, S., S. HARTLAND a J.R. BOURNE. A study of disproportionation effects in semi-batch foams—I. Simulation of evolution of bubble size distribution. *Chemical Engineering Science*. 1993, **48**(9), 1709-1721. ISSN 00092509. Dostupné z: doi:10.1016/0009-2509(93)80130-I.
- [43] BISPERINK, C.G.J., A.D. RONTELTAP a A. PRINS. Bubble-size distributions in foams. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1992, **38**, 13-32. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/0001-8686(92)80040-5.
- [44] ELLIS, A. L. a A. LAZIDIS. Foams for Food Applications. *Polymers for Food Applications*. Cham: Springer International Publishing, 2018, 2018-08-10, , 271-327. DOI: 10.1007/978-3-319-94625-2_11. ISBN 978-3-319-94624-5. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-94625-2_11.
- [45] GÄNZ, Nele, Tobias BECHER, Stephan DRUSCH a Jean TITZE. Interaction of proteins and amino acids with iso- α -acids during wort preparation in the brewhouse. *European Food Research and Technology*. 2022, **248**(3), 741-750. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-021-03926-4.
- [46] Asano K, Hashimoto N (1976) Contribution of hop bitter substances to head formation of beer. Rept Res Lab Kirin Brew Co Ltd 19:9–16.
- [47] ASANO, Katsuhiko a Naoki HASHIMOTO. Isolation and Characterization of Foaming Proteins of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018, **38**(4), 129-137. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-38-0129.
- [48] ROBERTS, R. T. INTERACTION BETWEEN BEER PROTEIN AND ISOHUMULONE. *Journal of the Institute of Brewing*. 1976, **82**(5), 282-282. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1976.tb03772.x.
- [49] W. J. Simpson, P. S. Hughes, Stabilization of foams by hop-derived bitter acids. Chemical interactions in beer foam. *Cerevisia and Biotechnology*. **19**, 39–44 (1994).
- [50] SOMASUNDARAN, P. a Arthur T. HUBBARD, ed. *Encyclopedia of surface and colloid science*. Volume 4. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-8493-9615-8.
- [51] Foam Stability of Beer Using the NIBEM-T Meter. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018, **66**(4), 271-272. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2008-1021-02.
- [52] ŠAVEL, Jan a Adam BROŽ. Measurement of beer foaming power. *Kvasny Prumysl*. 2006, **52**(10), 314-318. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2006026.
- [53] OLŠOVSKÁ, Jana a Marie JURKOVÁ. New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 1. Theoretical introduction. *Kvasny Prumysl*. 2012, **58**(2), 30-35. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2012005.

- [54] BAHADIR, Ozlem. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. *Column Chromatography*. InTech, 2013, 2013-04-10. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné z: doi:10.5772/55744.
- [55] CHARLES, B.; FREDEEN, Kenneth J. Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Perkin Elmer Corporation, 1997, 3: 2.
- [56] Ghosh, Somsubhra & Prasanna, V.L. & Sowjanya, B. & Srivani, P. & Alagaraja, M. & Banji, David. (2013). Inductively coupled plasma - Optical emission spectroscopy: A review. *Asian J. Pharm. Ana.* 3. 24-33.
- [57] HILL, Steve J., © 2007. *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. 2nd ed. Blackwell Publishing. ISBN 978-1-4051-3594-8.
- [58] SALAMON, Rozália Veronika, Adriana DABIJA, Ágota FERENCZ, György TANKÓ, Marius Eduard CIOCAN a Georgiana Gabriela CODINĂ, 2022. The Effect of Dry Hopping Efficiency on β -Myrcene Dissolution into Beer. *Plants*. **11**(8). ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11081043.
- [59] Oladokun O., James S., Cowley T., Smart K., Hort J., Cook D. Dry-Hopping: The effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. *Brew. Sci.* 2017;70:187–196. Dostupné z: doi: 10.23763/BRSC17-18OLADOKU.
- [60] Forster A., Gahr A. On the Fate of Certain Hop Substances during Dry Hopping. *Brew. Sci.* 2013;66:93–103.
- [61] MIKYŠKA, A., M. HRABÁK, D. HAŠKOVÁ a J. ŠROGL, 2002. The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. **108**(1), 78-85. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2002.tb00128.x.
- [62] PAI, Tapasya V., Siddhi Y. SAWANT, Arindam A. GHATAK, Palak A. CHATURVEDI, Arpita M. GUPTA a Neetin S. DESAI, 2015. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*. **52**(3), 1414-1423. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-013-1152-2.
- [63] ANGER, Heinz-Michael, Stefan SCHILDBACH, Diedrich HARMS a Katrin PANKOKE, 2009. Analysis and Quality Control. *Handbook of Brewing*. Weinheim, Germany, 437-475. ISBN 9783527623488. Dostupné z: doi:10.1002/9783527623488.ch17.
- [64] HAUSER, Dean G., Karli R. Van SIMAEYS, Scott R. LAFONTAINE a Thomas H. SHELLHAMMER, 2019. A Comparison of Single-Stage and Two-Stage Dry-Hopping Regimes. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **77**(4), 251-260. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1080/03610470.2019.1668230
- [65] ČEJKA, P., J. ČEPIČKA, P. ZÍTEK a G. BASAŘOVÁ, 1983. Comparison of subjective and objective methods for a colorimetric measurement of wort. *Kvasny Prumysl.* **29**(3), 52-56. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1983009.
- [66] MAROVA, Ivana, Katerina PARILOVA, Zdenek FRIEDL, Stanislav OBRUCA a Katerina DURONOVA, 2011. Analysis of Phenolic Compounds in Lager Beers of Different Origin: A Contribution to Potential Determination of the Authenticity of Czech Beer. *Chromatographia*. **73**(S1), 83-95. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-011-1916-7.

- [67] GERHARDS, Sandra, María Inmaculada TALAVERANO, Ana Isabel ANDRÉS, Carlos SÁNCHEZ-VICENTE, Jesús LOZANO, Carlos GARCÍA-LATORRE, María Jesús PETRÓN a Sara RODRIGO, 2021. Different dry hopping and fermentation methods: influence on beer nutritional quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **101**(7), 2828-2835. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.10912.
- [68] Dry Hopping and Its Effects on the International Bitterness Unit Test and Beer Bitterness, 2016. *Technical Quarterly*. ISSN 07439407. Dostupné z: doi:10.1094/TQ-53-3-0808-01.
- [69] PARKIN, Ellen a Thomas SHELLHAMMER, 2017. Toward Understanding the Bitterness of Dry-Hopped Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **75**(4), 363-368. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2017-4311-01.
- [70] POHL, Pavel, 2009. Metals in Beer. Beer in health and disease prevention. 1. USA: Academic Press is an imprint of Elsevier, s. 349-361. ISBN 978-0-12-373891-2. Division of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Wroclaw University of Technology, Wroclaw, Poland.
- [71] MONTANARI, Luigi, Giuseppe PERRETTI, Fausta NATELLA, Alessia GUIDI a Paolo FANTOZZI, 1999. Organic and Phenolic Acids in Beer. *LWT - Food Science and Technology*. **32**(8), 535-539. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1006/food.1999.0593.
- [72] LI, g a Fang LIU, 2018. Changes in Organic Acids during Beer Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **73**(3), 275-279. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2015-0509-01.
- [73] MARTINEZ-GOMEZ, Alvaro, Isabel CABALLERO a Carlos A. BLANCO, 2020. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*. **10**(3). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10030400.
- [74] BAMFORTH, Charles W., 2018. Beer Haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **57**(3), 81-90. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-57-0081.
- [75] Lewis M.J., Lewis A.S. (2003): Correlation of beer foam with other beer properties. *Technical Quarterly*, Master Brewers Association of America, 40: 114–124.
- [76] KORDIALIK-BOGACKA, E. a N. ANTCZAK, 2011. Prediction of beer foam stability from malt components. *Czech Journal of Food Sciences*. **29**(3), 243-249. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/225/2010-CJFS.
- [77] EVANS, D. Evan a Marian C. SHEEHAN, 2002. Don't Be Fobbed Off: The Substance of Beer Foam—A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **60**(2), 47-57. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-60-0047.
- [78] PASZKOT, Justyna, Joanna KAWA-RYGIELSKA a Mirosław ANIOŁ, 2021. Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. *Antioxidants*. **10**(5). ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10050763.
- [79] WANG, Limin, Kai HONG, Johnpaul I AGBAKA, Yumei SONG, Chenyan LV a Changwei MA. Characterization of bitter-tasting and antioxidant activity of dry-hopped beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11847.
- [80] WALLIN, C. E., M. B. DIPIETRO, R. W. SCHWARZ a C. W. BAMFORTH, 2010. A Comparison of Three Methods for the Assessment of Foam Stability of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. **116**(1), 78-80. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2010.tb00401.x.

- [81] FERREIRA, A.A., 2003. Determination of the Foam Stability of Beer Using the NIBEM-T Meter. *Journal of the Institute of Brewing*. **109**(4), 400-402. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2003.tb00614.x.
- [82] GERNAT, D.C., E.R. BROUWER, R.C. FABER-ZIRKZEE a M. OTTENS, 2020. Flavour-improved alcohol-free beer – Quality traits, ageing and sensory perception. *Food and Bioproducts Processing*. **123**, 450-458. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2020.07.014.
- [83] EVANS, D. Evan, Michael OBERDIECK, Kevin S. REDD a Rebecca NEWMAN, 2018. Comparison of the Rudin and NIBEM Methods for Measuring Foam Stability with a Manual Pour Method to Identify Beer Characteristics That Deliver Consumers Stable Beer Foam. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **70**(1), 70-78. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2011-1205-01.
- [84] KELLNER, V., P. ČEJKA a F. FRANTÍK, 1987. Calcium significance in brewing. *Kvasny Prumysl*. **33**(12), 357-359. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp1987070.
- [85] SIEBERT, Karl J., 2018. Recent Discoveries in Beer Foam. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **72**(2), 79-87. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2014-0319-01.
- [86] EVANS, D. Evan, Anne SURREL, Megan SHEEHY, Douglas C. STEWART a Louise H. ROBINSON, 2018. Comparison of Foam Quality and the Influence of Hop α -Acids and Proteins Using Five Foam Analysis Methods. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **66**(1), 1-10. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2007-1129-01.
- [87] NEUGRODDA, Christoph, Martina GASTL a Thomas BECKER, 2018. Comparison of Foam Analysis Methods and the Impact of Beer Components on Foam Stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **73**(2), 170-178. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2015-0129-01a.
- [88] KOŠIN, Petr, Jan ŠAVEL, Adam BROŽ a Jakub VLČEK, 2020. Improving foam stability and lautering conditions. *KVASNY PRUMYSL*. **66**(2), 261-263. ISSN 2570-8619. Dostupné z: doi:10.18832/kp2019.66.261.
- [89] SHOKRIBOUSJEIN, Zahra, Sylvie M. DECKERS, Kurt GEBRUERS, et al., 2011. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia*. **35**(4), 85-101. ISSN 13737163. Dostupné z: doi:10.1016/j.cervis.2010.12.001.
- [90] MAYE, John Paul a Robert SMITH, 2016. Humulinone Formation in Hops and Hop Pellets and Its Implications for Dry Hopped Beers. *Technical Quarterly*. ISSN 07439407. Dostupné z: doi:10.1094/TQ-53-1-0227-01.
- [91] BAMFORTH, CW a M KANAUCHI, 2003. Interactions between polypeptides derived from barley and other beer components in model foam systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **83**(10), 1045-1050. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.1503.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CCD – Charge-coupled device

CID – Charge-injection device

EBC – European Brewery Convention

EPM – Extrakt původní mladiny

IBU – International Bittering Unit

IC – Iontová chromatografie

ICP-OES – Inductively coupled plasma-optical emission spektrometry

LTP – Lipid Transfer Protein

TFC – Total flavonoid content

TPC – Total phenolic content