

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tereza Zlochová

STUDIUM SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK CHMELE  
VE STUDENĚ CHMELENÝCH PIVECH

Study of sensory-active compounds of hops in dry-hopped beers

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.  
Konzultant diplomové práce: RNDR. Mgr. Jana Olšovská, PhD.

Praha 2020

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 14.8.2020

Podpis: \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým konzultantům z VÚPS, v první řadě RNDr. Mgr. Janě Olšovské, Ph.D. za cenné připomínky a usměrňování mé práce. Ing. Karlu Štěrbovi, Ph.D. a Mgr. Tomášovi Vrzalovi, PhD. za jejich trpělivost během spolupráce a ochotu při konzultacích. Ing. Lence Strakové za osvětlení daného tématu. Dále patří velký dík mé vedoucí RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za její profesionální přístup během spolupráce a cenné rady. V poslední řadě bych ráda poděkovala rodině a jmenovitě Lukášovi Buchalovi za obrovskou podporu nejen po dobu práce na diplomovém projektu, ale také v průběhu studia.

## **Studium sensoricky aktivních látek chmele ve studeně chmelených pivech**

### **ABSTRAKT**

Studené chmelení piva je v současnosti na trhu velmi oblíbená technika úpravy piva, jež má svá pozitiva, ale i úskalí. Hlavní účel studeného chmelení je dostat chmelové aroma v co nejméně pozměněném stavu do výsledného produktu. Za chmelové aroma jsou zodpovědné hlavně chmelové silice, kterým je věnována značná část této práce. V první řadě je však provedena validace izolačních metod silic z chmelového materiálu a piva. Dále je studován přenos těchto těkavých látek z chmele do piva v průběhu studeného chmelení a diskutován s dopady přenosu na chuť a aroma výsledného produktu. Následně jsou v práci sledovány změny profilu těchto sensoricky aktivních látek v souvislosti se stárnutím studeně chmeleného piva a korelovány s výsledky sensorické analýzy. V závěru se autor věnuje sensorickému zhodnocení těchto piv.

Studium silic v této práci je realizováno na výběru piv z Volby Sládků, a to zejména díky Výzkumnému ústavu pivovarskému a sladařskému, ve spolupráci se sládkovou Plzeňského prazdroje Lenkou Strakovou.

**Klíčová slova:** chmel, chmelové silice, studené chmelení, pivo, stárnutí piva, sensorické hodnocení piva

## **Study of sensory-active compounds of hops in dry-hopped beers**

### **ABSTRACT**

Nowadays, dry-hopping is a widely used method of beer making, with its pros and cons. The main purpose of dry-hopping is to derive specific hop aroma to beer in its very unchanged form. The essential part of this work consists of a study of hop essential oils, as the main providers of desired hop aroma. Firstly, the validation of methods for isolating essential oils from hop material and beer is carried out. Secondly, the transfer of these volatiles in process of dry-hopping is studied and the impact on beer aroma profile is discussed. Subsequently, changes of essential oils profile during beer-aging are observed and evaluated with a valuable tool, the sensory analysis.

This study was realized on beer samples from Brewers' Choice program, thanks to the Research Institute of Brewing and Malting and Lenka Strakova, the Pilsner Urquell brewer.

**Key words:** hop, hop oils, dry-hopping, beer, beer-aging, beer sensory analysis

## OBSAH

<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	- 8 -
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	- 8 -
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	- 9 -
<b>1 ÚVOD</b> .....	- 11 -
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	- 13 -
2.1 Chmel jakožto rostlinný materiál.....	- 13 -
2.1.1 Chmelové odrůdy.....	- 13 -
2.1.2 Analytické složky chmele.....	- 14 -
2.1.2.1 Měkké pryskyřice.....	- 15 -
2.1.2.2 Tvrdé pryskyřice.....	- 16 -
2.1.2.3 Polyfenoly.....	- 17 -
2.1.3 Chmelové silice.....	- 17 -
2.1.3.1 Uhlovodíky.....	- 18 -
2.1.3.2 Kyslíkaté sloučeniny.....	- 20 -
2.1.3.3 Sloučeniny obsahující síru.....	- 23 -
2.1.4 Změny složek chmele během dozrávání a stárnutí.....	- 24 -
2.1.5 Chmelové produkty.....	- 25 -
2.1.6 Extrakční techniky používané k izolaci silic.....	- 26 -
2.1.6.1 Destilace vodní parou (SD).....	- 26 -
2.1.6.2 Superkritická fluidní extrakce (SCFE).....	- 26 -
2.1.6.3 Headspace mikroextrakce na pevné fázi (HS-SPME).....	- 28 -
2.1.6.4 Fluidní ethanolové lože (FBE).....	- 29 -
2.1.6.5 Srovnání extrakčních technik.....	- 30 -
2.2 Pivovarnictví.....	- 33 -

2.2.1.1	<i>Volba Sládků</i> .....	- 33 -
2.2.2	Proces výroby piva.....	- 34 -
2.2.3	Chmelení zastudena .....	- 36 -
2.2.3.1	<i>Technologie studeného chmelení</i> .....	- 36 -
2.2.3.2	<i>Osud aromaticky aktivních sloučenin v průběhu studeného chmelení pív a jejich skladování</i> .....	- 37 -
2.2.4	Senzorické stárnutí piva .....	- 41 -
2.3	Senzorická analýza.....	- 42 -
2.3.1	Senzorická analýza vs. analytické metody.....	- 43 -
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	- 44 -
3.1	Chemikálie .....	- 44 -
3.2	Materiál .....	- 45 -
3.3	Přístroje a programy.....	- 46 -
3.4	Pracovní postup.....	- 46 -
3.4.1	Příprava vnitřního standardu a kalibračních roztoků .....	- 46 -
3.4.2	Příprava vzorku chmele .....	- 47 -
3.4.3	Příprava vzorku piva .....	- 48 -
3.4.4	Chromatografická analýza s hmotnostní detekcí .....	- 48 -
3.4.5	Vyhodnocení .....	- 49 -
3.5	Výpočet validačních parametrů .....	- 49 -
3.6	Výpočet parametrů přenosu silic v rámci studeného chmelení .....	- 50 -
3.7	Výpočty spřažené s korelační analýzou .....	- 51 -
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	- 52 -
4.1	Validace .....	- 52 -
4.1.1	Silice v pivu .....	- 52 -
4.1.2	Silice ve chmelu.....	- 56 -
4.2	Studené chmelení .....	- 57 -
4.2.1	Pivo A .....	- 58 -
4.2.2	Pivo B.....	- 59 -
4.2.3	Přenos skupin silic během studeného chmelení.....	- 61 -
4.2.3.1	<i>Alkoholy</i> .....	- 61 -

4.2.3.2	<i>Estery</i> .....	- 63 -
4.2.3.3	<i>Uhlovodíky</i> .....	- 64 -
4.2.4	Faktory ovlivňující přenos silic v rámci studeného chmelení .....	- 67 -
4.3	Změny množství silic během sensorického stárnutí .....	- 68 -
4.3.1	Stárnutí Piva A .....	- 68 -
4.3.1.1	<i>Monoterpeny a seskviterpeny</i> .....	- 68 -
4.3.1.2	<i>Alkoholy</i> .....	- 69 -
4.3.1.3	<i>Estery</i> .....	- 70 -
4.3.1.4	<i>Ketony</i> .....	- 71 -
4.3.2	Stárnutí Piva B .....	- 71 -
4.3.2.1	<i>Monoterpeny a seskviterpeny</i> .....	- 71 -
4.3.2.2	<i>Alkoholy</i> .....	- 73 -
4.3.2.3	<i>Estery</i> .....	- 74 -
4.3.2.4	<i>Ketony</i> .....	- 74 -
4.3.3	Vliv silic na sensorické vlastnosti piva.....	- 75 -
4.3.3.1	<i>Sensorické vlastnosti piv z pohledu chemických skupin silic v průběhu stárnutí</i> .....	- 78 -
4.4	SENZORICKÁ ANALÝZA .....	- 82 -
4.4.1	Specifikace piv v kontrastu se SH .....	- 82 -
4.4.1.1	<i>Sensorický profil Piva B</i> .....	- 82 -
4.4.1.1	<i>Sensorický profil Piva A</i> .....	- 83 -
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	- 86 -
	<b>SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ</b> .....	- 91 -

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Průměrné chemické složení sušených chmelových šištic .....	- 14 -
Tab. 2 – Validační parametry silic stanovovaných v pivu. ....	- 55 -
Tab. 3 – Validační parametry vybraných silic stanovovaných ve chmelu. ....	- 56 -
Tab. 4 – Seznam analytů s nejvyššími mírami přenosu během DH Piv A a B. ....	- 58 -
Tab. 5 – Srovnání sensorických charakteristik Piva B.....	- 83 -
Tab. 6 – Srovnání sensorických charakteristik Piva A. ....	- 84 -

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Klasifikace chmelových pryskyřic .....	- 15 -
Obr. 2 – Vybraní zástupci uhlíkaté frakce silic .....	- 20 -
Obr. 3 – Struktura a biotransformační přeměny monoterpenických alkoholů .....	- 22 -
Obr. 4 – Srovnání účinnosti 3 extrakčních metod na látkách ECG.....	- 32 -
Obr. 5 – Specifikace piv Piva B a Piva A .....	- 34 -
Obr. 6 – Sensorické změny piv během doby skladování dle Dalglisha .....	- 42 -
Obr. 7 – Regulační diagram preciznosti metody ke stanovení silic v pivu .....	- 53 -
Obr. 8 – Graf účinnosti extrakce chemických skupin silic do Piva A.....	- 59 -
Obr. 9 – Graf účinnosti extrakce chemických skupin silic do Piva B.....	- 60 -
Obr. 10 – Grafy zastoupení skupin silic v Pivu B v různých fázích DH.....	- 61 -
Obr. 11 – Navýšení množství skupin silic v Pivu A DH.....	- 65 -
Obr. 12 – Navýšení množství skupin silic v Pivu B dvojitým DH .....	- 65 -
Obr. 13 – Křivky vývoje množství silic během stárnutí Piva A.....	- 69 -
Obr. 14 – Křivky vývoje množství silic během stárnutí Piva B.....	- 72 -
Obr. 15 – Graf závislosti sensorických atribut na množství silic v Pivu A.....	- 76 -
Obr. 16 – Graf závislosti sensorických atribut na množství silic v Pivu B.....	- 76 -
Obr. 17 – Graf korelačních závislostí množství silic se sensorickými atributy .....	- 78 -

## SEZNAM ZKRATEK

$C_{A, \text{chmel/pivo}}$	Koncentrace analytu <i>A</i> ve chmelu (mg/kg)/pivu ( $\mu\text{g/l}$ )
DCM	Dichlormethan
DH	Studené chmelení (dry-hopping)
ECG	Exocarpium Citri Grandis
FBE	Extrakce na fluidním ethanolovém loži
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
IAA	Iso-alfa-kyseliny
IAIB	Isoamylisobutyryát
IBIB	Isobutylisobutyryát
IBU	Mezinárodní jednotky hořkosti
ISTD	Vnitřní standard
ISTD-ch	Vnitřní standard určený do vzorků chmele
ISTD-p	Vnitřní standard určený do vzorků piva
ISZL-ch	Vnitřní standard určený do kalibrační řady pro chmel
ISZL-p	Vnitřní standard určený do kalibrační řady pro pivo
LOD	Limit detekce ( $\mu\text{g/l}$ , mg/kg)
LOQ	Limit kvantifikace ( $\mu\text{g/l}$ , mg/kg)
<i>m</i>	Počet vzorků
<i>Med</i>	Medián ( $\mu\text{g/l}$ , mg/kg)
<i>n</i>	Počet měření

$P_{DH}$	Přenosová míra analytu z chmele do piva během studeného chmelení (%)
$r$	Opakovatelnost Korelační koeficient
RSD	Variační koeficient (%)
$s$	Výběrová směrodatná odchylka ( $\mu\text{g/l}$ , $\text{mg/kg}$ )
SCFE	Superkritická fluidní extrakce
SH	Senzorické hodnocení
SPE	Extrakce na tuhé fázi
$U_{DH}$	Účinnost extrakce skupiny látek z chmele do piva během studeného chmelení (%)

## 1 ÚVOD

Studeně chmelená piva se z konzumentského hlediska stala velmi oblíbeným a vyhledávaným zbožím takřka po celém světě. Možná proto se tato již několik set let stará technika výroby v současnosti stává již konvenčním krokem v běžném pivovarnickém procesu a mnoho pozornosti je věnováno k zefektivnění tohoto postupu.

Účelem studeného chmelení je importovat chmelové aroma do piva v co nejméně pozměněném stavu. Za majoritní poskytovatele tohoto aroma bývají označovány chmelové silice, sensoricky aktivní látky, které se však kvůli své těkavé povaze během chmelovaru z piva z velké části vytrácí.[1] Princip studeného chmelení je proto založen na nízkých teplotách a vybraných speciálních odrůdách chmele se specifickým aroma označovaných jako „*flavour hops*“.[2] Tyto odrůdy jsou bohaté na aromatické látky, které jsou schopny se v procesu studeného chmelení v různé míře dostat do piva a poskytnout tak hotovému produktu žádané chmelové aroma. Mezi nejpoužívanější odrůdy patří např. americké chmely Amarillo, Cascade, Citra, německé Polaris či Mandarina Bavaria, velmi oblíbená je i česká odrůda Kazbek.[2, 3]

Než ale bude věnována pozornost problematice studeného chmelení a přenosu konkrétních sensoricky aktivních látek z chmele do piva, **prvním cílem** této práce je provedení retrospektivní validace metod extrakce silic z chmele a piva, jež je obsahem Kapitoly 4.1. Izolace silic z chmelového materiálu probíhala za použití techniky fluidního ethanolového lože (FBE), která je, na rozdíl od hojně využívané destilace vodní párou (SD), výhodná svou časovou nenáročností, nižšími operačními teplotami zabraňujícími termickým degradacím stanovovaných analytů a nízkou spotřebou chmelového materiálu.[4–6]

Silice z piva byly izolovány za použití klasické techniky destilace vodní párou, která sice nedosahuje takové úspory času, vzorku a pomocných chemikálií jako např. headspace mikroextrakce na pevné fázi (HS-SPME), extrakty jsou však z hlediska sledovaných analytů srovnatelné, SD má navíc vyšší kapacitu, je mechanicky robustnější a finančně méně nákladná.[4, 7]

Analýza extraktů, získaných aplikací obou metod, byla provedena za použití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a sledováno bylo celkem 33 analytů frakce silic.

**Druhým cílem** této práce je studium přenosu chmelových silic z chmelového materiálu do piva procesem studeného chmelení. K tomuto pozorování posloužila dvě za studena chmelená piva z Volby Sládků, Pivo A a Pivo B, u kterých byl následně diskutován vliv přenosu konkrétních aromatických komponent chmele na jejich sensorický profil. Efektivita studeného chmelení použitými chmely byla pro skupinu chemicky podobných silic vyjádřena jako účinnost ( $U_{DH}$ ), pro jednotlivé analyty jako míra přenosu ( $P_{DH}$ ) v rámci studeného chmelení. Tyto údaje posloužily ke srovnání nejen napříč oběma odlišnými pivy, ale také se studii Opstaele a kol.[8], Forstera a Gahra [9], Hausera a kol.[10] a De Clippeleerové a kol.[11], významnými jmény ve svém oboru.

Výše zmíněné studie nebyly aplikovány pouze k predikci chování látek během studeného chmelení, ale také ke splnění **třetího cíle** této práce – studiu změn v obsahu stanovovaných aromatických látek v průběhu šestiměsíčního stárnutí studeně chmelených Piv A a B. Tyto změny byly dále korelovány s výsledky sensorických analýz.

Práci uzavírá splnění **čtvrtého cíle**, kde je sensorické zhodnocení analyzovaných piv dáno do kontrastu se specifikacemi piv od výrobce.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Chmel jakožto rostlinný materiál

Společně s vodou, obilným sladem a kvasinkami jde o základní surovinu pro výrobu piva.[12] Botanicky je řeč o chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*), vytrvalé popínavé rostlině z čeledi konopovitých (*Cannabaceae*). Pivovarskou hodnotu chmele nese pouze samičí květenství, a to díky lupulinu uvnitř lupulinových žláz chmelových hlávek. [2, 13] Tento jemný žlutý prášek je – v závislosti na mnoha faktorech – bohatou směsí sekundárních metabolitů organických látek, mezi něž patří pryskyřice, silice a polyfenoly, technologicky velmi významné sloučeniny.[2, 13, 14]

Udává se hned několik důvodů, proč je chmel výhodné do piva přidávat - v první řadě jde o hořkost a aroma, které pivu přídavek poskytuje. Dále má za následek vysrážení určitých dusíkatých látek z mladiny, slouží jako filtrační činidlo pro její projasnění a sterilizaci. V neposlední řadě propůjčuje chmel pivu antibakteriální vlastnosti. Dalšími dvěma přínosnými vlastnostmi objevenými později jsou stabilizace a celkové zlepšení pивní pěny a napomáhání její tvorbě.[2, 15]

#### 2.1.1 Chmelové odrůdy

Chmelové odrůdy se podle zastoupení přítomných složek dělí na hořké a aromatické.[2, 12] U skupiny chmelů hořkých se zavedlo další rozdělení chmelových odrůd podle obsahu  $\alpha$ -kyselin, hlavních přispěvatelů na hořkosti piva, na tzv. „bittering-hops“, „high-alpha“ a „super-high-alpha“ odrůdy. V době sklizně se podíl  $\alpha$ -kyselin v hořkých odrůdách pohybuje mezi 10 – 20 %, zatímco v aromatických okolo 2 – 10 %. Nejvyužívanějšími hořkými odrůdami na trhu jsou Hallertauer Magnum, H. Taurus, Herkules, Galena, Nugget, Millenium a CTZ (směs Columbus, Tomahawk, Zeus). Z aromatických jde především o Hallertauer Perle, H. Tradition, H. Mittelfrüh, Spalter select, Hersbruck Hersbrucker, Tettnang Tettnanger, Saaz, Cascade.[2]

Existuje další relativně nové vymezení odrůd chmele, označované jako „flavour hops“. Toto označení vzniklo původně pro pojmenování několika odrůd z USA a v překladu jde o speciální odrůdy chmele se specifickým aroma, zejména vhodné pro studené chmelení.[2]

Chmele se specifickým aroma jsou odrůdy dodávající pivu výrazné aroma a velmi charakteristické příchutě. Chuťový profil těchto odrůd je tropický a ovocný.[2] Na rozdíl od hořkých a aromatických odrůd, tyto specifické odrůdy mají zpravidla velmi široké zastoupení  $\alpha$ -kyselin, a na tento parametr u nich proto nebývá dbáno.[2, 12] Vzhledem ke složitosti a komplexnímu složení specifických aromatických odrůd dosud nevznikla žádná jejich vědecká definice, nicméně bylo navrženo, že mohou být interpretovány jako jak hořké, tak aromatické. Naopak odrůdy, které byly tradičně klasifikované mezi výše zmíněné dvě skupiny, mohou nyní spadat i pod tuto skupinu.[2]

Konkrétními zástupci těchto speciálních odrůd jsou dle původu např.:

- německé Polaris, Hallertauer Blanc, Mandarin Bavaria, Hüll Melon
- americké Cascade, Simcoe, Centennial, Citra
- australské Summer, Topaz, Vic Secret.[2]

První chmelovou odrůdou se specifickým aroma vypěstovanou v ČR je Kazbek s hodnotami  $\alpha$ -kyselin v rozmezí 5,0 – 8,0 %, beta-kyselin 4,0 – 6,0 % a 1,0 – 1,5 g silic ve 100g chmele.[3]

### 2.1.2 Analytické složky chmele

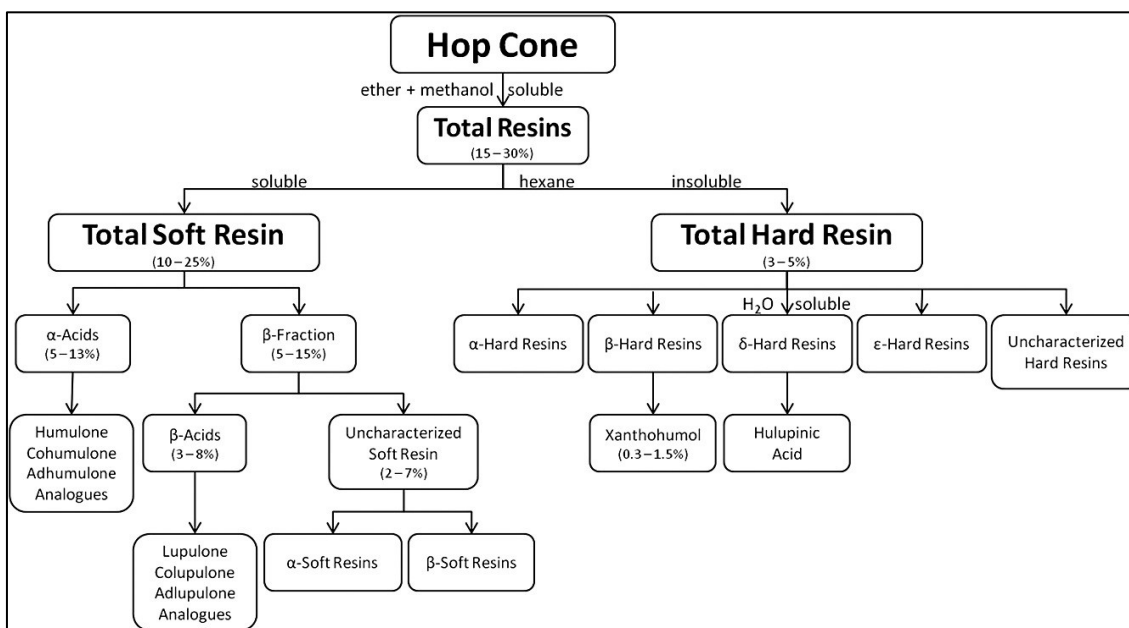
Jako první popsal složení vzduchem sušených chmelových šištic Howard (Tab. 1).[2]

**Tab. 1 – Průměrné chemické složení sušených chmelových šištic**  
Údaje ze zdroje [2, 16]

Složka	Hmotnostní zastoupení (%)
Celulóza atd.	43
Celkové pryskyřice	15 - 30
Vosky a steroidy	0,01 - 25
Proteiny	15
Voda (vlhkost)	10
Popílek	8
Taniny (polyfenoly)	4
Esenciální oleje (silice)	0,5 - 3
Monosacharidy	2
Pektiny	2
Aminokyseliny	0,1

## Celkové pryskyřice

Celkové pryskyřice jsou tvořeny pryskyřicemi tvrdými a měkkými (Obr. 1). Je to ta část etherového extraktu rozpustná v metanolu a diethyletheru.[2, 16, 17] V sušených chmelových šišticích je zastoupena ve škále 15 – 30 % hm. v závislosti na odrůdě, podmínkách růstu a době sklizně.[2]



**Obr. 1 – Klasifikace chmelových pryskyřic**  
Převzato z [2]

### 2.1.2.1 Měkké pryskyřice

Sloučeniny této skupiny jsou rozpustné v hexanu a zastupují je hořké alfa- a beta-kyseliny, které doposud nebyly nalezeny v žádné jiné rostlině.[14, 16] Dále do této skupiny spadají necharakterizované měkké pryskyřice, které doposud nebyly identifikovány žádnou konkrétní sloučeninou.[2, 16]

$\alpha$ -kyseliny jsou z této frakce snadno oddělitelné vytvořením nerozpustné olovnaté soli. Do šedesátých let dvacátého století se věřilo, že se frakce  $\alpha$ -kyselin skládá pouze z jediné sloučeniny známé jako humulon, později se však ukázalo, že jde o analogickou řadu (Obr. 2 – Vybraní zástupci uhlíkaté frakce silic).[2] Tyto sloučeniny jsou z pivovarnického hlediska nejdůležitější složkou chmelových pryskyřic. Po přidávku chmele do díla na varně dochází z velké části k jejich

extrakci a tepelné přeměně na ve vodě rozpustnější a hlavně více hořké iso-  $\alpha$ -kyseliny.[2]

### **Iso- $\alpha$ -kyseliny**

Iso- $\alpha$ -kyseliny, neboli isohumulony, jsou hlavními poskytovateli hořkosti piva.[12] I přesto, že se na hořkosti podílí i další složky chmele, mezi něž patří např. polyfenoly či oxidační produkty  $\beta$ -kyselin zvané hulupony[2], Meilgaard udává, že za hořkost výsledného produktu zodpovídají až z 85 % právě IAA. [18] Mezi další přínosy patří pozitivní vliv na celkový chuťový vjem piva, na tvorbu a stabilitu pивní pěny a vykazují také bakteriostatické vlastnosti. Snadno podléhají degradaci na světlo, proto je dbáno na způsoby uchovávání piva, přestože je jejich obsah stabilizován. Během kvašení se totiž asi třetina množství IAA z mladiny vysráží, i tak se ale jejich hodnoty v hotovém pivu pohybují mezi 10 – 100 mg/l s prahovou hranicí vnímání hořkosti 6 mg/l ve vodě.[12–14]

Nejpoužívanější technikou ke stanovení IAA v pivu je HPLC s UV-Vis či MS detekcí, výsledek je pak obvykle udáván v jednotkách IBU, přičemž 1 IBU = 1 mg(IAA)/l piva (ppm).[12, 17]

$\beta$ -frakce je směs  $\beta$ -kyselin a necharakterizovaných měkkých pryskyřic.  $\beta$ -kyseliny (lupulony) jsou v porovnání s  $\alpha$ -kyselinami nejen méně kyselé a více náchylné k oxidativní degradaci [14, 16], ale i méně sledovaným parametrem z důvodu jejich špatné rozpustnosti ve vodě a nízkého stupně extrakce do piva; během vaření totiž nepodléhají isomeraci.[2] Jako první  $\beta$ -kyselina byl roku 1863 objeven lupulon, jeho další analogy – stejně tak jako v případě humulonu – byly však ve chmelu dokázány až v 60. letech 20. století.[2]  $\beta$ -kyselinám byly prokázány antimikrobiální vlastnosti (např. proti *H. pylori*).[19]

### **2.1.2.2 Tvrdé pryskyřice**

Tvrdé pryskyřice je část celkových pryskyřic nerozpustná v hexanu, vyjadřovaná jako rozdíl celkových a měkkých pryskyřic.[2, 16, 17] Udává se existence dvou typů tvrdých pryskyřic ve chmelu – ty přirozeně se vyskytující a ty, které vznikly oxidací měkkých pryskyřic během sušení či skladování chmele, nicméně doposud nebylo vymezeno žádné vědecké rozložení těchto skupin.[2]

Nejvíce zastoupená část tvrdých pryskyřic je jejich  $\beta$ -frakce v čele s xanthohumolem, který vykazuje příznivý vliv na zdraví, nicméně má

tato frakce jen velmi malou pivovarnickou hodnotu, neboť během varu degraduje.[2, 16]

To samé se ale nedá tvrdit o delta-frakci, která vykazuje dobrou rozpustnost ve vodě, hořkost a bakteriostatické účinky.[16] Frakce je majoritně zastoupená nehořkou huluponovou kyselinou, finálním produktem oxidace  $\beta$ -kyselin.[2] Zpravidla se do delta-frakce zařazují i autooxidační intermediáty  $\beta$ -kyselin hulupony, nicméně kategorizovat je není snadné, neboť jsou rozpustné ve všech organických kyselinách, což by je řadilo do měkkých pryskyřic. Hulupony se také vyskytují jako směs analogů, a to v koncentraci mezi 0,5 – 3 % sušených šištic. Vykazují vyšší hořkost, avšak přínos na hořkosti piva je okolo 5 %, neboť jich velká část zůstane ve vyextrahovném chmelu.[2]

Eta-frakci byly přisouzeny antimikrobiální účinky a dokázána hořkost až šestkrát vyšší než delta-frakce.[2]

### **2.1.2.3 Polyfenoly**

Polyfenoly jsou látky flavonoidové struktury [13] a lze je v pivu nalézt v koncentracích 100 – 180 mg/l.[14] Zastoupením pocházejí ze dvou třetin ze sladu, z jedné třetiny jsou chmelového původu.[12] Chmelové polyfenoly zajišťují jak hořkost, tak trpkost piva, v závislosti na stupni polymerizace.[2] Nepodílí se ale pouze na příspěvku hořkosti a aroma, ale také je jim přisuzován podíl na plnosti piva, jsou přírodními antioxidanty, protizánětlivými a antimikrobiálními látkami a hrají svou roli v tvorbě nebiologického zákalu piva, který omezuje skladovatelnost lahvových piv.[16, 17, 19]

### **2.1.3 Chmelové silice**

Chmelové silice jsou podle definice těkavá část chmelových hlávek [2], která se během varu mladiny buď úplně vytrácí, nebo se přemění na deriváty poskytující pivu typické chmelové aroma.[14, 16] Testováním chuti Howard a Stevens zjistili, že koncentrace silic již 1 ppm je chutí detekovatelná ve vodě, ale v nechmeleném pivu zhořčeném isohumulony je detekční limit přibližně až 3 ppm.[16]

Celkové zastoupení silic v usušeném chmelu se pohybuje mezi 0,5 – 3,0 % hm. [2] v závislosti na odrůdě, podmínkách růstu, zralosti v čase sběru, způsobu zacházení a uchovávání.[2, 18]. Uvádí se, že ve frakci silic lze nalézt až přes 400 sloučenin, z nichž 70 % zastupují terpenické uhlovodíky.[2, 12]

Jako první provedl systematickou studii Chapman, který mezi lety 1895 – 1929 popsal mimo jiné přítomnost myrcenu, humulenu, karyofylenu, linaloolu,

geraniolu.[2, 16] Další důležitá studie byla provedena Šormem a spol., kteří analyzovali silice žateckého chmele, kde se jim podařilo izolovat farnesen a 2-undekanon.[16] Následovány dalšími objevy, vzniklo roku 1980 konvenční rozdělení silic do tří chemických skupin dle separace na silikagelu: uhlovodíky, kyslíkaté sloučeniny a sloučeniny obsahující síru.[2, 17]

### **2.1.3.1 Uhlovodíky**

Nepolární frakce silic získaná kvantitativní elucí ze silikagelu pomocí petroleje.[16] Tato skupina je dále klasifikována do 3 podskupin – alifatické uhlovodíky, monoterpeny a seskviterpeny. Jde o velice těkavou skupinu látek náchylných k oxidaci a polymeraci. Jejich rozpustnost ve vodě, mladině i pivu je nejen velmi nízká, ale navíc se jich značná část během varu odpaří, tudíž se ve finálním produktu objevují pouze ve stopových množstvích.[2] Terpenické uhlovodíky ale lze do piva importovat za použití techniky pozdního a studeného chmelení.[12]

Mezi běžně se vyskytující **monoterpeny** patří myrcen, ocimen a jeho isomery, alfa-pinen, beta-pinen, limonen, pentan, isopren, oktan aj.[16] Níže jsou popsáni důležití zástupci této podskupiny.

#### ***Myrcen***

Myrcen je povahou monoterpenický uhlovodík, jehož struktura (Obr. 2, str. - 20 -) byla objasněna již v roce 1924.[16] Jde o jednu z nejvíce zastoupených složek chmelových silic, jejíž podíl se pohybuje od 30 do 60 %. [2, 16] Protože se během dozrávání chmele formuje jako jeden z posledních, pravděpodobně reflektuje zralost chmelových šištic. Standardně se však jako ukazatel používá poměr humulen/karyofylen z důvodu jeho konstantní hodnoty a příznačnosti pro danou odrůdu.[17]

Spolu s ostatními monoterpeny je zodpovědný za typickou vůni chmele [2, 20], během studeného chmelení se pak podílí na květinovém, přesněji pak kořeněném či bylinném, charakteru piva [21, 22] a jeho sensorický práh je 13 µg/l ve vodě.[3] I přes jeho vysoké koncentrace jak ve chmelu, tak pivu, během pivovarnického procesu se ztrácí, ve studené chmelených pivech je však klíčovým poskytovatelem chmelového aroma.[22]

#### ***Limonen***

Limonen je zřejmě prekurzorem pro bicyklické monoterpeny, kterými jsou např. alfa- a beta-pinen a možný způsob jeho vzniku je dehydratací alfa-terpineolu. Bývá hojně zastoupen především v citrusech, nicméně

jeho koncentrace ve chmelu a přínos na jeho aroma jsou neopomenutelné.[17] Jak z jeho názvu vyplývá, pivo poskytuje limetkové až pomerančové aroma [21] a vykazuje také antibakteriální, protizánětlivou [4] a repelentní aktivitu.[5]

### ***Pinen***

V pivu jsou v nezanedbatelném množství zastoupené také alfa- a beta-pinen, s typickým borovicovým aroma, přítomné mimo jiné i v rozmarýnu.[21]

Skupina **seskviterpenů** je méně těkavá než monoterpenická [21] a v chmelové frakci silic je majoritně zastoupená alfa-humulenem (8 – 33 %) a beta-karyofylenem (4 - 22 %), v těsném závěsu s beta-farnesenem (0 – 19 %).[16] Mají vyšší bod varu než monoterpeny, proto eluují až po nich ve své těsné blízkosti. Dochází ale i k případům, kdy beta-farnesen nemusí být detekován, jeho množství je totiž velmi závislé na konkrétní odrůdě.[2]

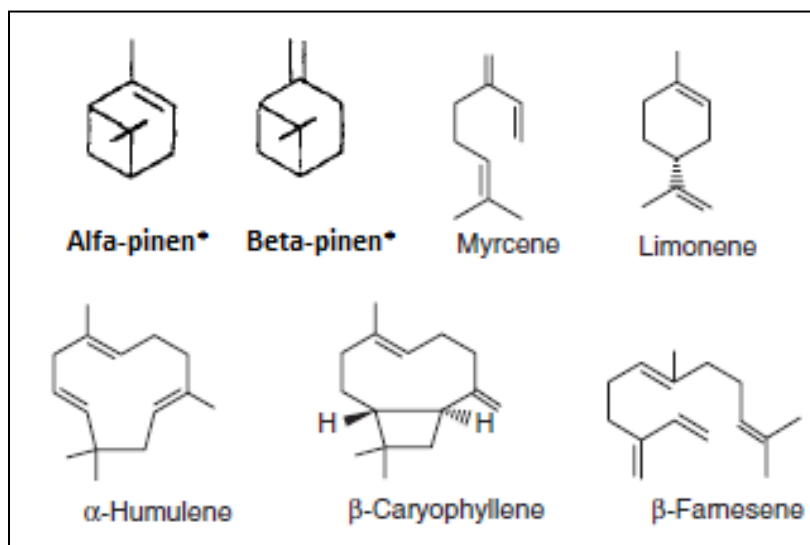
Seskviterpeny mají velmi nízké detekční prahy, udává se, že již koncentrace mezi 0,1 – 1,0 ppm poskytuje pivu příjemné aroma [16], které je popisované jako chmelové kořenité či ušlechtilé.[8] Na druhou stranu, velké procento seskviterpenů během varu piva evaporuje, avšak např. humulen a karyofylen jsou ve chmelu obsaženy ve formě svých epoxidů, které mají větší šanci dostat se do hotového piva, zejména pak postupem studeného chmelení.[3]

### ***Humulen***

Humulen je monocyklickou sloučeninou se třemi dvojnými vazbami (Obr. 2, str. - 20 -). Jako první je jeho izolace připisována Chapmanovi, chemická struktura navržena skupinou českých vědců vedenou Šormem, nicméně správnou podobu dostala struktura humulenu až potvrzením NMR technikou pod vedením Hildebranda, Sutherlanda a Waterse. Vzhledem ke stereochemii má humulen všechny konformace trans. Je identický alfa-karyofylenu, proto označení karyofylen vždy náleží beta-izomeru.  $\beta$ -humulen může být formován z alfa-humulenu kontaktem s oxidem hlinitým. Konverze humulenu do karyofylenu byla také dokázána, avšak za specifických podmínek v přítomnosti vodného acetonu.[16] Pivo poskytuje květinové aroma s trvanatým charakterem, na rozdíl od karyofylenu, který je charakteristický svým kořenitým hřebíčkovým aroma.[21]

### ***Beta-farnesen***

Kvůli blízkým retenčním časům s karyofylenem při analýzách plynovou chromatografií byl farnesen dlouhou dobu označován za jeho izomer, avšak v pozdějších studiích byla jeho identita zcela objasněna.[16] Jak již bylo výše zmíněno, beta-farnesen byl poprvé izolován Šormem a kol. z Žatce.[2] Tato silice je typická pro českou odrůdu chmele Saaz, kde může zaujímat až 30 % všech silic.[20] Farnesen svým aroma připomíná zelená jablka a limetky[21], nicméně mu není přikládán tak velký pivovarnický přínos.[20]



**Obr. 2 – Vybraní zástupci uhlíkaté frakce silic**

V horní řadě jsou vyobrazeny monoterpenické uhlovodíky, ve spodní řadě seskviterpenoidy.

\*Obrázky struktur alfa- a beta-pinenu byly převzaty z [16], ostatní struktury z [12], upraveno v programu Malování 6.3.

### ***2.1.3.2 Kyslíkaté sloučeniny***

Kyslíkaté sloučeniny jsou frakcí silic, kterou lze ze silikagelu eluovat etherem.[16] Přestože je její podíl v celkových silicích zhruba 30 %, jde o frakci zastoupenou velkým počtem sloučenin[2], které díky své polární povaze mají vyšší šanci dostat se do hotového piva [17], avšak většina z nich je přítomna pouze v podprahových koncentracích.[2] Složení této frakce nezáleží pouze na odrůdě, výrazný vliv mají hlavně posklizňové úpravy a skladování, kdy poměr kyslíkatých látek stoupá.[13] Komplexnost této frakce byla poprvé dokázána Howardem, který získal její chromatogram, a i přesto, že prý bylo eluováno necelých 50 % sloučenin, chromatogram byl mnohem komplexnější než ten s frakcí uhlovodíků.[16]

V pozdějších letech byla provedena dokonalejší technikou plynové chromatografie Robertsem řada analýz, které potvrdily přítomnost 26 kyslíkatých složek, z nichž půlka měla vyšší retenční časy než alfa-humulen.[16] Tímto způsobem vzniklo rozdělení kyslíkatých silic na těkavé, s bodem varu nižším než humulen, a netěkavé, jež mají bod varu vyšší než humulen.[2]

Postupně se do praxe zaváděly další techniky, jako například teplotně programovaná plynová chromatografie či klasická plynová chromatografie s kapilární kolonou s hmotnostní spektrometrií, díky nimž se zvyšoval počet objevených kyslíkatých sloučenin. [16] Již v roce 1981 bylo objeveno 60 karbonylových sloučenin, 70 esterů, 50 alkoholů, 25 kyselin a 30 heterocyklických sloučenin.[17]

Howard a Stevens objevili, že kyslíkatá frakce je účinnějším poskytovatelem chmelového aroma pivu než uhlíkatá frakce na základě testování, jehož výsledkem byl sensorický práh 1 ppm pro uhlíkatou frakci a 0,1 ppm pro kyslíkatou frakci ve vodě.[16]

### **Alkoholy**

Alkoholová frakce chmelových silic může být dále dělena na terpenové, seskviterpenové a alifatické/aromatické alkoholy.[2] Pivovarsky nejdůležitějšími by se daly označit terpenické linalool a geraniol, které zodpovídají za květinové aroma piva.[3]

V pivu však původ monoterpenických alkoholů nemusí být nutně chmelový. Bylo dokázáno, že některé monoterpenické alkoholy mohou být syntetizovány a modifikovány mezi sebou (Obr. 3, str. - 22 -) a to zejména působením určitých kmenů potravinářských kvasinek a jejich enzymů.[12, 17, 23] Jako výchozí látky jsou uvažovány estery a glykosidicky vázané prekurzory, ze kterých vzniká geraniol a poté další terpenické alkoholy. Nerol se snadno cyklizuje na alfa-terpineol, stejně tak jako linalool.[17] To však nemusí mít vždy pozitivní dopad na aroma – právě při modifikaci linaloolu na  $\alpha$ -terpineol hrozí nejen změna charakteru aroma, ale také kvůli jeho vyššímu sensorickému prahu klesá intenzita vjemu.[12]

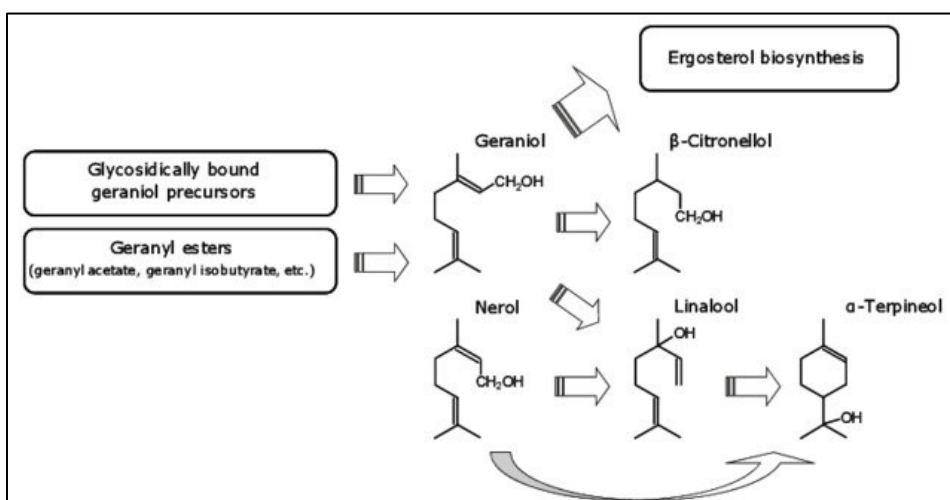
### **Linalool**

Linalool je nejvíce zastoupený terpenový alkohol, objevený Chapmanem již na počátku 20. století.[16] Je to hydratační produkt beta-myrcenu a také chirální sloučenina, jehož R-forma je ve chmelu zastoupena přibližně z 93 % [24] a více sensoricky aktivní s květinovým až citrusovým charakterem s tóny bergamotu a vjemovým prahem 2 – 5  $\mu\text{g/l}$  v pivu.[3,

6, 19, 21] Poměr S- a R- formy linaloolu se během pivovarnického procesu a stárnutí mění ve prospěch S-formy.[19]

### **Geraniol**

Geraniol je typický svým květinovým aroma, připomínající vůni růží [21], ve studeně chmelených pivech však bývá spojován spíše s limetkovým aroma.[22] Geraniol se často podílí na biotransformačních reakcích v pivu – jeho vznik je možný z geranylacetátu či glykosidicky vázaných prekurzorů, častá je však jeho spotřeba kvasinkami a následná přeměna zejména na beta-citronelol.[22, 23]



**Obr. 3 – Struktura a biotransformační přeměny monoterpenických alkoholů během fermentace**

Obrázek převzatý z [23]

### **Karbonyly**

Karbonylové látky neboli aldehydy a ketony se v pivu pohybují mezi 10 – 50 mg/l. Většina těchto látek má negativní vliv na senzorycké vlastnosti piva, dodávají mu starou chuť. V pozdním stádiu kvašení dochází k redukci a vytěkání velkého množství těchto nepříznivých sloučenin.[13]

Jeden z prvních objevených byl Chapmanem (1928) keton 2-undekanone poskytující pivu květinové aroma [2] se senzoryckým prahem 7 ppb [17], nicméně nejvíce zastoupeným je aldehyd acetaldehyd, pocházející z počátečních fází kvašení. Jeho přítomnost může způsobovat jablečnou vůni piva a při zvýšeném množství dodává pivu tzv. sklepní či zeleninovou příchut'. Dalším negativním přispěvatelem na nežádoucích příchutích je keton biacetyl, a to již od koncentrací 0,15 mg/l.[13]

## **Epoxidy**

Nejvíce vyskytujícími se látkami ze skupiny epoxidů jsou oxidační produkty seskviterpenoidů alfa-humulenu a beta-karyofylenu. V pivu nedosahují tak vysokých koncentrací, nicméně díky svým velmi nízkým prahovým hodnotám mají vliv na výsledné sensorické charakteristiky piva.[25] Goiris a kol. došel k závěru, že sensorický práh těchto obohacených seskviterpenoidů frakce silic v pivu je 5 ppb [25], ale panelisté jiné studie se shodují na 20 ppb.[2] Tyto oxidované seskviterpeny propůjčují pivu kořenitý a bylinkový charakter chmele. Nejvíce zastoupenými analyty jsou humulene-epoxid-II a I a karyoflenepoxid.[25]

## **Estery**

Frakce silic je bohatá na velké množství esterů a jejich celkový obsah se v pivu pohybuje mezi 20 – 100 mg/l.[12] Během zrání piva koncentrace esterů může stoupat až dvojnásobně.[13]

Mnohé z nich se zde vyskytují v homologických řadách (např. lineární methylestery).[12] Zdrojem esterů v pivu jsou nejen vstupní suroviny, ale také reakce přeměn sacharidů během kvašení [13] či mohou vznikat jako produkty biosyntézy mastných kyselin.[17] Ty vznikají během dokvašování a způsobují kvasničnou příchut'.[13] V hotovém pivu se však vyskytují v tak nízkých koncentracích, že většinou nemají přímý efekt na impartované aroma, nicméně mohou ho ovlivnit právě tvorbou esterů během fermentace.[17]

Zajímavostí je, že vjemové charakteristiky esterů se mění v závislosti na délce jejich řetězce – od krátkých poskytujících aroma ovoce mírného pásu, po středně dlouhé s vůní subtropického ovoce, po dlouhé estery s tropickými vůněmi.[26]

Asi třetinu veškerého množství v pivu zaujímá ethylacetát, který při koncentracích okolo 5 mg/l poskytuje výraznou ovocnou vůni.[13]

Za signifikantní přispěvatele na ovocném aroma chmele i piva však i přes nižší koncentrace bývají označováni IBIB a IAIB.[13, 23]

Dalšími sensoricky aktivními látkami v sekci esterů jsou methylgeranát a geranylacetát, který může vznikat transesterifikací a jeho sensorický práh je udáván na 9 ppb.[17]

### **2.1.3.3 Sloučeniny obsahující síru**

Zdrojem sirných sloučenin v pivu jsou zejména slad, kvasinky a voda.[13] Chmelové silice sice obsahují pouze stopová množství sirných

sloučenin, ty ale kvůli svým nízkým sensorickým prahům mohou lehce negativně ovlivnit aroma piva.[17] Tam se mohou dostat buď již šířením chmele za účelem ochrany šištic proti chorobám[13] nebo často vznikají během kvašení, ale a v pozdějších fázích piva jsou ze sensorického hlediska nežádoucí, neboť způsobují tzv. letinkovou příchut' piva.[14] Chemicky jde o světelnou degradaci IAA[27] a je často popisována jako světelná či skunková.[14]

Tyto sloučeniny zkrátka poskytují širokou řadu nežádoucích vjemů, mezi něž patří také aroma po vařené zelenině, zkažených vejcích, zelí, spálené gumě, cibulové, také lanýžové či muškátové aroma.[17, 27]

Z pohledu konvenčních technik používaných v pivovarnickém procesu, jen malý podíl z frakce celkových silic se dostane při běžných podmínkách do piva.[16] Děje se tomu kvůli nízkým bodům varu a nízkým rozpustnostem ve vodě, čímž jsou chmelové silice specifické. Nicméně přítomnost silic v pivu lze ovlivnit, záleží totiž na chemických vlastnostech konkrétních silic a použité technice chmelení.[2] Bojovat s těmito ztrátami se dá přidavkem vybraných chmelů do varny během a ke konci varu mladiny nebo postupem studeného chmelení, kdy jsou chmelové produkty přidávány do hotového piva.[16]

#### **2.1.4 Změny složek chmele během dozrávání a stárnutí**

Zralost chmelových šištic silně ovlivňuje výslednou chuť a aroma piva. Z analýz chmelových vzorků během jejich dozrávání bylo zjištěno, že obsah silic s postupným dozráváním v lupulinových žlázách roste, ale začíná až po vývoji pryskyřic. Z pohledu konkrétních zástupců silic, v průběhu dozrávání množství  $\beta$ -myrcenu rapidně roste (je uváděno, že až k 50 % obsahu všech silic), srovnatelně s hladinami jednoho z humulonových analogů, cohumulonu. Předpokládá se tudíž existence společného intermediátu v biosyntéze  $\beta$ -myrcenu a  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin. Na druhou stranu ostatní uhlíkaté silice společně např. s linaloolem či methyl-heptanoátem pozvolna klesají, a obsah  $\alpha$ -humulenu dokonce poklesne skoro o polovinu.[2]

S narůstající dobou skladování chmele se také mění zastoupení jednotlivých složek.[2] Z Meilgaardových analýz vyplývá, že chmel uložený v chladu po dobu jednoho roku ztratí 10 – 50 %  $\alpha$ -kyselin, ale přesto je pokles hořkosti méně než 10%.[18]  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyseliny totiž přirozeně oxidují na necharakterizované měkké intermediáty, kterým je také přisuzována jistá pivovarnická hodnota, nicméně kontinuální oxidace již ústí v přeměnu na tvrdé pryskyřice. V praxi to tedy znamená, že s délkou skladování se snižuje obsah  $\alpha$ - i  $\beta$ -kyselin ve chmelu a roste obsah necharakterizovaných pryskyřic, který se následně začne snižovat s konstantně se zvyšujícím obsahem tvrdých

pryskyřic.[2] Dle Kolbacha lze označovat chmel za „starý“, když zastoupení tvrdých pryskyřic přesáhne 15 % z celkových pryskyřic. Není pravdou, že se všechny frakce tvrdých pryskyřic s dobou skladování zvyšují konstantně. Zatímco např. delta-frakce, resp. kyselina huluponová, se během skladování kumuluje, existuje důkaz, že např. xanthohumol poklesne zhruba třikrát.[16]

Při pohledu na frakci silic si Howard a Slater všimli, že stárnutím chmele se stává bohatší na kyslíkaté látky. Roberts dokonce předvedl, že v kyslíkaté frakci lze nalézt autooxidační produkty seskviterpenů humulenu a karyofylenu, mezi něž patří například bohatě zastoupený karyofylenepoxid.[16] Bylo dokázáno, že tyto oxidační produkty seskviterpenů hrají značnou roli v přidavku chmelového aroma do piva. Epoxidy monoterpenů z chmelových silic izolovány nebyly, ale panují domněnky, že může jít o alkoholové intermediáty v podobě linaloolu, geraniolu, nerolu, běžně se vyskytující v šištících.[17]

### 2.1.5 Chmelové produkty

**Chmelové prášky a pelety** vznikají mechanickou úpravou chmelových hlávek.[13] Usušené hlávky se rozdrtí na jemný prášek, standardizuje se obsah alfa-kyselin a tlakem jsou zformovány do pelet o velikosti zhruba 6x10 mm. Nejvíce používanými jsou pelety Typu 90, což značí, že přibližně 90 % hmotnosti chmele skončí v peletách, Typ 45 je oproti tomu jednou tolik koncentrovanější díky přesetí velkých částic bez pivovarnické hodnoty.[15, 17] Do obliby přicházejí i pelety typu 100, což jsou pouze usušené slisované chmelové hlávky, označované také jako tzv. „hop plugs“.[22]

Výhodou oproti chmelovým hlávkám je vyšší objemová hustota, lepší kontrola nad obsahem alfa-kyselin a vyšší trvanlivost během skladování [15], nicméně nárůstem teploty při lisování může docházet k nepatrným změnám některých složek.[13]

V případě **chmelových extraktů** jsou složky z usušené a namleté matrice extrahovány za použití vhodných, různě polárních rozpouštědel; v první řadě organických, do kterých se vyextrahují pryskyřice, následně vodných či horkou parou pro získání polyfenolového podílu chmele.[5, 13] Složení výsledného extraktu pak závisí právě na použité technice izolace a povaze použitého solventu.[5] Ze zdravotního a ekologického hlediska se jako rozpouštědla používají již výhradně ethanol či oxid uhličitý.[13, 15] V pivovarnictví, a potravinovém průmyslu vůbec, se stávají extrakce za použití superkritického CO<sub>2</sub> (Kapitola 2.1.6.2) velmi využívanou technikou, nejvíce známou např. při dekofeinaci kávy.[5]

Hotové extrakty se mohou během pivovarského procesu přidávat jak během varu, před filtrací, tak i do hotového produktu z důvodu importu

intenzivnějšího chmelového aroma.[12] Na rozdíl od mechanicky vyrobených chmelových produktů je u extraktů výhodou absence dusičnanů, které zůstanou ve vodné fázi.[13, 17]

### **2.1.6 Extrakční techniky používané k izolaci silic**

Na rozdíl od výroby chmelových produktů, k izolaci složek z chmelového materiálu mohou být použita organická rozpouštědla, např. methanol, aceton či diethyl ether, neboť jejich použití není přímo omezeno negativním vlivem na zdraví konzumenta. Nicméně kvůli rozdílům ve složení extraktů a snaze o aplikaci „zelené chemie“ jsou nejčastějšími solventy právě oxid uhličitý, voda a ethanol.[5]

#### ***2.1.6.1 Destilace vodní parou (SD)***

Destilace vodní parou je jedna z prvních metod získání silic z chmelového materiálu. Tkví v principu prohnání páry skrz rozdrcený chmel a následně extrakci silic z destilátu vhodným rozpouštědlem, což v případě 100 g chmele trvalo zhruba 4 hodiny se spotřebou 3 litrů vody.[5] Jelikož při této metodě docházelo k termické degradaci některých silic [22], ve snaze vylepšit tuto tradiční techniku a zvýšit výtěžnost, proběhly mnohé pokusy, mezi nimiž byla například destilace vakuová, aplikace tekutého oxidu uhličitého za pokojových teplot či extrakce jeho superkritickou fází.[5, 17, 22] V dnešní době slouží zejména jako další krok po SCFE k získání koncentrovanějších silicových esencí.[19]

#### ***2.1.6.2 Superkritická fluidní extrakce (SCFE)***

Superkritická fluidní extrakce využívá oxidu uhličitého jako rozpouštědla, což řadí tuto metodu do sekce tzv. „zelené chemie“.[28] SCFE se stala velmi rozšířenou technikou extrakce složek z biologického materiálu[5], dnes je takto vyráběno více než 95 % chmelových extraktů.[19] Je tomu tak z důvodu snadné, přesto silné prostupnosti solventu maticí, minimálním chemickým změnám během izolace, stabilitě vzniklých extraktů a relativně nízkým nákladům spojeným s provedením izolace.[5, 19] Nevýhodou však je jeho omezená aplikace na suché surové materiály a sloučeniny s nízkou polaritou a molekulární hmotností.[5]

Chmelový prášek či rozemleté pelety jsou vloženy do nerezového extraktoru, kam je vstříknut plynný CO<sub>2</sub>. Pracovní podmínky při extrakci jsou tlaky do 200 – 300 barů a teploty okolo 50 °C[17, 19], pod kterými

plyn zkapalní a vyextrahuje z rostlinného materiálu pivovarnicky hodnotné sloučeniny.[28] Po extrakci dojde ke snížení tlaku zhruba na 70 barů, což má za následek zplynění použitého CO<sub>2</sub> a oddělení od extraktu.[19] Použitý CO<sub>2</sub> je obnovený a může být znovu použit.[17]

Tento způsob extrakce je jemnější k rostlinným materiálům a finální extrakty jsou podobnější jeho složení.[28] Obsahují takřka většinu chmelových silic v zastoupení 3 až 12 %, stejně jako dostatečný podíl humulonů (35 – 55 %) a lupulonů (15 – 40 %) a dalších minoritních složek, na rozdíl od extraktů připravených konvenčními metodami, kde se mohou objevovat nežádoucí stopy organických rozpouštědel, nitráty a polyfenoly.[5, 17, 19, 28]

Goiris a kol.[25] použil tuto metodu za účelem extrakce seskviterpenické frakce silic z chmelových pelet za následujících podmínek:

- Přibližně 5 g rozdrcených chmelových pelet nadávkováno do 10ml ocelových nádobek umístěných v termostatu při 50 °C
- Regulátory průtoku oxidu uhličitého nastaveny na 500 ml a teplotu 175 °C
- Sběrání extraktů do skleněných vialek s ethanolem (LC-grade) jako solventem v chladicí cele při 5 °C
- Provedení dvoufázové SCFE extrakce při 50 °C:
  - I. fáze za účelem odstranění více těkavých složek: tlak CO<sub>2</sub> 80 barů, doba extrakce 2,5 hodiny
  - II. fáze do čistých sběrných vialek jímány seskviterpenoidy a jejich kyslíkaté deriváty při tlaku CO<sub>2</sub> 110 barů, době extrakce 2,5 hodin
- Přečištění extraktů SPE za použití 500mg kolonek Varian Bond Elut C18 aktivovaných nejprve 10 ml ethanolu (HPLC-grade), následně 10 ml směsi ethanolu a vody (1:1, v:v, obě komponenty HPLC-grade).
  - Gradientová eluce směsí vody a ethanolu, šestikroková z 50% poměru do 100% zastoupení ethanolu
  - Jímání 6 frakcí po přibližně 3 ml, frakce se 70 % ethanolu bohatá na oxidované seskviterpeny
- GC-FID analýza:
  - interní standard *n*-nonadekan
  - nosný plyn He (1ml/min), on-column dávkování autosamplerem

- Kolona WCOT CP-Sil 5 CB (60 m x 0,25 mm, 1 μm), programovaná teplota termostatu ze 40 °C na 260 °C s krokem 10 °C
- teplota FID 290 °C

Zjištěna byla extrakce všech oxidovaných seskviterpenů, společně se třetinou seskviterpenických uhlovodíků a stopovým množstvím myrcenu a linaloolu.[25]

### **2.1.6.3 Headspace mikroextrakce na pevné fázi (HS-SPME)**

Zatímco SD a extrakce za použití organických rozpouštědel jsou klasickými metodami použitelnými jak pro analytické, tak pro preparativní stanovení, SPME zkracuje dobu extrakce, poskytuje vyšší citlivost a je aplikovaná bez použití rozpouštědel.[4]

Headspace mikroextrakce na pevné fázi byla poprvé představena v devadesátých letech dvacátého století profesorem Pawliszynem a od té doby našla uplatnění v analýzách vzorků vody, vzduchu, půdy i potravin.[4] V současnosti je technikou nejen vhodnou pro charakterizaci aromatických vlastností chmele [5], ale dokonce jednou z nejefektivnějších pro získání těkavých sloučenin z piva. Výhodná je zejména z toho důvodu, že odpadá veškerá příprava vzorku – pivo je vzorkováno rovnou do headspace prostoru injekční jehly s kondicionovaným absorpčním SPME vláknem., na kterém jsou po danou dobu ustálení rovnováhy zachytávány analyty. Nevýhodou je však malá kapacita vlákna spojená s nutností dávkovat malá množství analytu a křehkost taveného křemene.[7]

Takoi a kol.[23] metodou SPME-GC-MS stanovoval v pozdně a studeně chmelených pivech aromaticky aktivní složky chmele (konkrétně IBIB, cis-linalooloxid, ethylheptanoát, linalool, nerol, beta-citronelol, geranylacetát a beta-ionon) za těchto podmínek:

- Do 20ml skleněných vialek bylo odměřeno 8 ml vzorku piva, 80μl ISTD benzylacetátu (100 mg/l), společně s odváženými 3 g chloridu sodného při 0 °C a vialky uzavřeny magnetickým víkem
- Vzorek byl inkubován a míchán 15 min při 40 °C
- Adsorpce byla prováděna za pomoci polydimethylsiloxan/divinylbenzenového vlákna (PDMS/DVB, 65 μm) vloženého do headspace vialky se vzorkem po dobu 15 minut
- Po adsorpci bylo vlákno vloženo do split injektoru (split 2:1, průtok 3 ml/min, 250 °C)

- Vzorek dávkován na GC-MS při podmínkách:
  - Nosný plyn He s průtokem 1,0 ml/min
  - Kolona DB-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm) s teplotním programem začínajícím na 40 °C po dobu 5 min, dále rostoucím na 90 °C krokem 5 °C/min, dále na 120 °C krokem 2 °C/min, následně na 150 °C krokem 5 °C/min a finálně rychlostí 20 °C/min na 320 °C, 3 minuty na cílové teplotě
  - Kvantifikace analytů v SIM módu výběrem fragmentačních iontů analytů, detekce metodou kalibrační přímky pomocí pomocných vzorků piv obsahujících stanovované analyty

Kalibrační závislost všech osmi analytů byla lineární s koeficientem determinace  $> 0,98$ . Metoda však nebyla vhodná pro těkavé thioly, které jsou také velmi důležitými přispěvateli na aroma speciálních odrůd chmele.[23]

#### **2.1.6.4 Fluidní ethanolové lože (FBE)**

Metoda extrakce na fluidním ethanolovém loži je velmi efektivní pro získání sensoricky aktivních látek z rostlinného materiálu. Oproti jiným extrakčním metodám operuje FBE s relativně malým množstvím použitého vzorku, a také nízkým objemem rozpouštědla, čímž je právem označována za zelenou. Dalšími výhodami jsou zkrácení doby samotné extrakce vzorku, čímž se zmenší i riziko tepelných degradací stanovovaných složek.[6]

Do ethanolu se vyextrahuje zejména nepolární podíl tvrdých pryskyřic, silice a chmelové kyseliny, společně s minoritním polárním podílem polyfenolů, solí, proteinů a sacharidů – finální extrakt je tedy složením velmi podobný původnímu chmelovému materiálu.[5, 13, 19]

Štěrbá a kol.[6] v roce 2013 použil tuto metodu ke stanovení linaloolu z namletého sušeného chmele odrůd Agnus, Premiant, Sládek a Saaz za těchto podmínek:

- Na PTFE filtr (42 mm, 10 μm) přidělaný naspod extrakční trubice byly odváženy 2 g rozemletého chmele a přidáno 10 ml interního standardu 3-hepten-1-olu (v koncentraci 25 g/l)
- Spodní nádobka byla naplněna 40 ml ethanolu a přidělána k trubici se vzorkem
- Čtyři extrakční cykly probíhaly následovně:

- Cílová teplota 117 °C, ochlazení mezi cykly na 60 °C, na 40 °C po posledním cyklu, s minutovými přestávkami mezi cykly
- Doba extrakce 7 min pro první cyklus, 6 min pro následující
- Získaný extrakt byl naředěn na 50 ml a přečištěn na EXtrelnut NT 20 kolonce:
  - Kondicionace kolonky 15 min 10 ml ultračisté vody
  - Nadávkování 5 ml získaného extraktu, poté vymýváno 5 x 5 ml směsi hexanu a dichlormethanu (1:1, v:v), jímáno zhruba 10 ml eluátu
- Eluát vysušený bezvodým síranem sodným dávkován na GC-MS při podmínkách:
  - Nosný plyn He (1,2 ml/min), splitless dávkování 1 µl
  - Kolona TG WAX MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) s teplotním programem ze 40 °C do 130 °C s růstem 8 °C/min, 2 minuty na cílové teplotě, poté růst na 230 °C krokem 15 °C/min s 5 minutami na cílové teplotě
  - Detekce metodou kalibrační řady standardu linaloolu a vnitřního standardu

Analýza osmi 4krát měřených vzorků vedla k získání výsledků validačních parametrů linaloolu s opakovatelností 8,0 mg/kg (na 95 % hladině pravděpodobnosti), kombinovanou nejistotou 10,0 mg/kg. Analýza 10 vzorků v koncentraci linaloolu 1 mg/kg vedla k získání hodnoty LOD 1,0 mg/kg a LOQ 3,5 mg/kg. Metoda se ukázala vhodná i pro ostatní silice.[6]

#### **2.1.6.5 Srovnání extrakčních technik**

Ke srovnání uvedených extrakčních technik posloužila studie provedena v roce 2013 Xiem a kol., zabývající se srovnáním extrakčních metod těkavých sloučenin z rostlinného materiálu. Tento výzkum probíhal za použití extrakčních metod destilace vodní parou (SD), headspace mikroextrakce na pevné fázi (HS-SPME) a extrakce rozpouštědlem (SE) na *Exocarpium Citri Grandis* (ECG), slupce plodů z rostliny *Citrus Grandis*. Získané extrakty byly analyzovány pomocí GC/MS. [4]

Pro **destilaci vodní parou** bylo 36 g rozdrčeného vzorku rozmícháno ve 300 ml vody a destilováno po dobu 5 hodin. Malé množství extrahovaného oleje bylo následně zředěno 1 ml *n*-hexanu a dehydrováno bezvodým síranem sodným.

Po 5minutové centrifugaci byl vzorek připraven k chromatografické analýze.[4]

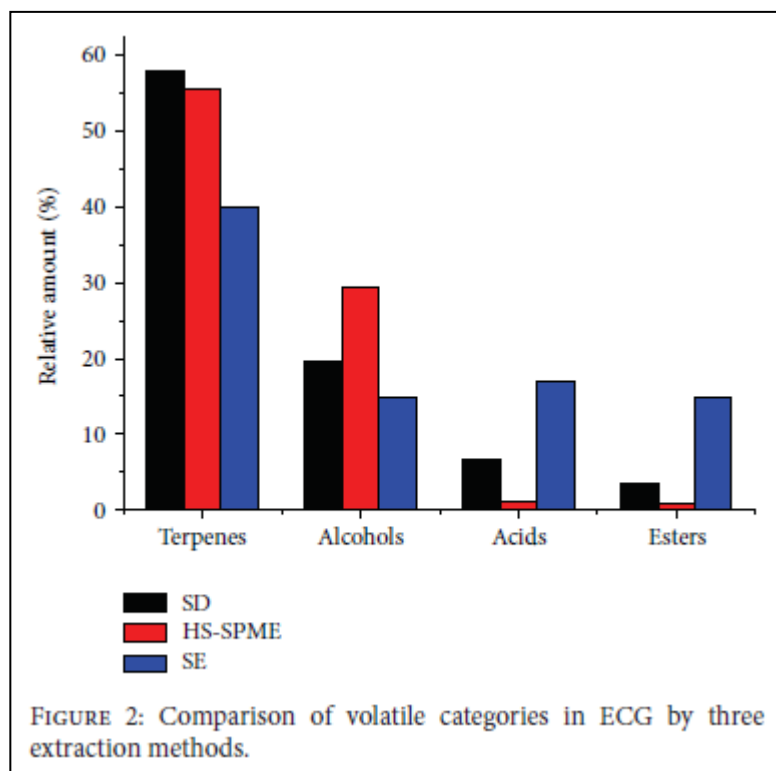
**Headspace mikroextrakce** byla provedena za použití divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxanového vlákna (DVB/CAR/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$ ). Vláknem bylo kondicionováno v GC injektoru po dobu 2 hodin za teploty 280 °C a průtoku nosného plynu 1 ml/min. Vzorek byl rozdrcený a 0,2 g prášku smícháno se stejným množstvím bezvodého síranu sodného v 15ml headspace vialce zaopatřené víčkem se septem. Jehla s vláknem byla vsunuta po dobu 40 minut do headspace vialky vyhřívané na 80 °C. Po ukončení extrakce byla jehla zpět vložena do injektoru plynového chromatografu a analyty desorbovány 2 minuty při 250 °C.[4]

**Extrakce solventem** byla realizována za použití diethyletheru. 3 gramy vzorku byly ve 3 cyklech po 15 minutách za použití ultrazvuku extrahovány diethyletherem (1:10, w:v). Získaný roztok byl odfiltrován a filtrát za sníženého tlaku odpařen v rotační odparce. Extrakt byl vymytý 1 ml směsí bezvodého ethanolu a *n*-hexanu (1:1, v:v) a přefiltrován skrz 0,22 $\mu\text{m}$  membránový filtr. Na kolonu byl nadávkován 1  $\mu\text{l}$  filtrátu.[4]

Analýza GC-MS proběhla na koloně DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) s teplotním programem začínajícím na 50 °C po dobu 1 minuty, následovalo zvýšení na 145 °C s růstem 5 °C/min, poté zvýšení na 175 °C rychlostí 7 °C/min, následně na 195 °C s krokem 5 °C/min a poté rychlostí 3 °C/min až na konečnou teplotu 250 °C, která byla udržována 10 minut. Nosný plyn byl He s průtokem 1 ml/min, dávkování split 10:1. Identifikace proběhla metodou srovnání retenčních indexů s knihovnami NIST.[4]

V *Exocarpium Citri Grandis* bylo v Xieově studii nalezeno celkem 81 těkavých látek (77 metodou SD, 56 HS-SPME a 48 SE, v kombinaci s GC-MS), z tohoto počtu jich je velké množství shodné s těmi vyskytujícími se ve chmelových šišticích.[2, 4, 12] Objevují se zde i stěžejních analyty sledované v experimentální části této práce, jimiž jsou pineny, myrcen, ocimeny, limonen, linalool, 4-terpeineol, alfa-terpineol, geranylacetát a beta-karyofylen. Všechny tyto látky byly nalezeny v extraktech z destilace vodní párou.[4]

Z analytického hlediska byla rozdělena účinnost extrakce těkavých látek pro různé chemické skupiny. Z Obr. 4 převzatého z Xieovy studie je patrné, že destilace vodní parou je nejúčinnější metodou pro izolaci terpenických uhlovodíků, avšak již méně účinná pro extrakci alkoholů a dalších chemických skupin. Srovnatelně stejné výtěžky terpenů s metodou SD vykazuje HS-SPME, zároveň je touto metodou dosaženo nejvyššího výtěžku látek alkoholové povahy. Extrakce za použití rozpouštědla se pak zdá oproti dvěma metodám výhodná pro izolaci kyselin a esterů.[4]



**Obr. 4 – Srovnání účinnosti 3 extrakčních metod dle množství vyextrahovaných látek ECG**

SD – destilace vodní parou

HS-SPME – headspace mikroextrakce na pevné fázi

SE – extrakce rozpouštědlem.

Obrázek převzat z výsledků Xieovy studie [4]

HS-SPME je tedy metoda vhodná pro teplotně labilnější látky, rychlá a účinná, za spotřeby malých množství vzorku, v porovnání se zbylými dvěma šetrná k životnímu prostředí, avšak nákladná.[4]

Destilace parou se nejvíce hodí pro látky těkavé povahy, ovšem poskytuje nezanedbatelná množství ostatních analytů, což dokazuje nejvyšší počet 77 extrahovaných látek. Lze ji použít pro malá i větší

množství vzorku, je relativně levná, avšak její provedení trvá nejdéle a vyžaduje větší spotřebu rozpouštědel.[4]

Extrakce rozpouštědly vykazuje nevhodnější podmínky pro izolaci vysokomolekulárních sloučenin, je také nejméně nákladná, nicméně nevýhodou je použití relativně vysokého množství nešetrných rozpouštědel.[4]

Volba vhodné extrakční metody tedy záleží na účelu pozorování.

## 2.2 Pivovarnictví

Světová produkce piva za posledních 100 let vzrostla sedmkrát. Od roku 1911, kdy bylo vyprodukováno 273 milionů hektolitrů piva, do roku 2013, kdy produkce dosáhla 1960 milionů hektolitrů. Na produkci se od roku 1911 jejím snížením podepsaly nejen obě světové války, ale také uzákonění prohibice v Americe. Od roku 1948 má však produkce piva stálou rostoucí tendenci.[2]

Konstantní zvyšování produkce piva ale není jediný trend, který započal tímto rokem; do čtyřicátých let dvacátého století byla výměra obdělávané půdy s chmelem mnohem vyšší než celkový objem vypěstovaného chmele. Od roku 1948 dosahují menší obdělávané plochy mnohem vyšších objemů sklizní. Tento převrat se připisuje nasazení více produktivnějších odrůd s vyšším obsahem  $\alpha$ -kyselin.[2]

### Česká republika<sup>1</sup>

Česká republika leží v mírném podnebném pásu, který je vhodný k podmínkám pěstování chmele[13], což ji s roční produkcí přesahující 5000 tun chmele řadí na druhé místo v evropském žebříčku producentů chmele hned za Německo.[29] Do první desítky evropských zemí se ČR řadí s ročním celkovým výstavem zhruba 21 milionů hektolitrů piva (spadají sem i piva nealkoholická, nízkoalkoholická a pivní mixy), a také spotřebou necelých 16 milionů hektolitrů, což z ní dělá evropského šampiona ve spotřebě 141 l piva na osobu, která je již po dobu několika let konstantní.[30]

#### 2.2.1.1 Volba Sládků

Tento program Plzeňského Prazdroje vznikl v květnu 2015 v reakci na klesající prodej čepovaného piva v ČR a dával si za cíl přilákat Čechy zpět do restauračních zařízení. V několika stovkách podniků, které si Prazdroj pečlivě vybírá, může zákazník každý měsíc ochutnat jinou limitovanou várku speciálních piv, které nejsou na trhu běžně

---

<sup>1</sup> Data v tomto odstavci jsou platná pro rok 2018.

dostupné.[31] Pro tuto studii byla vybrána dvě druhově různá piva z roku 2019 (Obr. 5).

Pivo B	Pivo A
Obsah alkoholu: 4,1	Obsah alkoholu: 5,3 %
Odpočiňte si u osvěžujícího piva, které bylo speciálně uvařené na léto. Svrchně kvašený Ale nabízí patrné chmelové aroma, které je tvořeno příjemnými ovocnými a citrusovými tóny, díky kterým je pivo výjimečně pitelné. Pivo bylo chmeleno kombinací českého chmele Kazbek a amerického chmele Citra a působí celkově velmi lehkým dojmem s vyváženou hořkostí a sladkostí. Naši sládkci toto pivo uvařili pro pravou letní pohodu, a na vás je si ji s tímto speciálem užít.	Ochutnejte jemně zakalené měděné pivo s krémovou pěnou. Pro vaření tohoto typicky amerického ležáku jsme použili i populární americký chmel El Dorado. Vůně je mírně nasládlá po meruňkách či vodním melounu s lehce kořenitým a sladovým dozvukem. Po napití se projevuje karamelová chuť s plností, která je vyvážená střední hořkostí a ta nakonec mírně převažuje a přechází do středně dlouhého suchého doznívání. Pivo je čisté a vybízí k dalšímu napití.
Na zdraví!	Na zdraví!

### Obr. 5 – Specifikace piv Pivo B a Pivo A

Převzato z [32] (20.5.2020), upraveno v programu Malování 6.3.

## 2.2.2 Proces výroby piva

Tradiční postup výroby piva stojí na čtyřech základních surovinách – vodě, ječmenu, chmelu a kvasnicích. Přestože v dnešním světě jsou pivovarnické technologie upravovány dle potřeb konkrétních výrobců, základní principy zůstávají neměnné.[12]

Výroba počíná přípravou ječmenných zrn, která jsou po máčení, **naklíčení** a usušení označovány jako slad.[19, 33] Slad je dále **šrotován**, aby došlo k oddělení obalu (pluchu) zrna od endospermu (vnitřní části zrna) a jeho narušení.[13] Šrotování a mletí je důležité pro zpřístupnění polysacharidů a enzymů v endospermu fyzikálně-chemickým procesům, které probíhají v dalších fázích výroby.[12, 13]

Další fází je **vystírání** sladového šrotu, jednoduše řečeno smíchávání s vodou za pozdějšího dosažení převedení pivovarnicky hodnotných sloučenin do roztoku. V závislosti na množství a složení šrotu a objemu vody se v pozdějším stádiu výroby získává řidší rmut (5 – 6 hl na 100 kg sypání), volený při výrobě světlých piv, a hustý rmut (4 – 5 hl na 100 kg sypání) s vyšším obsahem extraktu pro výrobu tmavých piv.[13]

Cílem **rmutování** je převést zkvasitelné cukry ze sladu do roztoku za vzniku tzv. sladiny.[13, 33] V této fázi probíhá nespočet reakcí, zejména enzymových, které se dotýkají nejen sacharidů, ale také lipidů (poskytujících karbonylové sloučeniny), bílkovin či polyfenolů.[13] Rmutovací postup může být: dekokční, praktikovaný pro výrobu ležáků, při němž je rmut rozdělen na několik

podílů, které jsou postupně zahřívány, nebo infuzní pro svrchně kvašená či nealkoholická piva, během kterého je slad vystaven enzymům po delší dobu bez mechanických a teplotních úprav.[13]

Po rmutování je sladina upravena **scezením** nebo-li odfiltrováním od mláta, které je poté ještě **vyslazeno** horkou vodou.[13]

Posledním krokem v přípravě mladiny je povaření sladiny s dávkou chmele v technologickém kroku zvaném **chmelovar**. Během chmelovaru se získává cílený obsah extraktu mladiny odpařením přebytečné vody, odpařují se těkavé látky, dochází k inaktivaci štěpných enzymů, isomerují se hořké kyseliny, vznikají produkty reakcí aminokyselin s cukry, zvyšuje se kyselost, steriluje se mladina a vysrážejí se z ní dusíkaté látky.

Nespočet reakcí probíhá během chmelovaru, ať už jde o tepelné přeměny, či interakce jednotlivých složek mezi sebou. Studie těchto reakcí je klíčová pro odhad chuti a kvality hotového piva.[2] V praxi se již upustilo od chmelení celými chmelovými hlávkami, z důvodu praktického se vyrábí pivo za použití chmelových produktů, nejčastěji chmelem mletým, peletami a extrakty.[12, 13] Jejich množství se stanovuje podle obsahu  $\alpha$ -kyselin. U českých piv je tato dávka 18 – 36 mg IAA/l s 25 – 35% výtěžností IAA. Chmelení se provádí v jedné až třech dávkách podle požadovaného typu piva – standardně se chmel přidává na začátku varu sladiny pro dosažení hořkosti, uprostřed nebo ke konci chmelovaru pro import aroma.[12]

K **hlavnímu kvašení** jsou z mladiny ještě za tepla odfiltrovány zbytky chmele a během chlazení na zákvasnou teplotu se současně vylučují kaly.[13, 33] Kvašení probíhá v kvasných kádích spilky za přídavku specifických pivovarských kvasnic, které mají za úkol zkvasit cukernaté látky extraktu mladiny za současné tvorby ethanolu, oxidu uhličitého a dalších metabolitů. Metabolity mohou být vyšší alkoholy (isoamylalkohol, isobutanol), estery (ethylacetát – 5 mg/l – ovocná vůně; isoamylacetát – ovocná vůně), karbonyly, ketony, oxid siřičitý atd. Dále se snižuje pH, barva a obsah  $\alpha$ -kyselin i IAA. Produktem hlavního kvašení je mladé pivo.[13]

Sacharidy v mladém pivu jsou **dokvašovány** při teplotách blízkých nule za pozvolného sycení oxidem uhličitým v ležáckých tancích, kde pivo také **zraje**. V průběhu zrání se mění jeho koloidní stabilita a organoleptické vlastnosti – výrazná hořkost a kvasničná chuť přechází v typický buket zralého piva. Jsou za to odpovědné především alkoholy a hlavně estery, které se během této fáze mohou zvýšit až o 100 %. Dále klesá obsah sirných sloučenin v čele s dimethylsulfidem, sensoricky detekovatelným již při 40  $\mu$ g/l po vaření zelenině. Klesá také acetaldehyd, který při koncentracích vyšších než 6 mg/l poskytuje pivu jablečnou vůni.[13]

Uzralé pivo se **přefiltruje** od kvasnic a jiných kalů, **pasteruje** od mikroorganismů a může být **stáčeno** do transportních nádob.[13, 33]

### 2.2.3 Chmelení zastudena

Hlavním účelem studeného chmelení je obohatit pivo o aromatické látky chmele, a poskytnout tak pivu specifické chmelové aroma.[22] Tuto techniku začali praktikovat Britští pivovarníci přidáváním chmele do sudu nebo tanku s pivem[16] a v současnosti je již stěžejním krokem v technologii výroby určitých pivních druhů, kterými jsou svrchně kvašené ale, IPA.[22, 34] Studené chmelení je však možno aplikovat i za účelem jakéhosi ozvláštnění produktu, nejčastěji ležáků, což se musí promítnout i při technologii.[22]

#### 2.2.3.1 *Technologie studeného chmelení*

Chmel se v případě studeného chmelení dává v množství desetin až desítek g/l piva v závislosti na obsahu silic v použité odrůdě. Chmelit zastudena je možné mnohými chmelovými produkty, nicméně bylo dokázáno, že pelety jsou nejvhodnější volba díky snaze o standardizaci, snadnější skladovatelnosti a neméně důležitému vyššímu prostupu látek než z hlávek.[22] Další možností jsou chmelové extrakty, jejichž dávkování se před fermentační fází udává množství 0,5 – 2 g/hl, před filtrací pak v dávce 0,05 – 0,3 g/hl, podle požadovaných vjemových charakteristik piva.[19]

Účinnost extrakce roste také s vyšší teplotou, avšak maximálně do 20 °C, což odpovídá teplotám zákvasným a během zrání. Podle rozdílů ve způsobech a rychlosti extrakce silic z chmelového materiálu během chmelení zastudena lze metody provedení rozdělit na statické a dynamické.[22]

Během statických metod je chmel nadávkován do propustných obalů a pouze ponořen do nádoby s pivem, kam mohou chmelové komponenty volně difundovat. Důležitou podmínkou je zabránění přístupu molekulárního kyslíku, který může oxidovat chmelové silice a pozměnit tak senzoričkový profil piva. Proto je nutné chmelový materiál nechat v kontaktu s pivem po celou dobu vybraného technologického kroku.[22] Nejčastějšími úseky aplikace chmelení zastudena jsou fáze:

- a) **hlavního kvašení**, kdy je výhodný snížený obsah kyslíku v mladině/mladém pivu, nicméně může docházet ke ztrátám aromatických látek „vynášením“ vznikajícím oxidem uhličitým, změnami během metabolických reakcí kvasinek či jednoduchou sorpcí na jejich povrch[19, 22];
- b) **zrání**, výhodná z hlediska nižšího počtu i aktivity kvasinek a zvýšeno obsahu vytvořeného alkoholu;

c) v případě **hotového piva**. [22]

Při dynamickém provedení extrakce, jak již název vypovídá, je nezbytný pohyb kapaliny skrz vrstvu chmele. Výhodné je zejména z důvodu časové úspory, vyšší účinnosti extrakce aromatických látek a možnost automatizace, nicméně za cenu vyšších nákladů. Používané jsou techniky, při nichž je pivo s chmelem společně recirkulováno či v současnosti stále častěji tzv. chmelové extraktory s filtry pevných částic, přes které je pivo s chmelem za dodržení specifických podmínek přečerpáváno. [22]

### **2.2.3.2 Osud aromaticky aktivních sloučenin v průběhu studeného chmelení piv a jejich skladování**

Jak již bylo řečeno, cílem chmelení zastudena je obohatit pивní produkt o specifické chmelové aroma, které se při vyšších teplotách během chmelovaru ztrácí. Míra přenosu konkrétních pivovarnicky hodnotných sloučenin z chmele do piva, a tím i intenzita aroma a chuti dosažená studeným chmelením, závisí na mnoha faktorech, mezi nimiž jsou hlavně polarita látek a obsah alkoholu v pивu, ale také použitý typ a množství chmele, způsob extrakce, přítomnost aktivních enzymů a kvasinek aj. [22, 34] Zatímco některé zejména ve vodě dobře rozpustné látky se do piva uvolňují snadno (polyfenoly, humulinony,  $\alpha$ -kyseliny), obsah některých sloučenin může během studeného chmelení i klesat, typickým příkladem toho jsou iso- $\alpha$ -kyseliny. Tyto hořké látky dosahují koncentračního vrcholu po chmelovaru, a nejen že se jejich obsah studeným chmelením piva nezvyšuje, ale také je dokázáno, že se z piva ztrácejí adsorpci na chmelový materiál či kvasinky. [34]

Forster a Gahr provedli sadu měření studeně chmelených ležáků různými chmelovými odrůdami za účelem zjištění přechodu vybraných chmelových sensoricky aktivních látek z chmele do piva. Stanovili přenosové míry pro alfa-kyseliny (4 - 5 %), celkové polyfenoly (50 - 60 %), terpenické uhlovodíky (3 %), linalool (100 %) či volný geraniol (50 - 100 % v závislosti na odrůdě). [9]

V novější studii z roku 2019 soustředěné čistě na přesnos aromatických látek chmele během studeného chmelení a změny během stárnutí studeně chmelených, piv reportovali přenosové míry uhlovodíků (< 2 %), esterů (40 - 80 %), linaloolu (80 %) a seskviterpenických alkoholů (10 - 50 %). [11]

Většina silic jsou látky povahy nepolární, proces macerace během studeného chmelení je tedy proces velmi pozvolný, obvykle s nízkým stupněm extrakce.[16, 22] Rozpustnost silic v procesu studeného chmelení je řízená především chemickou povahou analytů, obsahem alkoholu, na jehož zvýšení se může samotný přírůstek chmele podílet, hodnotou pH piva, kdy jeho nižší hodnota způsobuje nižší rozpustnost silic a vyšší adsorpci na kvasinky, a teplotou při chmelení.[10, 22]

Předpokládá se, že charakter piva dokážou ovlivnit pouze vybrané sloučeniny z frakce silic, mezi nimiž byly jmenovány i linalool, myrcen, geraniol a geranyacetát,  $\alpha$ -terpineol a oxidační produkty humulenu. Avšak dokázáno bylo, že pouze linalool, myrcen, geraniol a humulenepoxid II mají znatelný přínos na aroma piva.[19] Tento teoretický příspěvek konkrétních sloučenin k výslednému aroma lze zjistit jako podíl jeho koncentrace a sensorického prahu v pivu.[17]

Jednou z nejdůležitějších sloučenin hrajících roli ve studeném chmelení je výše zmíněný **linalool**. Ačkoli je prokázáno, že pouze samotný linalool a jeho hladiny v pivech přímo nekorrespondují s intenzitou chmelového aroma hotového produktu[8], v případě studeně chmelených piv se vyskytuje ve vysokých koncentracích a zodpovídá za citrusovou složku chmelového aroma, která však může být vlivy synergického efektu geraniolu překryta květinovými tóny.[22]

Dle Forstera a Gahra je přenosová míra linaloolu vyšší než 100 %, nezávisle na odrůdě. Bylo tedy uvažováno, že z chmele se procesem DH do piva přenesou všechny. Nebylo totiž ještě dokázáno, zda se linalool z chmele uvolňuje nejen ve své volné, ale také ve své vázané formě, přičemž by působením kvasnic zvyšoval hodnoty celkového linaloolu [9], tak jako tomu je u geraniolu (níže v textu).[35]

Ve studii vedené Opstaelem byly srovnávány vzorky různě upravených plzeňských piv z hlediska obsahu linaloolu a vybraných seskviterpenů. Sledovány byly vzorky čerstvé, stažené 30 dnů při 30 °C a 60 dnů při této teplotě. Ukázalo se, že u vzorků piv chmelených konvenčně za použití pelet je obsah linaloolu sice až 7krát nižší než u studeně chmelených piv, nicméně jeho hodnoty v pivu po celou dobu stažení zůstávají relativně konstantní, zatímco u vzorků piv studeně chmelených obsah linaloolu s dobou skladování postupně roste až o 30 %.[8] Zde autoři tento jev vysvětlují možným postupným uvolňováním linaloolu za štěpení glykosidických prekurzorů, které byly do piva uvolněny během DH. Studie u konvenčně chmelených piv za použití pelet také potvrdila nárůst linaloolu během fermentace.[8]

**Geraniol** vykazuje během studeného chmelení zajímavé chování. Napříč různými použitými chmelovými odrůdami se může lišit jeho míra přenosu až o 50 %. Forster a kol. to vysvětluje tím, že původ celkového geraniolu není pouze jednoduchou difúzí jeho volné formy z chmele, nýbrž hydrolyzou některých impartovaných chmelových esterů. Během DH se uvolňují i další látky, konkrétně geranylisobutyryát a geranylacetát, které jsou však v hotovém pivu detekovány pouze ve stopových množstvích. Naopak množství celkového geraniolu se přidavkem značně zvýší, což naznačuje přeměnu těchto esterů v geraniol, vysvětlovanou jako výsledek esterázové aktivity zbylých kvasinek.[35]

Skladováním studeně chmelených piv (100 dnů při 20 °C ve tmě) se obsah geraniolu zvyšoval až o 92 %, naopak obsah nerolu a citronelolu se za tuto dobu rapidně snížil.[9]

Jak již bylo vylíčeno v Kapitole 2.1.3.2 na **Obr. 3**, jsou dokázány vzájemné transformační procesy jak linaloolu a geraniolu, tak i dalších monoterpenických alkoholů, které mohou způsobovat nepřesnosti ve stanovení přenosů těchto látek během DH a jejich množství během následného stárnutí.[9]

Mezi další sledované komponenty chmelových silic ve Forsterově a Gahrově studii patřili i další zástupci kyslíkaté frakce. Např. průměrné přechodové míry isobutylisobutyryátu a 2-undekanonu byly podobné a pohybovaly se nad 50 % výtěžky. Extrakce isoamylisobutyryátu byla silně závislá na použité chmelové odrůdě a vykazovala přechody od 40 % do 161 %. U methylesterů je uvažována transformace na méně sensoricky aktivní ethylestery působením kvasinek.[9, 11]

Stárnutí piv, které bylo také součástí této studie, poskytlo zjištění, že sledované estery, spolu s 2-undekanonem, se s dobou skladování ztrácely a jejich úbytky byly více než 50%. Pouze IBIB vykazoval nižší ztráty okolo 20 %.[9] Ve studii Clippeleerové a kol. stárnutí studeně chmelených piv po dobu 16 měsíců při teplotách 20 a 30 °C vzorky vykazovaly značný pokles v obsahu sledovaných esterů, a to dokonce i pod jejich vjemové prahy.[11]

Chemicky odlišnými stěžejními silicemi zažívajícími během DH v pivu nárůst jsou terpenické uhlovodíky. Jejich přechodu z chmele do piva vyhovuje vyšší obsah alkoholu a nižší teploty během extrakce než během chmelovaru.[2, 17] Nicméně stejně lehce dochází k jejich ztrátám přeměnami na své oxidační produkty či ztrátami během procesu výroby, např. sorpcí na hydrofobní povrchy kvasinek, použitý chmelový materiál nebo vynášení oxidem uhličitým, který je se tvoří během

procesu výroby.[19, 22, 34] **Beta-myrcen** má velmi malou přenosovou míru pohybující se v hodnotách pod 0,5 % [9], nicméně díky svému vysokému zastoupení jak ve chmelu, tak v pivu je rovnocenným poskytovatelem chmelového aroma studeně chmeleným pivům.[22] Avšak pouze pivům čerstvým, jak se ve Forsterově a Gahrově studii ukázalo, neboť  $\frac{3}{4}$  jeho původního množství se v pivu skladovaném 100 dnů při 20 °C ztratily.[9]

Ocimen se svými přenosovými mírami naskrz různé chmelové odrůdy lišil, avšak většinou vykazoval relativní přechod v jednotách procent. Se 100denní dobou skladování se jeho obsah snížil zhruba o 70 %.[9]

Přenosové míry seskviterpenů alfa-humulenu a beta-karyofylenu byly ve všech případech pod 1 %.[9] Obsah seskviterpenoidů, sledovaných v Opstaelově studii, s dobou skladování studeně chmelených piv při výše vypsanych podmínkách (vzorky čerstvých piv, stařených 30 dnů při 30 °C a 60 dnů při 30 °C) klesal ve všech vzorcích.[8] Forster a Gahr tyto ztráty pro jednotlivé seskviterpenické zástupce vyčíslily přibližně na 50 %. Objevil se i nárůst v množství oxidačních produktů těchto látek oproti čerstvým pivům, nicméně pouze ve formě karyofylen alkoholu (63%) a **humulenepoxidu II** (3%). Karyofylenepoxid v pivu za 100 dnů při 20 °C klesl o polovinu svého původního množství.[9]

Odlišný pohled na problematiku přenosu silic do piva nabízí studie Hausera a kol., která sledovala množství silic a hořkých kyselin analýzou extrahovaného chmelového materiálu. I přes některé vysoké přenosové míry avizované výše, studie ukázala, že průměrně 50 % z frakce silic zůstává v použitém chmelovém materiálu, což z něj na druhou stranu dělá potenciální zdroj chmelových aromatických látek.[10]

Až 77 % nevyextrahovaných silic zaujímá uhlovodíková frakce, naopak kyslíkatá frakce zůstává ve chmelu pod 10 % původního množství [10], což je ve shodě s výsledky výše zmíněných studií. Dále se Hauser a kol. zaměřil na dva majoritní přispěvatele beta-myrcen a linalool a pozitivně koreloval jejich dávku a koncentraci v pivu. U linaloolu se dále ukázala pozitivní korelace mezi jeho dávkou a poměrem linaloolu zbylém ve chmelovém materiálu ku jeho počáteční koncentraci ve chmelu před DH, což značí, že přílišným zvyšováním dávky chmele během DH se snižuje účinnost extrakce.[10]

Na základě výsledků svých studií, označil Hauser a kol. studené chmelení z hlediska celkových silic za relativně neefektivní proces a navrhl zavedení recyklace použitých chmelových materiálů.

#### 2.2.4 Sensorické stárnutí piva

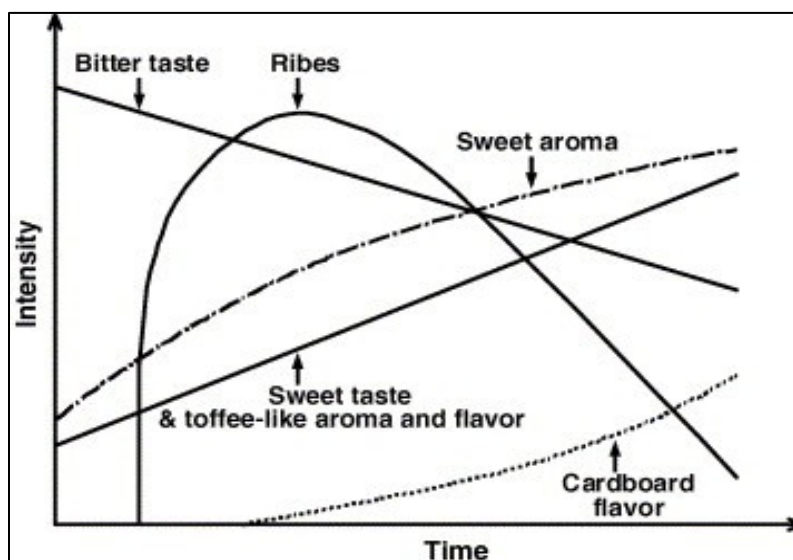
Sensorické stárnutí je negativní jev doprovázející změny obsahu různých složek, kterému podléhá pivo zejména v lahvových a plechovkových obalech. Strukturně patří mezi typické indikátory stárnutí piva karbonyly, zejména aldehydy, které vznikají mj. oxidací alkoholů (acetaldehyd) molekulárním kyslíkem. Stárnutím se patrně zvyšuje také podíl některých esterů, vzniklých degradací iso-alfa-kyselin a interakcí ethanolu s organickými kyselinami. Organoleptické vlastnosti piva jsou pak ovlivněny především interakcí (synergie/maskování) těchto složek, než individuální sloučeninou.[36]

Minimální doba trvanlivosti pivního produktu kolísá mezi několika měsíci a rokem, ale samotná rychlost stárnutí záleží na mnoha faktorech. V první řadě mají na sensorické stárnutí vliv vstupní suroviny a použitá technologie výroby.[36] Bylo dokázáno, že již samotná pasterace (při teplotách kolem 62 °C), která je v pivu označovaná jako chuť oxidační, po chlebu či vařených potravinách, i následovné neenzymatické reakce po pasteraci, mají dopad na vývoj aromanegativních sloučenin. Pokusy předejít změnám sensorické stability během pasterace byly neúspěšné – nepasterované pivo sterilované filtrací mělo sice krátce po stočení nejlepší vjemy, ty se ale během skladování srovnaly s pivem pasterovaným.[13]

Sensorické vlastnosti jsou markantně ovlivnitelné způsobem skladování hotového produktu, a to nejvíce přítomností kyslíku a teplotou, za které je pivo skladováno.[27] Také při dlouhodobějšími vystavení piva světlu vznikají produkty rozpadu hořkých kyselin a sírných zbytků, které jsou detekovatelné v pivu již při 4 – 35 ng/l a nejvíce zodpovědné za již zmiňovanou letinkovou příchuť piva.[14]

Visuálním projevem stárnutí piv je změna barvy na tmavší odstín a tvorba zákalu, nicméně těmto změnám zpravidla předchází chuťové projevy stárnutí.[27] Tyto projevy jako první popsal Dalglish a jsou formou grafu v rozmezí půl roku znázorněny na Obr. 6 (str. - 42 -).[27, 37] Stárnoucí ležáky zpravidla vykazují pokles v intenzitě hořkosti a úbytek ovocného aroma, naopak narůstá sladká chuť a dochází k výskytu nežádoucích vjemů, mezi které patří například letinková příchuť, aroma lepenky, které je kvůli tvorbě karbonylových sloučenin typické pro prošlé ležáky, či pach po kočce (tzv. catty/ribes), což je jeden z typických ukazatelů prošlých piv jak u typu ležák, tak ale. [27, 36] Dále dochází k vývoji jiných nasládlých karamelových, zemitých či vínových vjemů.[36]

Tyto nežádoucí vjemy se mohou objevit již u 2 měsíce starých piv, ale mohou být stejně tak pomíjivé a po 6 měsících v pivu nepatrné. Také neexistuje žádný patern, podle kterého by se dalo sensoricky určit stáří piva nezávisle na pivním stylu – ne všechna prošlá piva totiž vykazují stejný průběh sensorického stárnutí[27], proto je Dalglieshův graf spíše pouze odhad vývoje chuti v průběhu stárnutí průměrného piva.



**Obr. 6 – Sensorické změny piv během doby skladování dle Dalglieshe**

Převzato z [37]

Skladování piva ale nemá pouze negativní dopad na výslednou chuť produktu, pokud je uskutečněno za vhodných podmínek. Například specifické aroma svrchně kvašených piv se vytváří právě během skladování, kdy typické vjemy stárnutí začnou vynikat nad klesajícími aromapozitivními látkami, např. estery nad kvasnicovým aroma. Pivo stárne pomaleji, čím je obsah těchto aromapozitivních látek vyšší. Stárnutím se zde ale také mohou objevovat nepříznivé sýrové až zemité vjemy, za které mají zodpovědnost rozpadající se kvasinky.[13]

## 2.3 Sensorická analýza

Sensorická analýza poskytuje informaci o chuťovém a čichovém vjemu potravin skrze sensoricky aktivní sloučeniny. V potravinách již bylo identifikováno přes 6000 těchto přírodních složek, vyskytujících se v koncentracích od stopových množství v řádech ppt až po desítky ppm. I přesto, že konkrétní potravina může obsahovat až stovky těchto sloučenin, přínos na jejím typickém vjemu jich obvykle má jen pár. Valné množství

jednotlivých sensoricky aktivních sloučenin izolovaných z rostlinných extraktů svým aroma nepřipomíná sensorický profil celé substance, neboť jde o velmi komplexní směs. Sensorické prahy totiž nezávisí pouze na olfaktorických vlastnostech látky a její struktuře, ale také na matrici, ve které jsou testovány. Z tohoto důvodu je stále snaha analyzovat jak samotné látky v čisté formě, s definovanými přísadami standardů, tak suroviny, u nichž se tyto látky podílí na vjemovém charakteru.[7]

### 2.3.1 Sensorická analýza vs. analytické metody

Aroma a příchut' potravin mohou být stanoveny několika způsoby; analytického hlediska jde nejčastěji o SPME následovanou GC-MS analýzou sensoricky aktivních látek z extraktu. V dnešní době lze stanovit i velmi nízká množství strukturně rozličných látek, ale stále není možno čistě analytickými metodami s jistotou určit, které z látek mají opravdový přínos na výsledném vjemu analyzované substance. Proto existuje druhý přístup, který pomáhá interpretovat přístrojová data – sensorická analýza.[7]

Sensorické testování je založeno na značně odlišných principech než analytické stanovení. Trénování senzoričtí hodnotitelé během zkoušení posuzují předmět zkoumání na základě subjektivních celkových vjemů a snaží se odhadnout nejen chuť a aroma testované potraviny, ale také zhodnotit intenzitu vjemu na dané stupnici.[7] Oproti analytickým analýzám má několik výhod:

- před sensorickou analýzou není třeba náročných manipulací se vzorkem, tudíž nehrozí např. nedostatečná extrakce či tepelná degradace látky nesoucí vjemové charakteristiky
- konkrétní sensoricky aktivní látky mohou být ze strukturního hlediska různorodé a k jejich stanovení je třeba využití i několika chromatografických technik
- dokáže detekovat sensoricky aktivní látky s extrémně nízkými vjemovými prahy, ale v koncentracích pod limity detekce zvolené metody
- nedokáže předpovědět synergické působení více sloučenin, a tak – na rozdíl od sensorické analýzy – nemůže poskytnout komplexní informace o potravíně, zejména z konzumentského hlediska.

Nevýhodami jsou pak finanční i časové náklady spojené nejen s realizací samotné analýzy, ale také s výcvikem hodnotitelů pro zajištění statisticky významných výsledků.[7] Vhodné je tedy spojení výsledků sensorického testování s výsledky chromatografické analýzy.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

chmele odrůdy *Kazbek*, *Citra*, *Eldorado*

*Pivo A* a *Pivo B* z Volby sládků (Kapitola 2.2.1.1)

standarty (Sigma-Aldrich, Česká republika)

- vnitřní standard cis-3-hepten-1-ol ( $\geq 97\%$ )
- analytické standarty silic k přípravě kalibračních roztoků:

alfa-pinen ( $\geq 97,0\%$ )	isobutylisobutyrate ( $\geq 98\%$ )
beta-pinen ( $\geq 99\%$ )	methylhexanoát ( $\geq 99,8\%$ )
myrcen ( $\geq 90,0\%$ )	isoamylisobutyrate ( $\geq 98\%$ )
limonen (97%)	ocimen ( $\geq 90\%$ )
methylheptanoát ( $\geq 99,8\%$ )	2-nonanon ( $\geq 99,5\%$ )
linalool ( $\geq 95,0\%$ )	methyloktanoát ( $\geq 99,8\%$ )
4-terpineol ( $\geq 98,5\%$ )	methylnonanoát ( $\geq 99,8\%$ )
beta-karyofylen ( $\geq 98,0\%$ )	2-dekanon ( $\geq 99,5\%$ )
trans-beta-farnesen ( $\geq 90\%$ )	methyldekanoát ( $\geq 99,0\%$ )
alfa-humulen ( $\geq 96,0\%$ )	2-undekanon ( $\geq 99\%$ )
alfa-terpineol ( $\geq 97,0\%$ )	methylgeranát ( $\geq 90\%$ )
cis-geraniol ( $\geq 90\%$ )	2-dodekanon ( $\geq 98,5\%$ )
alfa-ionon ( $\geq 90\%$ )	geranylacetát ( $\geq 99,0\%$ )
beta-ionon ( $\geq 95,0\%$ )	2-tridekanon ( $\geq 97,0\%$ )
alfa-ionon ( $\geq 90\%$ )	farnesol ( $\geq 90\%$ )
beta-karyofylenepoxid ( $\geq 99,0\%$ )	

destilovaná voda

dichlormethan:*n*-hexan (oba Merck, Německo) – směs 1:1 (v/v), dále jen  
DCM:hexan

ethanol 96% G.R. (Lach-ner, Česká republika)

silikonová pasta

síran sodný bezvodý p.a. (Lach-ner, Česká republika)

### 3.2 Materiál

baňky odměrné se zábrusem 50ml, 100ml, 250ml, A

držáky patron

filtry PTFE extrakční o průměru 42 mm s velikostí pórů 10  $\mu\text{m}$

kádinky

kapátka skleněná

kleště na patrony kovové

kolona kapilární TG-WAXMS (Thermo Scientific, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm, tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$ , polární

kolonky EXtrelut NT 20 (Merck Millipore, USA)

lžičky kovové

míchadélka

nálevka

parafilm

patrona extrakční skleněná, 300ml

pipety – dělené 1ml, 5ml, 10ml, A  
– nedělené 10ml, A

stříkačka Hamilton 25 $\mu\text{l}$ , 500 $\mu\text{l}$

tyčinka skleněná

válec odměrný 50ml

vialky 2ml, opatřené inzertem

### 3.3 Přístroje a programy

analytická váha (AND, Japonsko)

destilační systém Distillation Unit K-350 (Büchi, Švýcarsko)

extraktor fexIKA vario kontrol (IKA-WERKE GmbH, Německo), jehož součástmi jsou:

- míchadlo IKAMAG – RET kontrol
- chladicí a topný blok KH 135.2
- skleněná sada GF 260
- stojan a kontroler KHS 1
- elektronický distributor G700
- teplotní čidlo Pt 100.52

chladič oběhový Julabo FL 601 (JULABO GmbH, Německo)

mlýnek Bosch

plynový chromatograf s hmotnostním detektorem: Trace GC Ultra & DSQ II (Thermo Scientific, USA) s datovým systémem Thermo Xcalibur 2.1 (Thermo), databáze NIST MS Search version 2.0d 2005

předvážky (Mettler Toledo, Švýcarsko)

software Labworldsoft 4.7

### 3.4 Pracovní postup

#### 3.4.1 Příprava vnitřního standardu a kalibračních roztoků

Pro přípravu vnitřního standardu do kalibrační směsi pro chmel (ISZL-ch) bylo do 50ml odměrné baňky na analytických vahách teoreticky naváženo 0,05 g analytického standardu cis-3-hepten-1-olu (Sigma-Aldrich) a doplněno po rysku směsí DCM:hexan. Pro pivo byl vnitřní standard pro kalibrační řadu (ISZL-p) připraven odvážením teoretické navážky 10 mg do 100ml odměrné baňky a doplněn DCM:hexan.

Pro přípravu vnitřního standardu určeného do vzorků chmele (ISTD-ch) bylo do 50ml odměrné baňky na analytických vahách teoreticky naváženo 1,25 g analytického standardu cis-3-hepten-1-olu a doplněno po rysku 96% ethanollem.

Obdobně pro vnitřní standard určený k přidavku ke vzorku piva (ISTD-p) bylo na analytických vahách do 100ml odměrné baňky teoreticky odváženo 10 mg výše zmíněné látky a po rysku doplněno 96% ethanolem.

Kalibrační roztoky pro stanovení silic ze vzorku chmele byly připraveny z analytických standardů (Sigma-Aldrich) teoretickou navázkou 0,05 g do 50 ml baňky. Z důvodu vysokého množství analytů se připravují dva základní roztoky, každý zhruba s polovinou strukturně podobných silic. Tyto dva základní roztoky byly po odvážení silic na analytických vahách naplněny po rysku směsí DCM:hexan a po promíchání bylo z každého odebráno do čtyř 50ml baněk po: 5 ml, 2,5 ml, 0,5 ml a 0,05 ml. K těmto 4 roztokům bylo přidáno 0,5 ml roztoku ISZL-ch a roztoky doplněny po rysky DCM:hexan pro vytvoření kalibrační řady.

K přípravě kalibračních roztoků pro stanovení silic v pivu byly použity tytéž analytické standardy a podobný postup jako pro stanovení chmele. Způsob provedení se odlišoval přípravou dvou základních roztoků, a to teoretickou navázkou standardů v množství 10 mg do 100ml odměrných baněk. Po odvážení byly tyto baňky opět doplněny po rysku směsí DCM:hexan a obsah pečlivě promíchán. Z těchto dvou základních roztoků bylo nejdříve odpipetováno 0,5 ml od každého do 50ml baňky pro přípravu kalibračního roztoku o nejvyšší koncentraci silic, který byl doplněn DCM:hexan po rysku a z něhož bylo dále odpipetováno po: 5 ml, 2,5 ml a 0,5 ml do 50ml odměrných baněk pro vytvoření zbývajících roztoků kalibrační řady. Před doplněním roztoků po rysku bylo do těchto tří roztoků odměřeno 250  $\mu$ l IZSL-p. Do kalibračního roztoku o nejvyšší koncentraci pouze 210  $\mu$ l již bez doplňování DCM:hexan.

### 3.4.2 Příprava vzorku chmele

Usušené chmelové šišťice byly v mlýnku Bosch rozemlety na jemný prášek, ze kterého bylo pomocí předvážek odváženo množství 2,0 g do extrakční trubice s extrakčním filtrem naspod. V dalším kroku bylo na prášek aplikováno 10  $\mu$ l ISTD-ch. Do spodní nádoby bylo vhozeno míchadélko a zalito 40 ml 96% ethanolu. Extrakční trubice se vzorkem byla našroubována ke spodní nádobě a z vrchu připojena ke kondenzačním zařízením. Extrakce vzorku probíhala pomocí extraktoru fexIKA vario kontrol, chladič Julabo FL 601 zajišťoval oběh chladicí kapaliny o teplotě  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Extrakce chmele na ethanolovém loži probíhala za kontroly software Labworldsoft 4.7 ve čtyřech cyklech – první cyklus sedmiminutový, následující 3 šestiminutové. Maximální teplota byla nastavena na  $117\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tzn. 1,5násobek

bodů varu ethanolu, chlazení mezi cykly dosahovalo 60 °C, po posledním cyklu byla směs zchlazena na 40 °C.

Extrakt z ethanolového lože byly doplněny ethanolem po rysku 50ml baněk, přečištěny a nakoncentrovány na kolonkách EXTrelnut NT 20, nejdříve zvlhčených destilovanou vodou. Po nanesení 5 ml extraktu byly analyty vymývány 5 ml směsí DCM:hexan v pěti cyklech s pětiminutovými přestávkami mezi cykly. Do kádinek s malým množstvím síranu sodného bylo jímáno zhruba 10 ml eluátu, jež byl dávkován do vialek s teflonovým septem. Takto připravený vzorek bylo možné v horizontu několika dní uschovat v mrazáku.

### 3.4.3 Příprava vzorku piva

Extrakce silic z piva byla prováděna metodou destilace vodní parou, kdy byl odměřen 50ml vzorek piva společně s 25 µl ISTD-p do extrakční patrony otřené silikonem. Pivo v patroně bylo pomocí destilačního systému Distillation Unit K-350 destilováno s vodní parou po dobu 2 minut (přívod páry 100 %) a extrakt jímán do ledem chlazené 250ml odměrné baňky s 10 ml směsí DCM:hexan. Do jedné 250ml baňky byl jímán extrakt ze dvou 50ml vzorků identického piva.

Baňky s extraktem byly uzavřeny zátkami, zajištěnými parafilmovou fólií, a po dobu jedné hodiny vystaveny 250 otáčkám za minutu na třepačce. Následně byly vzorky ponechány nejméně jednu hodinu v chladničce. Nepolární fáze byla nazdvihnuta destilovanou vodou a poté dávkována do vialek s teflonovým septem.

### 3.4.4 Chromatografická analýza s hmotnostní detekcí

Stanovení analytů ve vzorku chmele bylo provedeno na přístroji Trace GC Ultra s hmotnostním spektrometrem DSQ II.

#### Podmínky:

Nosný plyn He o čistotě 5.0 s průtokem 1,2 ml/min;

Dávkování splitless, doba otevření děliče 1 minuta s celkovým průtokem 50 ml/min, teplota vstřikovávání a transfer line 250°C, objem nástřiku 1 µl;

Přístroj Trace GC Ultra DSQ II;

Kolona kapilární TG WAX MS, polární; teplota nastavena na přechod ze 45 °C po 2 minutách na 100 °C rychlostí 10 °C/min a dále zvýšena na 230 °C rychlostí 15 °C/min a konečnou dobou trvání 6 minut;

MS detektor: zdroj vyhříván na 200°C.

Sběr dat byl prováděn systémem Xcalibur (GC-MS), ve kterém byla následně metodou vnitřního standardu vyhodnocena spektra a zaznamenány naměřené hodnoty.

### 3.4.5 Vyhodnocení

Data z chromatografické analýzy byla sbírána software Xcalibur (GC-MS). Analyty byly identifikovány dle svých hmotnostních spekter s případnými dodatečnými úpravami na základě podobnosti retenčních časů. Stanovení proběhlo výpočtem obsahu analytů ve vzorku za použití metody vnitřního standardu cis-3-hepten-1-olu a kalibrační řady roztoků analytických standardů.

Data chromatografické analýzy byla statisticky zpracována na 5% hladině významnosti, odlehlé výsledky vyloučeny. Výsledek reprezentoval medián s rozšířenou nejistotou vyjádřenou jako dvojnásobek variačního koeficientu.

## 3.5 Výpočet validačních parametrů

Pro ověření vhodnosti metody byla provedena tzv. retrospektivní validace – z naměřených dat byly vypočteny konkrétní validační parametry, mezi nimiž byla přesnost, opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti metody, spolu s uvedenými nejistotami výsledků.

K validaci metody pro stanovení silic v pivu byly použity výsledky měření vzorků Piva A, a to jak v jeho čerstvé formě (měřeno v září 2019), tak jako tři měsíce (měřeno v listopadu 2019) a šest měsíců (měřeno v únoru 2020) staré vzorky skladované v sudech při laboratorní teplotě. Výpočet pro různě stará piva byl proveden celkem ze 12 měření – 3 stejně starých vzorků ( $m = 3$ ) po 4 paralelních stanoveních ( $n = 12$ ) pro 95% hladinu významnosti.

Z 12 naměřených hodnot byl za použití programu MS Office Excel 2007 vypočten medián ( $Med$ ) a výběrová směrodatná odchylka stanovení ( $s_i$ ) pro každý ze tří vzorků jednoho stáří. Z výběrových směrodatných odchylek výsledků jednotlivých vzorků ( $s_1, s_2, s_3$ ) byla vyvozena celková výběrová směrodatná odchylka ( $s$ ):

$$s = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}{3}}.$$

Z těchto dvou parametrů byl vypočten variační koeficient ( $RSD$ ) dle vzorce:

$$RSD (\%) = \frac{s}{Med} \times 100,$$

který posloužil ke stanovení opakovatelnosti ( $r$ ) na hladině 95% pravděpodobnosti:

$$r = RSD \times 2,8.$$

Meze detekce a stanovitelnosti byly vypočteny z celkové výběrové směrodatné odchylky ( $s$ ), a to jako její třinásovek v případě meze detekce, a desetinásobek v případě meze stanovitelnosti.

Validační parametry metody stanovení silic ve chmelu byly počítány z hodnot vzorku chmele Kazbek, použitého k výrobě Piva B. Měření chmele se uskutečnilo v červnu 2019. Způsob výpočtu byl identický výše uvedenému pro metodu silic v pivu, nicméně k dispozici byl pouze jeden vzorek změřený čtyřikrát ( $m = 1$ ,  $n = 4$ ). Na rozdíl od silic v pivu, zde byl pro srovnání poskytnut záznam VÚPS z roku 2015 z měření validačních parametrů několika stanovovaných analytů na třech vzorcích v celkovém počtu 30 měření ( $m = 3$ ,  $n = 30$ ).

### 3.6 Výpočet parametrů přenosu silic v rámci studeného chmelení

Z naměřených dat chmele, dávky použité ke studenému chmelení, piva před studeným chmelením a po studeném chmelení byl vypočítán přírůstek množství každého analytu ( $A$ ) v pivu a vyjádřen procentuálně formou **míry přenosu** v rámci studeného chmelení ( $P_{DH}$ ):

$$P_{DH,A}(\%) = \frac{c_{pivo,po\ DH} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right) - c_{pivo,před\ DH} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right)}{c_{A,chmel} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times D_{chmel,DH} \left( \frac{\text{kg}}{\text{l}} \right)},$$

kde se v čitateli objevuje rozdíl koncentrací dané látky v hotovém pivu ( $c_{pivo,po\ DH}$ ) a v pivu před procesem studeného chmelení ( $c_{pivo,před\ DH}$ ), vyjadřující celkový reálný přírůstek této látky během studeného chmelení. Jmenovatelem je pak součin koncentrace této látky ve chmelu ( $c_{A,chmel}$ ) a dávky tohoto chmele použité na studené chmelení ( $D_{chmel,DH}$ ).

Pro skupinu analytů byla přenosová míra vyjádřena jako **účinnost extrakce** během studeného chmelení ( $U_{DH}$ ) a vypočtena jako suma analytů:

$$U_{DH}(\%) = \frac{\sum [c_{i,pivo,po\ DH} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right)] - \sum [c_{i,pivo,před\ DH} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right)]}{\sum \left[ c_{i,chmel} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times D_{chmel,DH} \left( \frac{\text{kg}}{\text{l}} \right) \right]}.$$

### 3.7 Výpočty spřažené s korelační analýzou

Korelační analýza byla provedena z dat chromatografické analýzy obsahu silic v Pivech A a B a sensorického hodnocení napříč různě starými vzorky těchto piv. Aplikována byla celkem na sedm vzorků ( $n = 7$ ) různě stařených, počínaje pivem čerstvým až po šest měsíců starý vzorek.

Pro dvě prověřované vlastnosti byl za použití funkce *CORREL* v programu MS Office Excel 2007 zjištěn korelační koeficient ( $r$ ) těchto dvou oblastí. Ten byl následně statisticky testován pro 5% hladinu významnosti s  $n - 2$  stupni volnosti ( $\nu$ ):

$$t_r = \frac{r \times \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}} > t_{0,950,\nu=5} = 2,015$$

Korelační lineární závislost byla uvažována pouze pro korelační koeficient dvou oblastí, který prošel  $t$ -testem.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Validace

Retrospektivní validací z naměřených dat byly zjištěny některé validační parametry použité metody stanovení silic ze vzorků chmele a piva. Vypočtené hodnoty jsou doplněné o data měření VÚPS z minulých let a částečně slouží ke srovnání obou měření. Silice byly z piva izolovány metodou SD/GC-MS, silice z chmelového materiálu probíhala extrakcí FBE-SPE s GC-MS analýzou.

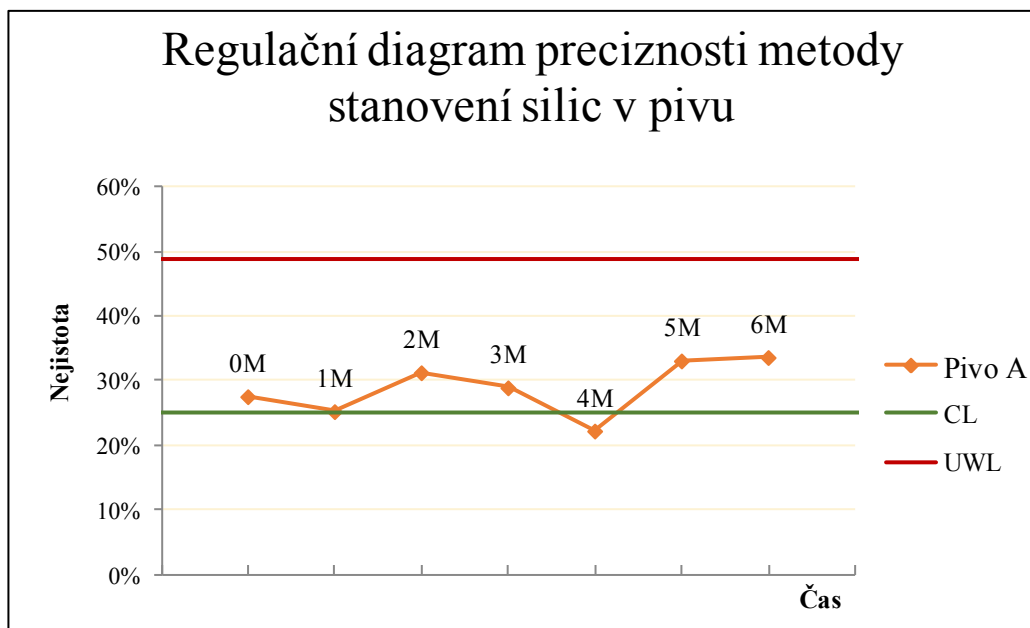
V některých případech nebylo možné dodržet doporučení výpočtu meze detekce z 1-5násobku koncentrace očekávané meze detekce – chmel i pivo jsou velmi komplexní vzorky a nelze optimalizovat koncentrační hladiny všech analytů v jednom vzorku, což mohlo být příčinou vyšších hodnot těchto parametrů.

#### 4.1.1 Silice v pivu

Výpočet validačních parametrů metody extrakce silic z piva destilací vodní parou z celkem 12 měření jednotlivých vzorků Piva A poskytl uspokojivé výsledky, které jsou zaneseny v **Tab. 2** (str. - 55 -). Pro ověření opakovatelnosti byly parametry počítány celkem ze tří vzorků: piva čerstvého (0M), 3 měsíce (3M) a 6 měsíců (6M) starého. Dále byly VÚPS poskytnuty materiály doplňující výsledky o další parametr, kterým je výtěžnost metody, uvedená jako poslední sloupec v **Tab. 2** (str. - 55 -).

Množství sledovaných analytů se v pivu pohybovalo v koncentracích od 0,01 µg/l (beta-ionon) – 42,49 µg/l (myrcen). Měření vykazovala průměrný 14% koeficient variance, z nějž byla stanovena průměrná rozšířená nejistota 28 %.

Mez opakovatelnosti pro tuto měřicí metodu se u čerstvého a tři měsíce starého vzorku pohybovala kolem hodnoty 0,4 pro 95% pravděpodobnost, což lze označit za relativně uspokojivý rozdíl. U šest měsíců starého piva byla opakovatelnost již mírně zvýšená, proto byl sestrojen regulační diagram (**Obr. 7**), který vyvrátil statisticky významnou odlehlost hodnot. Odchylku opakovatelnosti z „nultého“ a šestého měsíce měření lze tedy vysvětlit pouze náhodným rozložením dat.



**Obr. 7 – Regulační diagram preciznosti metody SD/GC-MS ke stanovení silic v pivo**

Pivo A: 0M – čerstvé pivo, 6M – 6 měsíců staré pivo;

CL – centrální linie prezentující používanou nominální 25% nejistotu;

UWL – horní varovná mez vypočítaná z 95,45% pravděpodobnosti rozdělení hodnot.

Za zmínku stojí, že pro některé analyty kyslíkaté povahy, konkrétně estery methylhexanoát, methylnonanoát, methyldekanoát a ketony 2-dodekanon, 2-tridekanon, alfa-ionon a alfa-iron, byla opakovatelnost až dvojnásobná průměrně a přesahovala hodnotu přes 1, což značí vyšší míru rozptýlení výsledků měření těchto látek vlivem náhodných jevů. Příčina může být náhodné změny koncentrace během GC-MS analýzy, způsobené zejména vlivem zvýšených teplot, ke kterým jsou látky této povahy náchylné.

I přestože koncentrační hladiny všech sledovaných analytů v jediném vzorku piva nebyly na úrovni vhodné ke spolehlivému určení limitu detekce spolu s limitem stanovitelnosti, z naměřených hodnot vyplývá, že více než polovina sledovaných látek je detekovatelná již pod hranicí 1  $\mu\text{g/l}$ .

Posledním uvedeným validačním parametrem v Tab. 2 (str. - 55 -) je pravdivost vyjádřená jako výtěžnost dané extrakční metody. V případě nadpoloviční většiny sledovaných analytů v pivní matrici vykazuje výtěžnost 100 %, což je ideální hodnota potvrzující vhodnost metody pro daný účel. Nižší procento extrakce mají silice uhlovodíkové frakce, mezi něž se řadí alfa-pinen, beta-pinen, myrcen, limonen a alfa-humulen. Nedostatečný stupeň extrakce může být přisuzován jejich velmi těkavé povaze a náchylnosti k oxidaci a polymeraci.[2] Během extrakce je vzorek vystaven mírně zvýšeným teplotám, které tyto degradační procesy akcelerují. Důkazem může být naopak zvýšené

procento extrakce některých kyslíkatých látek, na které tyto uhlovodíky konvertují. Patří mezi ně epoxidy zastoupené beta-karyofylenepoxidem, ketony alfa-ionon, beta-ionon a alfa-ion, a zejména alkoholy linalool, 4-terpineol, alfa-terpineol, cis-geraniol a farnesol.

**Tab. 2 – Validační parametry silic stanovených v pivu. Metoda extrakce SD s GC-MS analýzou.**

Analyty	Medián (µg/l)			RSD (%)			Nejistota			Opakovatelnost			LOD (µg/l)			LOQ (µg/l)			Výtěžnost*
	0M	3M	6M	0M	3M	6M	0M	3M	6M	0M	3M	6M	0M	3M	6M	0M	3M	6M	
stáří vzorku																			
alfa-pinen	2,21	5,52	1,75	5%	19%	21%	10%	38%	42%	0,14	0,53	0,58	0,34	3,16	1,10	1,13	10,52	3,65	27%
isobutyloxyfenol	16,88	31,39	18,43	4%	5%	11%	7%	9%	22%	0,10	0,13	0,30	1,85	4,44	6,02	6,18	14,81	20,06	100%
beta-pinen	1,87	2,96	0,27	13%	14%	28%	25%	29%	57%	0,35	0,41	0,80	0,71	1,28	0,23	2,37	4,28	0,77	36%
myrcen	202,62	448,19	313,19	7%	4%	8%	14%	8%	16%	0,20	0,11	0,23	42,49	52,77	76,19	141,62	175,91	253,98	50%
methylhexanoát	0,26	1,15	0,26	36%	21%	50%	72%	41%	99%	1,00	0,57	1,39	0,28	0,71	0,38	0,94	2,36	1,27	100%
isoamylisobutyrol	4,87	5,89	6,58	21%	20%	10%	42%	41%	19%	0,59	0,57	0,27	3,08	3,60	1,92	10,27	12,01	6,39	100%
limonen	2,94	8,52	2,36	18%	15%	34%	35%	31%	68%	0,50	0,43	0,95	1,56	3,90	2,39	5,21	13,00	7,96	50%
trans-ocimene	1,14	1,00	0,45	7%	11%	28%	13%	21%	56%	0,19	0,30	0,79	0,23	0,32	0,38	0,77	1,07	1,25	100%
3-karen	1,60	2,23	1,33	5%	7%	11%	9%	15%	21%	0,13	0,21	0,30	0,22	0,50	0,43	0,74	1,66	1,43	100%
methylheptanoát	1,06	1,96	1,47	16%	10%	14%	33%	19%	29%	0,46	0,27	0,40	0,52	0,56	0,63	1,75	1,87	2,10	100%
allo-ocimene	0,91	1,24	0,76	37%	31%	37%	74%	61%	73%	1,04	0,86	1,03	1,02	1,14	0,84	3,39	3,80	2,80	100%
2-nonanon	3,57	7,48	5,26	14%	13%	13%	28%	26%	26%	0,39	0,37	0,37	1,47	2,93	2,06	4,91	9,77	6,86	100%
methyloktamát	0,13	0,30	0,22	20%	24%	21%	40%	47%	42%	0,57	0,66	0,58	0,08	0,21	0,14	0,26	0,70	0,45	100%
methylnonanoát	0,05	0,04	0,11	48%	30%	39%	96%	59%	78%	1,35	0,83	1,09	0,07	0,04	0,13	0,23	0,13	0,45	100%
2-dekanon	2,50	5,55	3,77	16%	10%	19%	33%	19%	39%	0,46	0,27	0,55	1,22	1,58	2,20	4,07	5,28	7,34	100%
linalool	60,41	118,04	101,77	7%	9%	9%	14%	17%	18%	0,20	0,24	0,25	12,93	30,22	27,04	43,11	100,72	90,14	129%
methyldekanoát	0,05	0,10	0,06	35%	48%	36%	71%	97%	72%	0,99	1,36	1,01	0,05	0,14	0,07	0,18	0,46	0,22	100%
2-undekanon	3,60	6,91	4,88	20%	22%	22%	40%	44%	43%	0,56	0,61	0,61	2,15	4,52	3,17	7,17	15,08	10,56	100%
beta-karyofylen	1,90	4,67	3,37	10%	11%	11%	21%	22%	22%	0,29	0,31	0,30	0,59	1,55	1,09	1,98	5,16	3,62	128%
4-terpineol	1,32	4,09	2,60	21%	16%	11%	42%	31%	23%	0,59	0,44	0,32	0,84	1,93	0,89	2,80	6,42	2,96	123%
beta-farnesen	0,89	1,25	0,78	14%	8%	32%	28%	16%	64%	0,39	0,22	0,90	0,37	0,29	0,76	1,23	0,98	2,53	100%
alfa-humulen	10,40	24,45	12,78	7%	4%	15%	13%	8%	30%	0,18	0,11	0,42	2,05	2,83	5,80	6,82	9,44	19,34	60%
methylgeraniol	9,53	19,50	14,10	8%	6%	10%	16%	12%	19%	0,22	0,16	0,27	2,23	3,41	4,09	7,45	11,36	13,62	100%
alfa-terpineol	10,57	24,07	20,20	5%	6%	7%	11%	12%	15%	0,15	0,17	0,21	1,71	4,38	4,49	5,69	14,59	14,96	132%
2-dodekanon	0,79	1,17	1,28	39%	45%	40%	77%	89%	80%	1,08	1,25	1,12	0,91	1,56	1,54	3,04	5,21	5,12	100%
geranylacetát	13,38	14,99	8,47	8%	14%	10%	16%	27%	21%	0,22	0,38	0,29	3,12	6,09	2,64	10,41	20,31	8,79	100%
cis-geraniol	3,27	6,02	2,56	8%	8%	14%	16%	16%	28%	0,22	0,23	0,39	0,76	1,47	1,08	2,54	4,89	3,59	156%
2-tridekanon	0,61	1,25	1,19	38%	19%	31%	76%	38%	61%	1,06	0,53	0,86	0,69	0,71	1,09	2,31	2,37	3,64	100%
alfa-ionon	0,09	0,20	0,17	45%	50%	31%	90%	100%	62%	1,26	1,40	0,87	0,12	0,30	0,16	0,40	0,99	0,54	133%
beta-ionon	0,09	0,17	0,13	7%	8%	5%	14%	16%	11%	0,20	0,23	0,15	0,02	0,04	0,02	0,06	0,14	0,07	131%
alfa-iron	0,08	0,18	0,16	43%	34%	36%	85%	69%	72%	1,19	0,96	1,01	0,10	0,18	0,17	0,35	0,61	0,57	124%
beta-karyofylen epoxid	0,93	0,30	0,08	11%	32%	16%	22%	65%	33%	0,31	0,91	0,46	0,31	0,29	0,04	1,04	0,98	0,13	158%
farnesol	31,85	23,09	17,14	11%	20%	17%	22%	41%	34%	0,30	0,57	0,47	10,28	14,10	8,65	34,28	46,99	28,82	134%
<b>Suma   Střední hodnota</b>	<b>392,37</b>	<b>773,86</b>	<b>547,92</b>	<b>14%</b>	<b>14%</b>	<b>17%</b>	<b>28%</b>	<b>29%</b>	<b>34%</b>	<b>0,39</b>	<b>0,41</b>	<b>0,47</b>	<b>0,76</b>	<b>1,55</b>	<b>1,09</b>	<b>2,54</b>	<b>5,16</b>	<b>3,62</b>	<b>100%</b>

\*parametr poskytnutý VÚPS, jiné pivo

#### 4.1.2 Silice ve chmelu

Validační parametry metody extrakce na fluidním ethanolovém loži s následnou extrakcí na pevné fázi byly sice počítány ze statisticky nedostatečného množství měření ( $m = 1, n = 4$ ), nicméně díky záznamu VÚPS z roku 2015 ( $m = 3, n = 30$ ) bylo možné na tyto výsledky nahlížet s rezervou a provést alespoň hrubé srovnání parametrů metody v závislosti na počtu a době měření a dalších neméně důležitých faktorech. Parametry obou měření byly extrahovány stejným postupem výpočtu a jejich hodnoty pro stěžejní chmelové analyty jsou zaneseny v Tab. 3.

**Tab. 3 – Validační parametry vybraných silic stanovovaných metodou FBE-SPE/GC-MS ve chmelu**

Analyty <i>měřený vzorek</i>	Medián (mg/kg)	Průměr (mg/kg)	RSD (%)		Nejistota		Opakovatelnost		LOD (mg/kg)		LOQ (mg/kg)	
	<i>K</i>	<i>Ch</i>	<i>K</i>	<i>Ch</i>	<i>K</i>	<i>Ch</i>	<i>K</i>	<i>Ch</i>	<i>K</i>	<i>Ch</i>	<i>K</i>	<i>Ch</i>
alfa-pinen	9,72	2,00	2%	17%	4%	35%	0,05	0,48	0,55	1,03	1,82	3,45
beta-pinen	45,51	14,01	4%	7%	7%	15%	0,10	0,21	4,78	3,09	15,93	10,29
myrcen	5109,06	590,51	7%	5%	15%	10%	0,21	0,14	1125,30	88,96	3750,99	296,52
limonen	36,23	9,76	5%	12%	10%	25%	0,15	0,34	5,64	3,61	18,80	12,02
linalool	56,55	28,25	7%	5%	15%	9%	0,20	0,13	12,30	3,87	41,01	12,92
beta-karyofylen	366,00	231,89	28%	7%	55%	14%	0,77	0,20	302,87	49,51	1009,57	165,03
4-terpineol	14,72	0,39	27%	39%	53%	77%	0,74	1,08	11,73	0,45	39,10	1,50
beta-farnesen	29,63	404,90	7%	7%	13%	14%	0,19	0,19	5,92	82,33	19,74	274,42
alfa-humulen	1589,91	994,54	27%	9%	55%	19%	0,77	0,27	1308,73	282,91	4362,43	943,04

*K* - Chmel *Kazbek* pro výrobu Piva B,  $n = 4$ , měřeno 2019

*Ch* - Chmel měřený VÚPS,  $n = 30$ , měřeno 2015

Průměrný variační koeficient z měření 33 analytů ( $n = 4$ ) činil 11 %, rozšířená nejistota 22 %. Průměrná opakovatelnost dosahovala 0,31 (na 95 % hladině pravděpodobnosti) a její zvýšenou hodnoty vykazovaly zejména ketony a některé uhlovodíky, mezi něž patřil alfa-humulen, beta-karyofylen a allo-ocimen. Koncentrační hladiny konkrétních analytů ve vzorku chmele se promítly do jejich hodnot limitů detekce a stanovení. Nízké LOD vykazovaly analyty obsažené ve chmelu v nízkém množství, typicky methylestery s  $\text{LOD} > 0,50 \text{ mg/kg}$ . Vysoké  $\text{LOD} < 1000,00 \text{ mg/kg}$  byly vypočítány pro majoritně zastoupené složky chmele myrcenu a alfa-humulenu.

Z dat v Tab. 3 je patrné, že větší počet měření poskytuje sice vyšší variabilitu, ale tím i kvalitnější vyjádření daného výsledku. Nejen rozptyl, ale také množství sledovaného analytu ve vzorku má vliv na konkrétní parametry – např. výše zmiňovaný limit detekce analytu je určen tím přesněji, čím více se mu celková koncentrace analytu ve vzorku blíží. Mezi srovnávanými měřeními je však bezmála čtyřroční odstup, který, společně s výše zmíněnými faktory, mohl také sehrát svou roli v rozdílu tabulovaných parametrů.

## 4.2 Studené chmelení

Obě sledovaná piva byla připravena za použití technologické úpravy studeným chmelením za účelem importovat do piva specifické chmelové aroma vybraných odrůd. Pro Pivo A byl použit chmel ElDorado, Pivo B bylo studeně chmeleno celkem dvakrát za použití dvou odrůd chmelů Citra a Kazbek. Výpočet byl proveden ze vzorků pív před studeným chmelením a vzorků čerstvých hotových pív.

Dle uvedených zdrojů [16, 22, 34] je míra a rychlost přechodu silic z chmele do piva během studeného chmelení závislá na mnoha faktorech, z nichž je v této práci věnována největší pozornost těmto dvěma:

- a) Chemická povaha extrahované látky – většina sledovaných silic jsou málo polární až nepolární sloučeniny hůře rozpustné ve vodě.
- b) Chemická povaha matrice – v tomto případě je rozpustnost silic v pivu řízena zejména obsahem alkoholu. Chemické složení z hlediska hodnoty pH, dalších rozpuštěných látek či aktivity kvasinek nebylo sledováno.

Dalším faktorem je teplota při chmelení, s jejímž zvyšováním se zvyšuje i účinnost extrakce, nicméně v této studii také nebyla studovaným parametrem.

Níže v **Tab. 4** jsou zaznamenány konkrétní analyty s vysokými přenosovými mírami doplněné o látky zastoupené v signifikantní míře v některém z pív. Tučně jsou vytištěny složky, kterým je přisuzován potenciální přínos na aroma piva [19], což může být důsledkem mimo jiné právě jejich vyššího množství v hotovém produktu, nízkými sensorickými práhy či kladných měř přenosu během procesu studeného chmelení. Lze si také povšimnout, že valná většina těchto analytů zanesených v **Tab. 4** jsou zástupci chemických skupin, které se, jak je patrné z **Obr. 8** (str. - 59 -) a **Obr. 9** (str. - 60 -) velmi dobře extrahují do piva.

**Tab. 4 – Seznam analytů s nejvyššími mírami přenosu během studeného chmelení Piv A a B**

Látky jsou řazeny sestupně podle hodnoty své míry přenosu z chmele Eldorado do Piva A.

Tučně jsou vytištěny látky, kterým je přisuzován signifikantní sensorický přínos na aroma.

Záporné míry přenosu jsou vyjádřeny procentuálním úbytkem v hotovém pivu oproti množství v pivu před studeným chmelením a značeny hvězdičkou.

Hodnoty sloupce *Navýšení v pivu* představují násobek zvýšení množství daného analytu v hotovém pivu oproti pivu před úpravou studeným chmelením.

Analyt	Chemická povaha	Množství v hotovém Pivu A (µg/l)	$P_{DH}$ (Pivo A)	Navýšení v Pivu A	Množství v hotovém Pivu B (µg/l)	$P_{DH}$ (Pivo B)	Navýšení v Pivu B
<b>linalool</b>	alkohol	60,41	69%	2,2	113,50	94%	19,3
<b>isobutylisobutyřát</b>	ester	16,88	56%	2,8	15,86	44%	18,5
2-nonanon	keton	3,57	21%	1,3	3,44	50%	6,3
alfa-pinen	monoterpen	2,21	18%	1,6	3,02	10%	1,8
<b>cis-geraniol</b>	alkohol	3,27	17%	1,3	13,01	67%	3,2
<b>methylgeranát</b>	ester	9,53	16%	2,3	39,11	27%	34,4
beta-trans-ocimen	monoterpen	1,14	12%	2,0	1,77	39%	5,9
<b>geranylacetát</b>	ester	13,38	11%	1,8	4,10	7%	1,4
řarnesol	alkohol	31,85	6%	1,3	59,84	*26%	0,7
<b>myrcen</b>	monoterpen	202,62	2%	1,4	451,82	5%	47,7
<b>alfa-terpineol</b>	alkohol	10,57	1%	1,1	8,44	7%	3,8
2-undekanon	keton	3,60	*33%	0,7	27,83	18%	3,3
alfa-humulen	seskviterpen	10,40	*94%	0,1	35,58	*49%	0,5

\*přenosová míra záporná, výsledek vyjádřen v % úbytku oproti stavu před DH

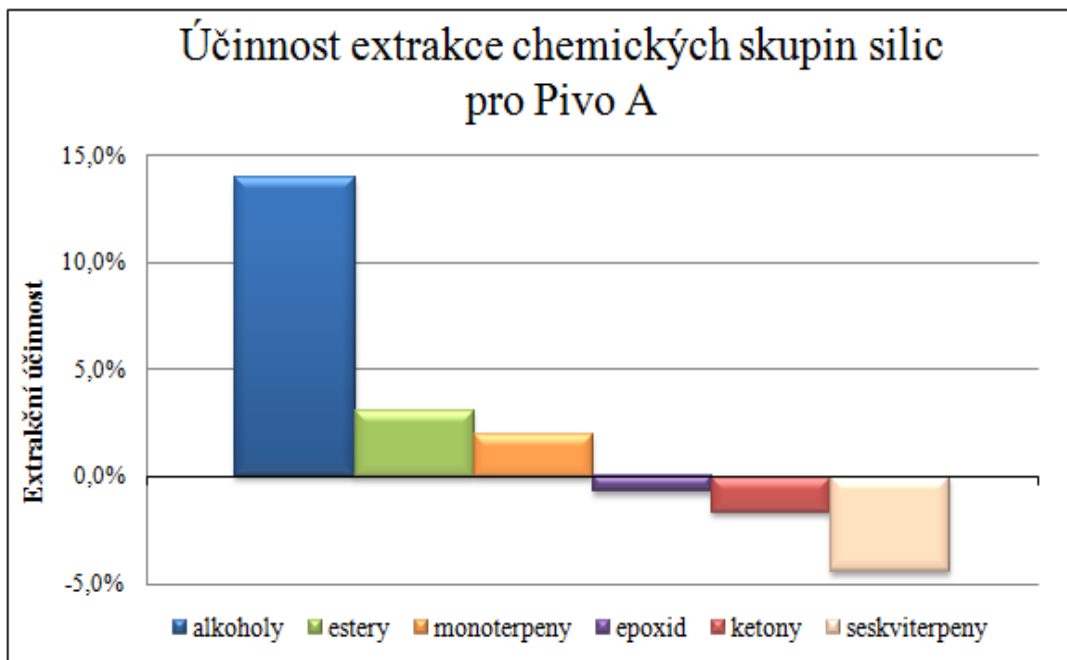
Až na výše popsané látky uvedené v Tab. 4 se míry přenosu většiny ostatních sledovaných analytů pohybují v Pivu B v kladných číslech mezi 0 až 5 %. Pro Pivo A jsou pak přenosové míry analytů nefigurujících v tabulce ještě nižší, se střední hodnotou kolem 0 %, a necelá polovina analyzovaných látek zde měla dokonce záporné extrakční saldo. To v praxi znamená, že látky z chmele do piva v procesu studeného chmelení buď vůbec nepřečázejí, nebo je míra jejich extrakce oproti ztrátám během tohoto technologického kroku velmi nízká, že se nepromítne do celkového přínosu. Blíže informace o osudu těchto látek by se daly získat analýzou použitého chmelového materiálu, ale tyto experimenty již nebyly náplní této práce.

#### 4.2.1 Pivo A

U Piva A byla vypočítána celková účinnost studeného chmelení odrůdou Eldorado i přenosové míry jednotlivých analytů. Celková bilance sledovaných analytů byla v tomto případě záporná a činila -1 %. Z tohoto úhlu pohledu se tedy může zdát, že technologie studeného chmelení nemá smysl, to lze ale snadno vyvrátit pohledem na přestup konkrétních chemicky odlišných skupiny látek (Obr. 8).

V tomto procesním kroku je hlavním účelem importovat do piva chmelové aroma, jehož nositeli jsou v globálním měřítku pouze vybrané chmelové

komponenty, mezi kterými jsou hlavně alkoholy, některé monoterpeny a estery.[19] Jak lze na Obr. 8 vidět, měření potvrdilo přenos těchto důležitých látek do piva během studeného chmelení, a tudíž i smysl a význam tohoto technologického kroku dnes již běžně využívaného v pivovarské praxi.



Obr. 8 – Graf účinnosti extrakce chemických skupin silic do Piva A

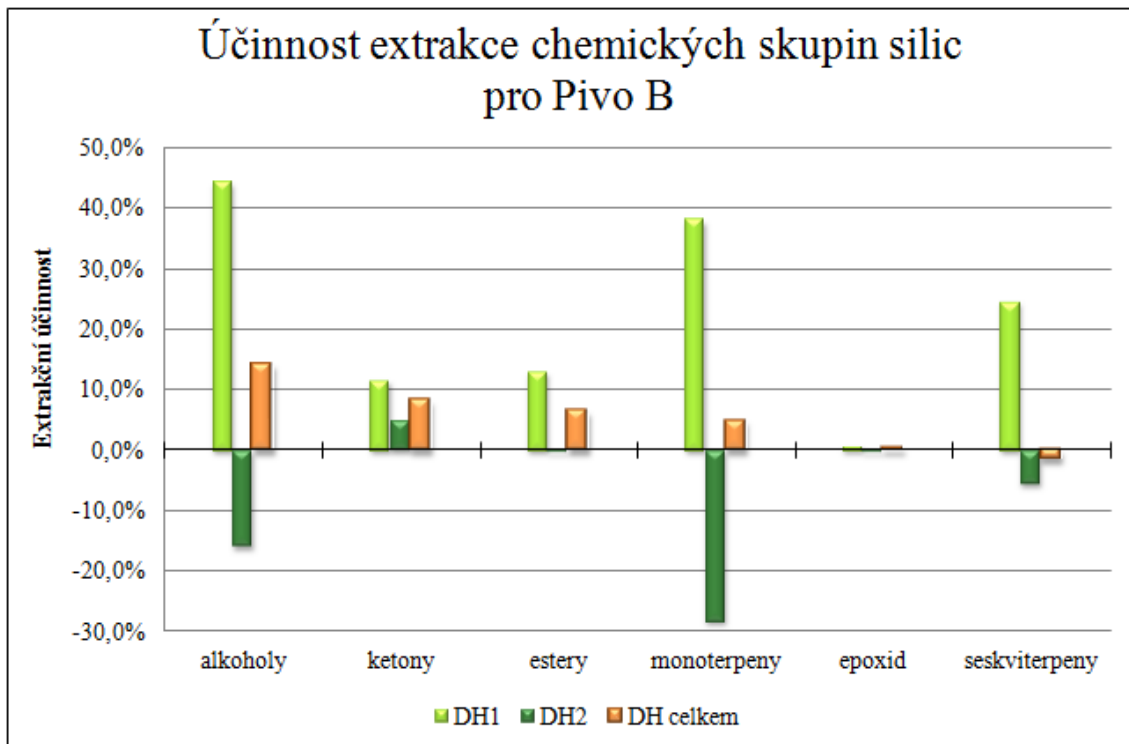
#### 4.2.2 Pivo B

Pivo B se z pohledu této práce lišilo od Piva A dvojnásobným chmelením. Pro každý krok byla tedy spočítána extrakční účinnost zvlášť a porovnána s celkovou, jejíž celková bilance byla stanovena na 4 %. Na Obr. 9 lze vidět extrakční účinnosti pro jednotlivé chemické skupiny silic seřazené od nejvyššího celkového přínosu v rámci studeného chmelení. Již na první pohled je jasné, že již první chmelení má signifikantní přínos na importu důležitých poskytovatelů chmelového aroma – extrakční účinnosti okolo 40 % dosahovaly v prvním chmelení alkoholy i monoterpeny, překvapivě následované 25% přínosem seskviterpenů.

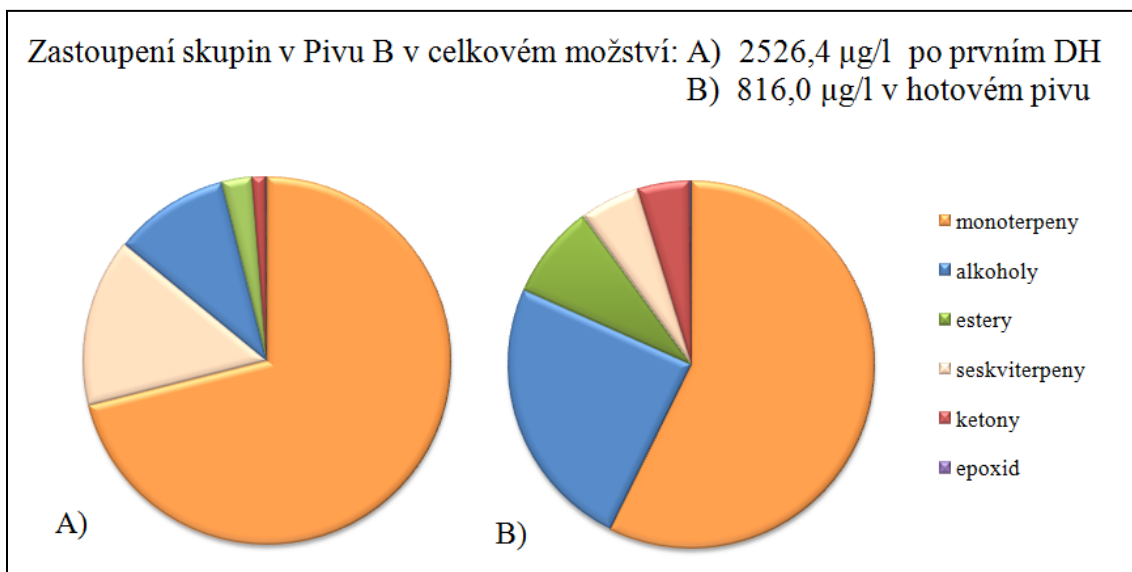
Po druhém studeném chmelení identickou dávkou lze pozorovat hlavně markantní úbytek v množství importovaných silic, který rapidně ovlivnil celkový přínos a vzájemný poměr sledovaných komponentů chmele (Obr. 10, str. - 61 -). Takto vysoké rozdíly nejsou přisuzovány faktu, že by sám druhý přídavek chmele měl přímý markantní vliv na snížení množství pozorovaných analytů. Sice je extrakce chmelových složek do piva řízena mj. dle koncentračního gradientu, nicméně množství silic ve chmelu je oproti pivu natolik vysoké, že dochází k volné difúzi v závislosti na chemické povaze analytů a matrice. Opačným

příkladem jsou iso-alfa-kyseliny, které se kvůli svým vysokým hodnotám po chmelovaru mohou sorbovat zpět na chmelový materiál.

Pro snížení množství silic během druhé fáze DH se nabízí spíše vysvětlení, že jde o standardní úbytky během zařazení kroku studeného chmelení do technologického procesu výroby piva. Úbytky pak mohou být následkem ležení delší dobu při vyšší teplotě, vystavení otevřené atmosféře, manipulace s pivem a chmelovým materiálem, aktivity v pivu stále přítomných kvasinek spotřebovávajících některé složky chmelového původu.



Obr. 9 – Graf účinnosti extrakce chemických skupin silic do Piva B



**Obr. 10 – Grafy zastoupení sledovaných skupin silic v Pivu B v různých fázích dvojitého studeného chmelení**

Porovnáním grafů lze po jednotlivých krocích studeného chmelení pozorovat relativní úbytek v zastoupení monoterpenů, seskviterpenů a esterů, relativní nárůst naopak zaznamenaly alkoholy, ketony a velmi málo zastoupený epoxid.

### 4.2.3 Přenos skupin silic během studeného chmelení

#### 4.2.3.1 Alkoholy

Nejdůležitější skupinou jsou alkoholy, kterých bylo použito metodou stanoveno celkem 5, jmenovitě jde o linalool, 4-terpineol, alfa-terpineol, cis-geraniol a farnesol. Všechny tyto látky byly označeny jako jedny z hlavních donorů příjemného chmelového aroma piva, čímž – na dostatečných koncentračních hladinách a ve vhodných maticích – přímo ovlivňují jeho výsledný charakter.

Alkoholy vykazovaly zhruba dvojnásobný nárůst v množství oproti pivu před DH a vysokou 14% celkovou extrakční bilanci u obou analyzovaných piv. Tato hodnota, nejvyšší ze všech skupin, je přisuzována jejich chemické podstatě – jakožto polární alkoholy vykazují v alkoholickém pivu dobrou rozpustnost. Tématu vlivu obsahu alkoholu v pivu na stupni extrakce silic se věnuje Kapitola 4.2.4.

**Obr. 8** (str. - 59 -) ilustruje v Pivu A velmi vysokou extrakční bilanci alkoholů v porovnání s menšími příspěvky ostatních chemických skupin, naopak pohledem na **Obr. 9** (str. - 60 -) si u Piva B lze všimnout, že i přes velmi vysokou efektivitu prvního chmelení (bezmála 45%),

mezi celkovou bilancí alkoholů a ostatních chemických skupin již není taková propast jako v případě Piva A.

Jak lze vyčíst z Tab. 4 (str. - 58 -), nejvyšší přínos na extrakční účinnosti alkoholové skupiny má linalool s přenosovou mírou blížící se 70 % pro jednu studeně chmelené Pivo A a 94 % pro dvakrát chmelené Pivo B. Míra přenosu linaloolu je zároveň nejvyšší i ze všech sledovaných analytů. Dle studií popsanych v Kapitole 2.2.3.2 byla linaloolu zjištěna přenosová míra 100 % [9] a 80 % [11], které odpovídají naměřeným hodnotám. Vysoká přenosová míra linaloolu do Piva B může být způsobena nejen volným linaloolem, uvolněným přímo z chmele, dle zdrojů také z formy vázané, která je uvolněna působením kvasnic.[9]

Dalším markantním přispěvatelem je cis-geraniol se 17% přenosovou mírou pro Pivo A a velmi vysokou 67 % mírou v Pivu B, který společně s linaloolem propůjčuje pivu květinový charakter.[3] O něco méně do Piva A přechází farnesol z 6 %, v Pivu B je sice jeho množství v hotovém pivu o bezmála polovinu vyšší než v Pivu A, ale zde v průběhu studeného chmelení naopak podléhá 26% ztrátám. Míra přenosu terpineolů do Piva B se pohybuje okolo 7 %. Přechod do více alkoholického Piva A směřoval paradoxně k nulovým hodnotám, a tudíž byl zanedbatelný, což v rámci studeného chmelení sice vyvrací potenciální sensorický přínos terpineolů, nicméně odkrývá pozitivní fakt. Konkrétně alfa-terpineol, se sensorickým prahem vyšším než linalool, byl v hotovém Pivu A naměřen v zanedbatelném množství 10,57 µg/l a nezapornou přenosovou mírou je dokázáno, že od chmelení na varně, po celou dobu studeného chmelení až k hotovému produktu je jeho množství v pivu stabilní, a i tak může mít konečný přínos na celkovém vjemu finálního produktu. Nemůže být však dokázáno, zda jeho množství nezůstává konstantní na úkor ostatních monoterpenických alkoholů podstupujících biotransformační konverze.

Míra extrakce z chmele do piva nemusí pro monoterpenické alkoholy nabývat pravdivých hodnot, neboť přírůstek konkrétního analytu této skupiny nemusí být chmelového původu. Dle literární rešerše [8, 12, 23, 35] mohou působením některých druhů kvasinek látky této chemické povahy vznikat či se mezi sebou modifikovat, což v některých případech sice může zapříčinit zlepšení organoleptických vlastností finálního produktu, ale podkopává pravdivost stanovení přínosu chmele během studeného chmelení.

#### 4.2.3.2 Estery

Ve srovnání s mírou extrakce alkoholů do piva jsou na tom další kyslíkaté sloučeniny, estery o trochu hůře.

Do Piva A je jejich extrakční míra zhruba 3%, nicméně jejich množství se zde oproti původním hodnotám v pivu za studena nechmeleného zvýšilo nejvíce ze všech sledovaných chemických skupin, a to bezmála 2krát (Obr. 11, str. - 65 -). Z celkového zastoupení 9 analytů esterové povahy, zde mají 3 relativně vysoké přenosové míry, 1 vykazuje nulovou extrakci, nicméně 5 esterových látek má do Piva A záporné přenosové míry, které snižují celkovou bilanci této skupiny.

Mezi hlavní přispěvatele patří isobutylisobutyryát s 56% mírou přenosu odpovídající zdrojům [9], dále methylgeranát s 16 % a geranylacetát s 11 %. Díky těmto relativně vysokým hodnotám je skupina esterů v Pivu A v kladném extrakčním saldu. Isoamylisobutyryát vykazoval takřka nulový přechod. U zbývajících methylesterů došlo během studeného chmelení ke ztrátovým procesům se zápornou mírou přenosu. Nejmenší 8% úbytek množství oproti hodnotám v Pivu A před studeným chmelením vykazoval methylhexanoát, následovaný methylheptanoátem se ztrátami čtvrtiny původního množství. Zbývajících řada methylesterů methyloktanotát, methylnonanoát a methyldekanoát klesla o více než 85 % z původní hodnoty. Tyto ztráty mohou být zapříčiněny přeměnou methylesterů na ethylestery.[9]

Extrakční bilance těchto látek do Piva B, v porovnání s Pivem A, nabývala vyšších hodnot mírně nad 6 % a jejich množství v hotovém pivu oproti pivu před DH se po dvojitém DH zvýšilo více než 10krát (Obr. 12, str. - 65 -). Jeden z hlavních přispěvatelů byl, stejně jako v případě Piva A, isobutylisobutyryát se 44% přenosovou mírou, která se od literárně podložené hodnoty > 50 % [9] odchylovala pouze málo.

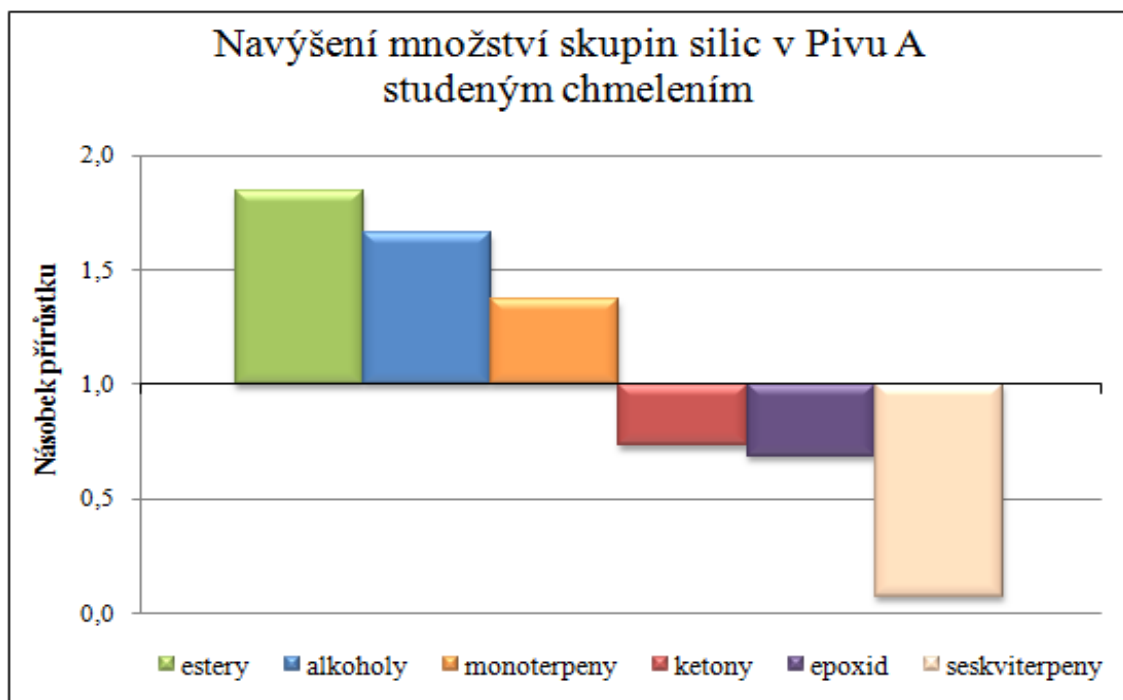
Přestože při studeném chmelení Piva A doházelo k úbytku methylhexanoátu, do Piva B tento analyt vykazoval velmi vysokou hodnotu přenosové míry, a to 68 %. Nicméně v závislosti na jeho velmi nízkých koncentracích, jak v obou pivech, tak v použitých chmelových materiálech, nebyl shledán signifikantním přispěvatelem k procesu studeného chmelení. Methylgeranát během studeného chmelení Piva B zažil značný nárůst, jeho množství se zvýšilo bezmála 35krát a dosahoval zde i vyšší 27% přenosové míry, jak srovnat v Tab. 4 (str. - 58 -). Ostatní stanovované estery v porovnání s hodnotami Piva A sice nevykazovaly tak markantní úbytky, spíše se hodnoty jejich míry přenosu pohybovaly

kolem nuly. Nelze tedy tvrdit, že by se v této fázi života piva větším způsobem individuálně podílely na impartu aroma.

#### **4.2.3.3 Uhlovodíky**

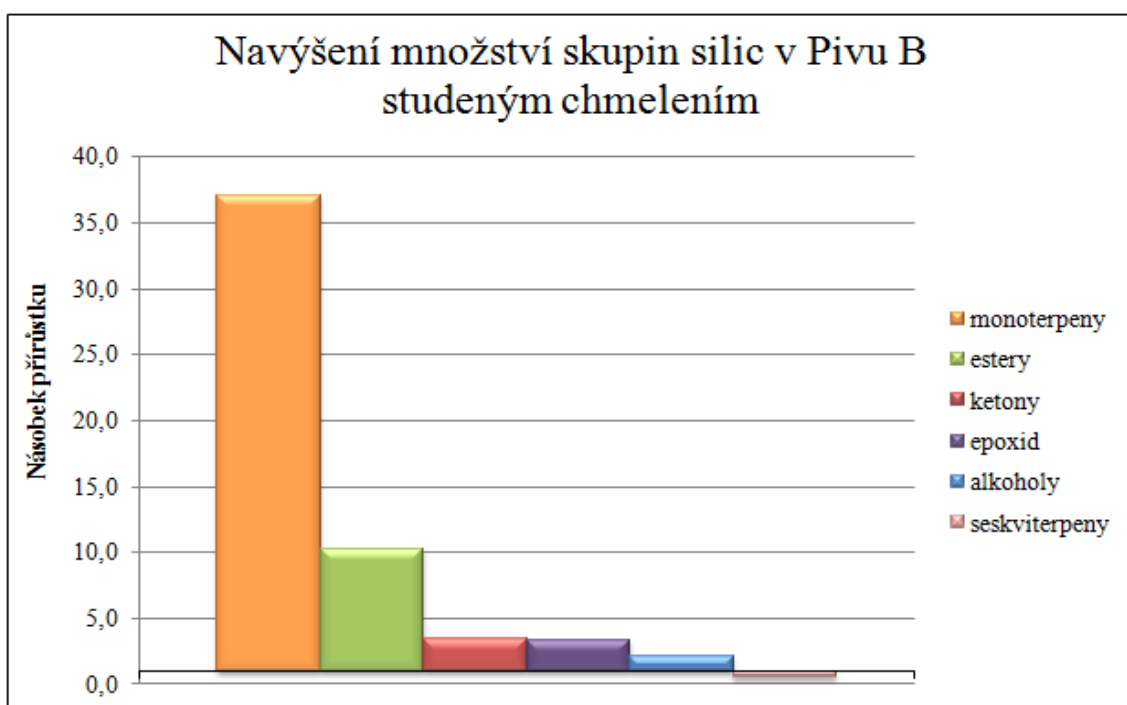
Frakce monoterpenů skládající se ze sedmi zástupců alfa- a beta-pinenu, myrcenu, limonenu a tří izomerů ocimenu měla do Piva A 2% a do Piva B bezmála 5% celkovou extrakční bilanci, které korespondují s literárně udávanými hodnotami [9, 11]. Z chmele ElDorado se do Piva A vyextrahoval nejvyšší podíl alfa-pinenu v 18 %, následováno 12 % beta-trans-ocimenu, jehož hodnota odpovídá zdroji.[9] Extrakce z Kazbeku a Citry do Piva B měla nejvyšší míru 39 % pro beta-trans-ocimen, nadprůměrně zvýšenou i vůči literární rešerši.[9] Dále se relativně snadno přenášel 3-karen s bezmála 14% a alfa-pinen s 10% přenosovou mírou. Stupeň přenosu ostatních monoterpenů byl nižší než 10 %, což je ale díky jejich vyšším obsahům jak v pivu, tak ve chmelu nezanedbatelný přínos. V Pivu A se však našly i takové monoterpenické uhlovodíky, které podléhaly během studeného chmelení ztrátám – beta-pinen 6%, allo-ocimen až 19%.

Seskviterpeny se 3 sledovanými zástupci beta-karyofylenem, beta-farnesenem a alfa-humulenem v jedнокrokovém chmelení Piva A zažívaly rapidní pokles. Hlavní příčinění na tomto celkovém poklesu má dle **Tab. 4** (str. - 58 -) s 94% ztrátami alfa-humulen, který se v pivu, a zejména ve chmelu, vyskytuje v relativně vysokých koncentracích. Celkové množství těchto tří zástupců po studeném chmelení kleslo o jeden řád na desítky  $\mu\text{g/l}$  (**Obr. 11**). Nicméně je možné, že se pouze modifikovaly na své oxidační produkty, které mají velký přínos v přidavku chmelového aroma do piva [17], takže nemuselo nutně dojít k jejich vytěkání a ztrátě chmelového aroma, ba naopak. Na analyzovaném materiálu však toto tvrzení nelze dokázat, neboť v této studii byl jediným sledovaným přímým oxidačním produktem těchto látek beta-karyofylen epoxid, který však v Pivu A během studeného chmelení podléhal ztrátám.



**Obr. 11 – Navýšení množství skupin silic v Pivu A studeným chmelením**

Hodnoty osy  $y$  vyjadřují, kolikrát se zvýšilo množství jednotlivých chemických skupin silic v hotovém pivu oproti pivu před studeným chmelením.



**Obr. 12 – Navýšení množství skupin silic v Pivu B dvojitým studeným chmelením**

Hodnoty osy  $y$  vyjadřují sumu, kolikrát se zvýšilo množství jednotlivých chemických skupin silic v hotovém pivu oproti pivu před studeným chmelením.

Co se týče dvoufázového studeného chmelení Piva B, byl osud seskviterpenických uhlovodíků zajímavější. V celkovém měřítku jejich množství sice o necelou polovinu pokleslo (Obr. 12, str. - 65 -), ale první chmelení obohatilo Pivo B o tyto látky až skoro 5krát. Během druhého chmelení zaznamenali všichni sledovaní zástupci seskviterpenické frakce rapidní pokles, v případě alfa-humulenu dokonce o jeden řád, a v hotovém čerstvém Pivu B zaujímaly 5,3 % z celkového množství analyzovaných silic (Obr. 10, str.- 61 -). Úbytek však nemusí znamenat ztrátu organoleptických vlastností hotového produktu, tuto funkci mohly v čerstvém Pivu B zastat jejich oxidační produkty. Jediným sledovaným v této studii byl však pouze beta-karyofylenepoxid, a ačkoli v hotovém pivu zaznamenal 3,5násobný nárůst v množství oproti pivu před studeným chmelením, objevoval se zde v koncentracích pod 2 µg/l, takže mu nelze s jistotou přisoudit tak notný vliv na finální aroma Piva B.

Extrakční míra těchto nepolárních látek sice nebyla tak vysoká jako u skupiny alkoholů či esterů, nicméně uhlovodíková frakce má i tak velký přínos na celkovém vjemu finálního produktu, už jen díky svým nadprůměrným koncentračním hladinám v pivu v porovnání s ostatními látkami jiných chemických skupin (Tab. 4, str. - 58 -). Ze sledovaných skupin analytů totiž zaujímaly z celkového množství silic v hotovém pivu po studeném chmelení 58 % v Pivu A, v Pivu B 63 % (Obr. 10- 61 -).

Přenosové míry a účinnosti studeného chmelení, spolu s dalšími uvedenými parametry přenosu látek z chmele do piva, byly přímo vypočítány z dat měřených piv, jakožto čistého přínosu během tohoto kroku. V praxi je ale nasnadě počítat se skutečnostmi, které interferují stanovení pravdivých hodnot a zkreslují míru přenosu. Pivo, společně s chmelem, je totiž velmi komplexní matrice a během pivovarského procesu se děje nepřeberné množství chemických reakcí a interakcí, které mají dopad na celkové zastoupení konkrétních látek. V případě studeného chmelení může jít o ztrátové procesy během tohoto kroku zejména vlivem teplotních a mechanických změn a přístupu kyslíku, dále je častá konverze mnohých látek do jiných, adsorpce na kvasinky a znemožnění stanovení, či naopak se může falešně zvýšit míra přenosu a tím i množství sledovaného analytu ze zdroje nechmelového původu.

#### 4.2.4 Faktory ovlivňující přenos silic v rámci studeného chmelení

Přímé srovnání hodnot silic ze studeného chmelení obou piv nemůže být věrohodně provedeno. Ačkoli jsou sledované analyty stejné, jejich původ je z chmelů odlišných odrůd, nehledě na různý počet studeného chmelení. Nadále se jedná o dvě odlišné matrice nejen svým chemickým složením, ale také fyzikálními charakteristikami. Nejvlivnějšími faktory, které stojí za znemožněním přímého srovnání výsledků dvou měřených piv, bylo jejich složení dané odlišnými vstupními surovinami, určující množství v pivu již přítomných látek, hodnotu pH a obsah alkoholu, které hrají klíčovou roli v míře extrakce silic do piva. V následujícím odstavci tedy bude provedeno přibližné porovnání v závislosti na výše zmíněných vlivech.

Prvním faktorem hrajícím roli je počet studených chmelení. Jednoduchou logickou úvahou lze odhadnout, že dvojnásobné chmelení poskytne vyšší přínos chmelových silic. V případě sledovaných piv se tento odhad potvrdil, nicméně neposkytl výsledky přímo úměrné počtu chmelení. Nasvědčují tomu nejen údaje zaznamenané v tabulkách výše, ale i míry přírůstku množství analytů v pivu vzhledem k množství chmelu v dávce. Celkový potenciál studeného chmelení, tzn. suma veškerých přírůstků silic byl u Piva A chmeleného EIDoradem vypočten na 1,6 %, u Piva B připravovaného za použití Kazbeku a Citry pak činil bezmála 33,5 %, nejsou-li uvažovány analyty v úbytku, jiné ztráty či vzájemné konverze silic.

Dalším důležitým vlivem extrakce je obsah alkoholu, který v Pivu A dosahoval 5,3 %, v Pivu B činil 4,1 %. Dle rešerše vyšší obsah alkoholu způsobuje lepší rozpustnost silic a vyšší míru extrakce. V této studii nelze docílit přesného zjištění, zda Pivo A fungovalo jako silnější rozpouštědlo pro sledované analyty, či ne, vzhledem k odlišné matici, chmelu a technologii chmelení. Nicméně dle poměrů přírůstků sledovaných alkoholů v pivu vůči jejich obsahu ve chmelu se ukázalo, že vyšší míra přenosu alkoholů, nehledě na jejich původní množství v pivu a ztráty během procesu, je u dvakrát chmeleného Piva B 17 %, u Piva A činil tento poměr 14 %, nicméně to bylo chmelené pouze jednou. Existuje ale mnoho faktorů interferujících toto stanovení, proto zůstává tvrzení pouze domněnkou, která by se dala podložit analýzou stejné pivní matrice s odlišným obsahem alkoholu, chmelené za studena stejnou technologií.

## 4.3 Změny množství silic během sensorického stárnutí

### 4.3.1 Stárnutí Piva A

Funkce změny množství celkových silic v Pivu A měla v průběhu šesti sledovaných měsíců hyperbolický tvar – od hotového čerstvého piva, kdy bylo jejich celkové množství 392,4 µg/l, celkový obsah silic pozvolně narůstal až do třetího měsíce, kde ve sledovaném období nabýval nejvyšších hodnot 773,9 µg/l. Od třetího měsíce dále se identickým vývojem snižoval až do měsíce pátého. Změna množství silic však v posledním sledovaném měsíci vykazovala skokový nárůst, a to zhruba o šestinu své hodnoty oproti měsíci pátému.

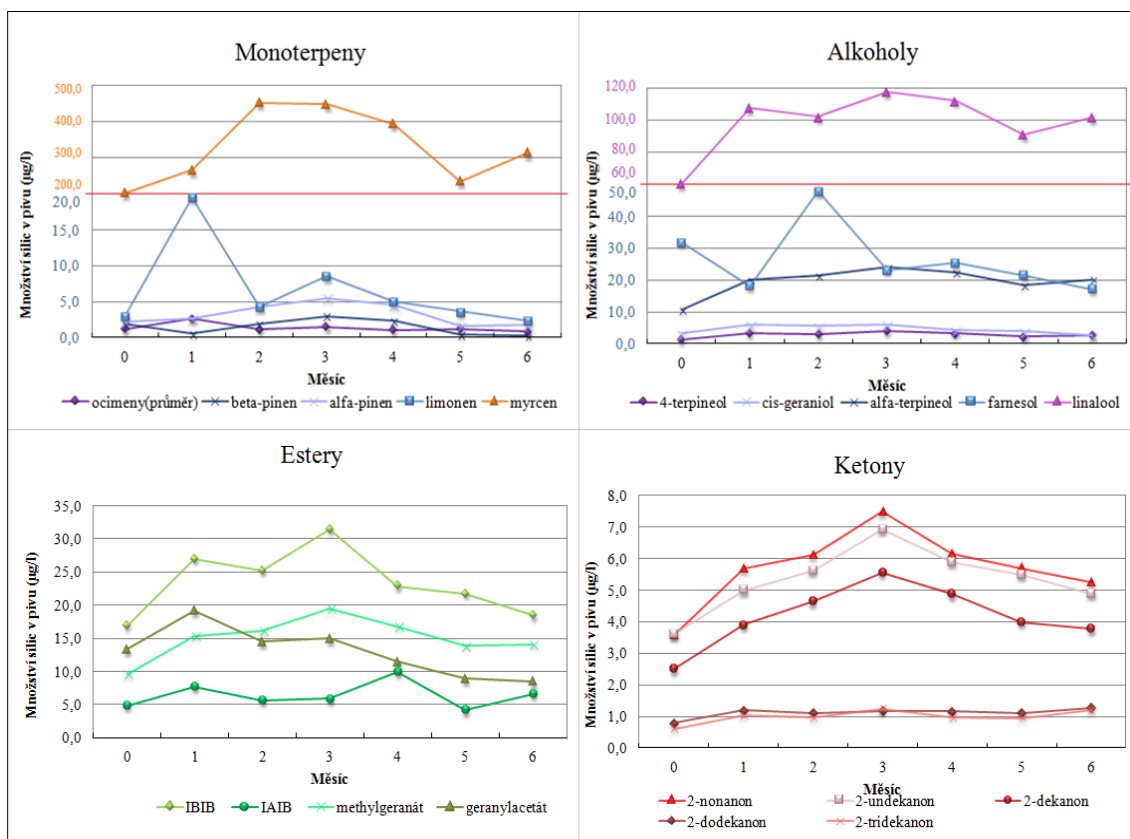
#### 4.3.1.1 Monoterpeny a seskviterpeny

Jak si lze všimnout z Obr. 13 (str. - 69 -), vývoj funkce množství silic kopíruje vývoj funkce myrcenu, jakožto nejvíce zastoupeného analytu. Dle Forstera a Gaghra se skladováním při 20 °C myrcen ztrácí z piva, a to až ¾ úbytkem oproti původnímu množství za 100 dnů.[9] Bez nutnosti provádět jakékoli výpočty je již pouhým pohledem (Obr. 13, str. - 69 -) na vývoj množství myrcenu v čase jasné, že v tomto případě studeně chmeleného Piva A se se zdrojovými informacemi nelze ztotožnit.

Ostatní zástupci monoterpenů byli po celý půlrok ve velmi nízkých koncentracích pod 5 µg/l a vliv jejich přínos nebyl v tomto případě shledán stěžejním.

Zajímavým případem je však limonen, který v prvním a třetím měsíci oproti myrcenu sice poskytuje pouze minoritní příspěvky, nicméně jeho koncentrace po jednom měsíci od výroby Piva A rapidně vzrostla až 6,5krát oproti čerstvému.

Ze seskviterpenů se ukázal jako plnohodnotný přispěvatel pouze alfa-humulen. Jeho vývoj je podobný vývoji ketonu 2-nonanonu (Obr. 13, str. - 69 -) s rozdílem více než dvojnásobného množství, o čemž vypovídá i jeho maximum koncentrace necelých 25 µg/l ve třetím měsíci. Zbylé dva seskviterpeny beta-karyofylen a trans-beta-farnesen se v pivu pohybovaly v koncentracích pod 5 µg/l a vykazovaly relativně konstantní hladiny během sledované doby stárnutí Piva A.



**Obr. 13 – Křivky vývoje množství vybraných zástupců chemických skupin silic během šestiměsíčního stárnutí Piva A**

Osy závislosti monoterpenů a alkoholů musely být kvůli velkým rozdílům v zastoupení analytů totožných chemických skupin rozděleny a opatřeny rozdílným měřítkem.

Funkci vývoje celkového množství silic v průběhu sledovaného období lze s menšími příspěvky ostatních silic vyjádřit jako součet vývojové funkce myrcenu a linaloolu, a to z důvodu jejich majoritního podílu ve frakci silic. Dalšími značnými přispěvateli na podobě výsledné funkce jsou: farnesol, alfa-terpineol, vyobrazené estery a limonen, lze uvažovat také 2-nonanon, 2-undekanon a 2-dekanon.

Nepředvídatelné chování během stárnutí v počátečních měsících vykazují limonen a farnesol – limonen svým markantním nárůstem v prvním měsíci, farnesol převráceným průběhem funkce od ostatních alkoholů v počátečních měsících.

#### 4.3.1.2 Alkoholy

Myrcen však není jedinou komponentou, která svým množstvím napříč dobou pozorování kopíruje výslednou funkci. Velmi podobný vývoj má také hojně zastoupený alkohol linalool s rozdílem jakéhosi zlomu funkce v měsíci prvním, kdy je jeho nárůst strmější než nárůst myrcenu (Obr. 13). Tento rozdíl by se dal vysvětlit přirozeným jevem doprovázejícím sensorické stárnutí pív, kterým je konverze chmelových komponent do kyslíkatých sloučenin. Mnoho látek se v pivu mění na své stabilnější oxidační produkty a je možné, že konverze některých látek do alkoholů

je bouřlivější v prvních měsících staření. Toto tvrzení však nepotvrdil vývoj konstantní funkce ostatních alkoholů a dokonce proti němu stojí hojně zastoupený farnesol.

Výsledky měření koncentrace linaloolu v průběhu stárnutí Piva A přibližně korespondují s nedávno provedenou studií Clippeleerové a kol.[11], kde při stejné teplotě po 470 dnech zaznamenal linalool pouze minimální změnu v množství oproti čerstvému pivu. V této práci však byly fluktuační množství větší, což je přisuzováno jeho až 3,5krát vyššímu množství v čerstvém studeně chmeleném Pivu A oproti množství v pivech ve studii Clippeleerové.

Zatímco množství většiny látek v pivu se zpočátku navyšuje, obsah farnesolu za první měsíc poklesl o necelou polovinu. Do měření v druhém měsíci v pivu naopak přibyl 2,5krát oproti měsíci prvnímu. Je možné, že konverze různých látek do svých oxidačních produktů má za dodržení konstantních podmínek během stárnutí různé poločasy přeměny. Vzhledem k tomuto předpokladu a chemické struktuře farnesolu ho autor považuje za specifický intermediát oxidace konkrétních chmelových složek, avšak nikoli některé ze stanovovaných silic v roli jediného výchozího produktu, neboť tato skutečnost byla prověřena korelační analýzou vývoje farnesolu s vývojem ostatních analytů. Jeho náhlý pokles mezi 0. a 1. a dále 2. a 3. měsícem se však nepodařilo vysvětlit jinak než dle literárního zpracování katalytickým působením zbytkových kvasinek a enzymů.

Tento „převrácený“ vývoj identický farnesolu vykazuje v prvních třech měsících i beta-karyofylen-epoxid, jakožto oxidační produkt seskviterpenů. Avšak z důvodu koncentrací pod 1 µg/l ve všech vzorcích mu z pohledu přeměn během stárnutí nebude věnována pozornost.

Alfa-terpineol díky svému zvýšenému množství a (až na jeho nárůst o polovinu původního množství během prvního měsíce) relativně konstantní hladině je stabilním přispěvatelem na obsahu celkových silic a chmelovém aroma napříč celým sledovaným obdobím.

#### **4.3.1.3 Estery**

Skupina esterů je významnými hráči v množství celkových silic nejen kvůli nadprůměrnému počtu stanovovaných zástupců této skupiny, ale také z hlediska koncentrací, ve kterých se tyto látky v pivu objevují. Srovnáním vývoje jejich funkce stárnutí s literární rešerší však nebylo docíleno shody. V Pivu A nedošlo v porovnání s čerstvým vzorkem

k poklesu žádného sledovaného esteru o 50 %, jak vypovídají studie [9, 11], nicméně na geranylacetát či IBIB lze toho zjištění aplikovat od 1., resp. 3. měsíce dále.

Z Obr. 13 (str. - 69 -) byly pro skupinu esterů vynechány málo zastoupené methylestery, které se, až na methylheptanoát s maximem 2 µg/l, v pivu většinou pohybovaly v koncentracích pod 0,5 µg/l po celou dobu staření.

#### **4.3.1.4 Ketony**

Pivo A má ve třetím měsíci oproti čerstvému výrobku zvýšené hodnoty některých ketonů, které by v koncentracích okolo 6 µg/l dosahujících svého maxima neměly být opomenuty. Jmenovitě jde o 2-nonanon, 2-undekanon a 2-dekanon. Stejně jako v případě esterů, zdroji avizované zhruba 50% úbytky v jejich množství lze pozorovat až od 3. měsíce dále.

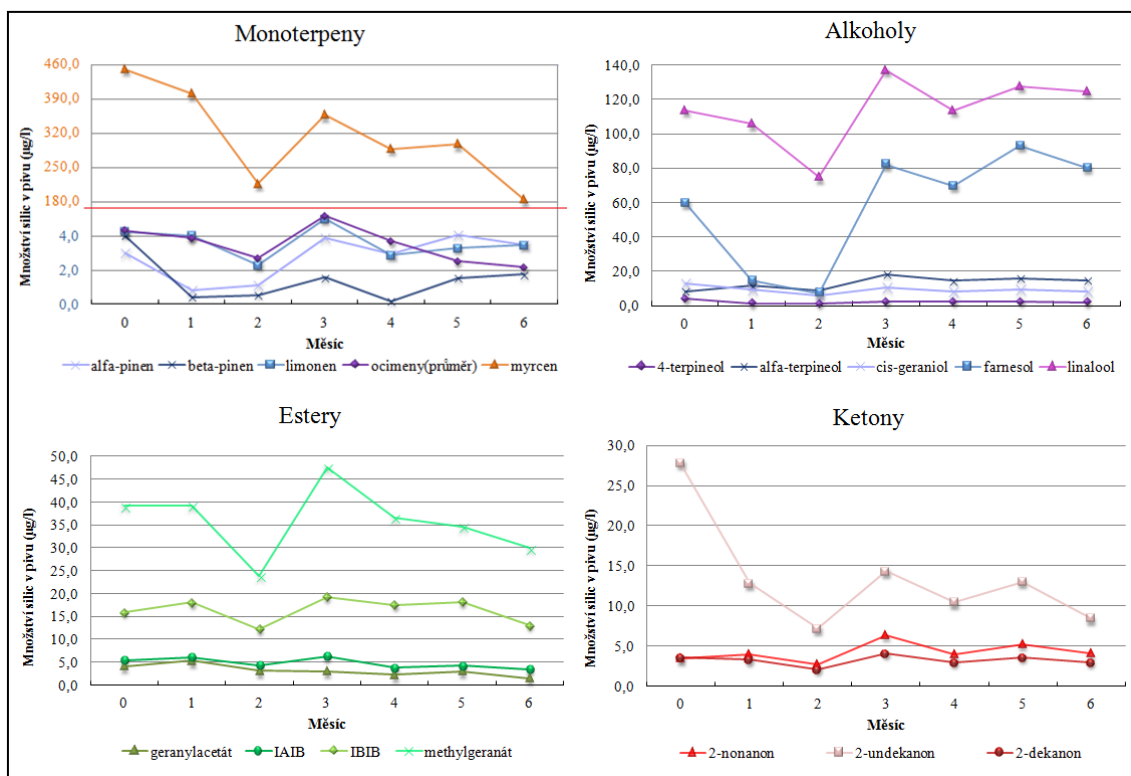
### **4.3.2 Stárnutí Piva B**

V Pivu B vykazoval kvantitativní vývoj silic v čase již menší pravidelnost. Obsah od analýzy hotového piva, kdy hodnota celkových měřených silic dosahovala 816,0 µg/l, po dva měsíce staré pivo rapidně klesal až na necelou polovinu své původní hodnoty. Ve třetím měsíci byl však naměřen skokový 90% nárůst množství silic oproti předchozímu měsíci, od čtvrtého měsíce dále obsah silic pozvolna průměrně klesal. Důležité je zde slovo průměrně, neboť, jak si lze všimnout na Obr. 14 (str. - 72 -), množství silic fluktuovalo kolem lineárně klesající funkce se zvyšujícím se zastoupením kyslíkatých látek, děje charakteristického pro stárnutí piv.

#### **4.3.2.1 Monoterpeny a seskviterpeny**

Jak si lze všimnout na Obr. 14 (str. - 72 -), vývoj funkce množství silic opět kopíruje vývoj funkce myrcenu díky jeho vysokému zastoupení v pivu. Stejně jako v případě Piva A, i pro Pivo B byla ověřena rychlosti úbytku myrcenu uvedená ve studii Forstera a Gahra.[9] Rychlost úbytku  $\frac{3}{4}$  původního množství za 100 dnů odpovídá rychlosti úbytku myrcenu v Pivu B za 60 dnů, tedy alespoň v prvních dvou měsících. Ve třetím měsíci již dochází k nezanedbatelnému nárůstu v jeho množství.

Ostatní monoterpeny byly po celou dobu stárnutí ve velmi nízkých koncentracích pod 6 µg/l a vliv jejich přínos nebyl ani v tomto případě shledán stěžejním.



**Obr. 14 – Křivky vývoje množství vybraných zástupců chemických skupin silic během šestiměsíčního stárnutí Piva B**

Osa závislosti monoterpenů musela být kvůli velkým rozdílům v množství analytů této chemické skupiny rozdělena a opatřena rozdílným měřítkem.

Funkci vývoje celkového množství silic v průběhu sledovaného období lze s menšími příspěvky ostatních silic vyjádřit jako součet vývojové funkce myrcenu a linaloolu, a to z důvodu jejich majoritního podílu ve frakci silic. Dalšími značnými přispěvateli na podobě výsledné funkce jsou: farnesol, methylgeranát, 2-undekanon a isobutylisobutyryát, lze uvažovat také alfa-terpineol a cis-geraniol.

Odlišné chování během stárnutí vykazuje keton 2-undekanon svým rapidním poklesem za první 2 měsíce skladování.

Vývoj množství seskviterpenických uhlovodíků v průběhu stárnutí, jejichž funkce stárnutí není vyobrazena, vykazoval jedinou zvláštnost, a to rapidní lineární pokles alfa-humulenu z hodnoty okolo 35,5 µg/l v čerstvém pivu na necelých 13 µg/l naměřených ve 2 měsíce starém pivu. S dalšími měsíci množství alfa-humulenu v Pivu B stále klesalo, ale již pozvolněji. Pokles těchto látek již byl pozorován [8] a konkrétně je udáván na ztráty 50 % při stárnutí 100 dnů při teplotě

20 °C.[9] Uvažujeme-li lineární průběh poklesu, tato rychlost zhruba odpovídá rychlosti poklesu alfa-humulenu v Pivu B za 60 dnů.

Velmi zvláštním poznatkem je, že, stejně jako v případě vývoje množství alfa-humulenu v Pivu A, i zde jeho vývoj funkce napříč 6 měsíci velmi připomínal funkci jednoho zástupce ketonové skupiny. Tentokrát však nešlo o 2-nonanon, nýbrž o 2-undekanon. Jak si lze všimnout z Obr. 14 (str. - 72 -), jeho množství také v prvních dvou měsících skladování klesá rapidně. Přestože byl tento jev pozorovatelný u obou vzorků piv, nenašly se žádné podklady, které by potvrdily či vyvrátily závislost.

Zbylé dva seskviterpeny beta-farnesen a beta-karyofylen se v průběhu 6 měsíců sledování držely na koncentracích okolo 3 µg/l, tudíž nelze jejich vývoj zcela sloučit s tvrzením z rešerše výše aplikovaným na alfa-humulen.

#### **4.3.2.2 Alkoholy**

Nejvíce zastoupený monoterpenický alkohol linalool měl díky koncentracím pohybujícím se nad 100 µg/l ve všech stařených vzorcích, až na jediný, prokazatelný vliv na vývoji funkce celkových silic v čase. Jak lze pozorovat na Obr. 14 (str. - 72 -), od „nultého“ měsíce v čerstvé formě do 2 měsíce starého Piva B klesá, naopak během 3. měsíce zažil skokový nárůst. Nabízené vysvětlení dle literárních zdrojů, že se linalool uvolnil ze své vázané formy či vznikl biotransformací z jiných monoterpenických alkoholů působením enzymatické aktivity kvasinek [9], což mohlo způsobit tento až 55% nárůst v jeho množství, autor přijímá až od 3. měsíce skladování, ale vzhledem k pokročilé době stáří piva již nepředpokládá takto nenadálou vysokou aktivitu zbylých kvasinek. Nicméně vývoj v množství linaloolu je relativně v souladu s informacemi v Kapitole 2.2.3.2, kdy byl reportován až 30% nárůst.

Zajímavostí v grafu Alkoholů je od druhého měsíce dále linaloolu identický vývoj v množství dalšího hojně zastoupeného alkoholu, farnesolu. Předpokládá se tedy stejná biosyntetická dráha, příp. výchozí produkt, přičemž ostatní alkoholy, vykazující konstantní množství v průběhu celé pozorované doby stárnutí, se na ní mohou podílet pouze jako dynamicky stabilní intermediáty. Nenadálá transformace z geranylacetátu dle zdroje [35] vzhledem k jeho množství pod 5 µg/l po celou dobu stárnutí není uvažována. Ostatní alkoholy, dva terpineoly a cis-geraniol, se však v Pivu B pohybují v podobných koncentracích,

takže mohou být součástí této biotransformační kaskády geraniolu a jeho esterů.

#### **4.3.2.3 Estery**

Nejvíce zastoupeným esterem v Pivu B byl napříč všemi 6 měsíci staření methylgeranát. Jeho funkce množství, identicky s funkcí linaloolu či farnesolu značně poklesla ve druhém měsíci na své minimum 24 µg/l, přechodem na 3. měsíc se toto množství dvakrát zvýšilo. Je možné, že i tato kyslíkatá silice se nějakým způsobem účastnila transformačních změn na stejných principech či vyvolaných stejným spouštěčem jako výše zmiňované alkoholy.

Nehledě na svůj vývoj, methylgeranát je v dostatečně vysokých koncentracích, aby mohl participovat na propůjčení ovocného aroma pivu.[17]

#### **4.3.2.4 Ketony**

Jak již bylo zmíněno výše v Kapitole 4.3.2.1, množství nejvíce zastoupeného sledovaného ketonu 2-undekanonu v prvních 2 měsících rapidně klesá o  $\frac{3}{4}$  původního množství naměřeného v čerstvém pivu, od 3. měsíce dále je jeho vývoj průměrně konstantní. Více než 50% úbytky dle zdroje [9] tedy sedí pouze na první 2 měsíce pozorování.

Pivu v koncentracích nad 7 µg/l poskytuje 2-undekanon květinové aroma [2, 17], takže je signifikantním přispěvatelem k výslednému sensorickému profilu Piva B takřka po celou dobu stárnutí.

I když se dle grafů funkcí množství jednotlivých zástupců silic v čase může zdát, že nejlepší sensorické vlastnosti má v případě Piva A vzorek stařený 3 měsíce, nemusí tomu tak nutně být. Sensorický profil piva nereflakuje pouze maximální množství všech přítomných aromaticky aktivních komponent a posuzovaných prvků, ale hlavně jejich skladba a vzájemný poměr množství, které jsou dle vybraného pivního stylu optimalizovány výběrem vhodných speciálních odrůd se specifickým aroma. Tento fakt podpírají hlavně výsledky sensorického hodnocení, v nichž byly sice některé vjemové atributy hodnoceny nejvyšším bodováním pro více než 4 měsíce skladovaná piva nicméně obecné chmelové parametry a atributy jako Vyhovuje stylu, Vyváženost, Obliba a Celkový dojem byly nejvyšší právě pro čerstvé pivo (Tab. 6, str. - 84 -), jak bude demonstrováno v Kapitole 4.4.1.1.

Potvrzují to i hodnoty druhově odlišného Piva B. Ač je vývoj jeho množství celkových silic, hlavních poskytovatelů chmelového aroma, v čase velmi nepravidelný, hodnoty testovaných obecných chmelových parametrů a atribut nekorelují s tímto množstvím (Obr. 16, str. - 76 -). Nejvyššího množství silic i bodů v SH sice nabývá hned čerstvý vzorek piva, nicméně ve druhém měsíci, kdy je zjištěno nejnižší celkové množství těchto aromatických komponent, zmíněné atributy nejsou na svém minimu. Tento vývoj je dán nejen změnou poměrů složek z pohledu chmelových silic, ale hlavně tvorbou markerů stárnutí, které však v této práci již nebyly analyticky stanovovány, spojených s vývinem nežádoucích vjemů starých piv, které mohou vjemově převažovat nad aromapozitivními látkami a v celkovém měřítku je, nehledě na jejich množství, maskovat [13] (Kapitola 2.2.4).

### 4.3.3 Vliv silic na sensorické vlastnosti piva

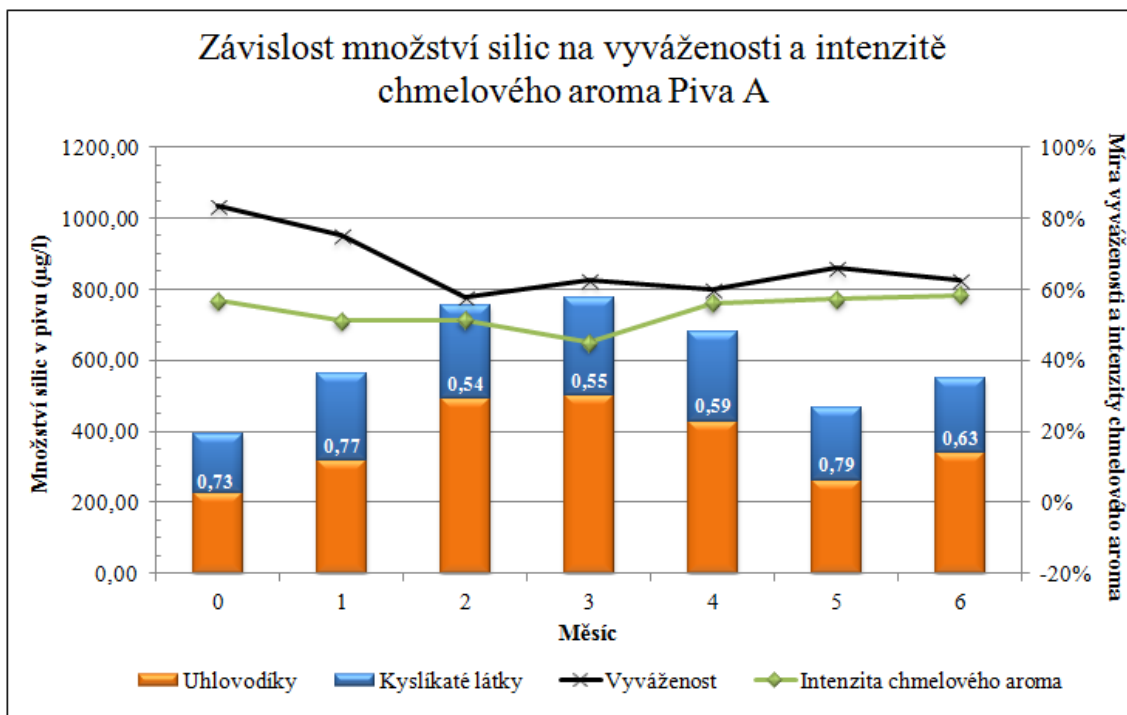
V následující kapitole byla zjišťována závislost mezi obsahem a zastoupením chemických skupin silic a vybraných analytů v pivu a sensorickými vlastnostmi v rámci stárnutí piva, tj. od hotového čerstvého produktu až po šestiměsíční stařené pivo. Tato závislost byla zjišťována aplikací korelační analýzy.

V prvním pokusu byl prověřován vliv celkového obsahu silic na chmelových attributech, oblibě a celkovém dojmu. Až na jedinou závislost dvou polí, všechny ostatní parametry však lineárně korelovaly na nedostatečně hladině významnosti, proto se nedá prohlásit, že by měl celkový obsah sledovaných silic v pivech v průběhu jejich stárnutí přímý vliv na oblibu či celkový dojem.

Velmi neočekávaným objevem je záporná středně velká korelace mezi zmíněnými poli celkových silic a chmelovým aroma, která se objevila však pouze u vzorku Piva A. Z dat vnesených do Obr. 15 (str. - 76 -) vyplývá, že množství silic v prvních měsících roste až do naměřeného maxima 774  $\mu\text{g/l}$  ve třetím měsíci, dále pak obdobnou funkcí klesá s výjimkou posledního sledovaného měsíce. Intenzita chmelového aroma má, i když s méně strmým průběhem, opačný vývoj – maximálních hodnot dosahuje v hotovém pivu a vzorku Piva A 5 a 6 měsíců starém, naopak nejnižší je ve třetím měsíci s pouhými 45 %. Toto hodnocení dokazuje, že sensorický profil piva není přímo závislý v takové míře na celkovém množství silic, jako na poměru všech aromaticky aktivních komponent vyskytujících se v pivu a jejich vzájemným interakcím.[13]

V dalším kroku byl pro každý měsíc spočítán poměr kyslíkatých vůči uhlovodíkovým analytům, jehož s časem zvyšující se hodnota je dle literárních zdrojů přirozeným jevem v procesu stárnutí piva. Zanesením dat polí

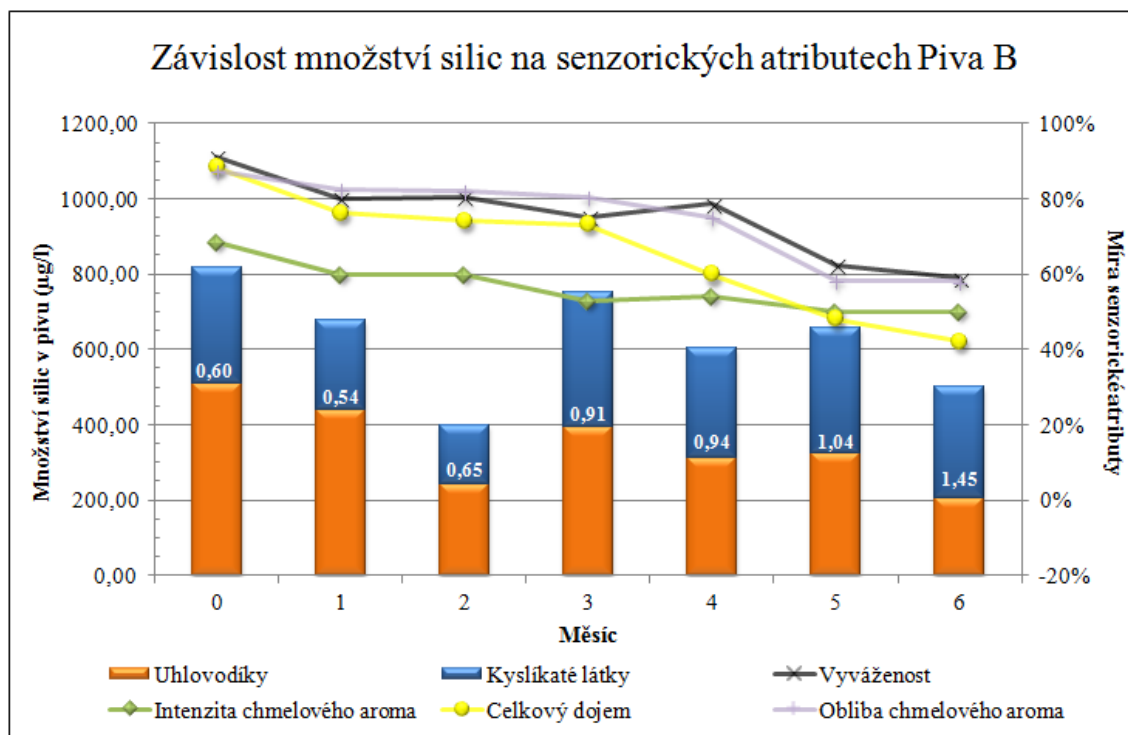
poměru kyslíkatých látek vůči uhlovodíkům a celkové vyváženosti Piva A do korelační analýzy byl získán kladný koeficient 0,73, který značí středně silnou korelaci (Obr. 15). To znamená, že čím více se sobě blížila celková množství sledovaných kyslíkatých látek a uhlovodíků, tím lépe byla hodnocena vyváženost piva. I přesto, že vyváženost reflektuje shodu zejména chuťových vjemů, je možné, že poměr kyslíkaté a uhlovodíkové frakce silic v pivu ovlivňuje alespoň jeden tento vjem, a tím i hodnotu celkové vyváženosti. Toto tvrzení však nelze spolehlivě dokázat v natolik komplexní matici, jakou pivo bezpochyby je.



**Obr. 15 – Graf závislosti vyváženosti a intenzity chmelového aroma na množství silic v Pivu A v průběhu jeho sensorického stárnutí**

Bíle vtištěná čísla ve sloupci kyslíkatých látek vyjadřují poměr mezi množstvím kyslíkatých látek a uhlovodíků, který pozitivně koreluje s vyvážeností Piva A. Dále si lze všimnout středně velké záporné korelace celkového množství silic s intenzitou chmelového aroma.

Ačkoli v Pivu B celkové množství silic sice nevykazovalo statisticky významnou shodu s žádnými atributy sensorického hodnocení, srovnání atribut s poměrem kyslíkaté látky vs. uhlovodíky poskytlo ve většině případů silnou korelaci. Zajímavé je, že všechny nalezené korelace byly negativní, jak lze vyčíst z Obr. 16.



**Obr. 16 – Graf závislosti vybraných sensorických atributů na množství silic v Pivu B v průběhu jeho sensorického stárnutí**

Bíle vtištěná čísla ve sloupci kyslíkatých látek vyjadřují poměr mezi množstvím kyslíkatých látek a uhlovodíků, který negativně silně koreluje se všemi uvedenými atributy s koeficienty korelace v rozmezí  $-0,89$  (pro Celkový dojem) až  $-0,81$  (pro Intenzitu chmelového aroma). Pro celkové množství silic v pivu nebyla za použití korelační analýzy nalezena žádná významná shoda s atributy.

S převládajícím zastoupením kyslíkatých silic nad uhlovodíkovou frakcí se s koeficientem korelace  $-0,81$  snižovala Intenzita chmelového aroma a  $-0,87$  jeho Obliba. To je celkem běžný jev při stárnutí piva, vysvětlovaný poklesem sensorické aktivity signifikantních poskytovatelů chmelového aroma, mezi které patří zejména analyty uhlovodíkové frakce myrcen, limonen a alfa-humulen, ale také jejich autooxidační produkty či linalool.[2, 16, 17, 21]

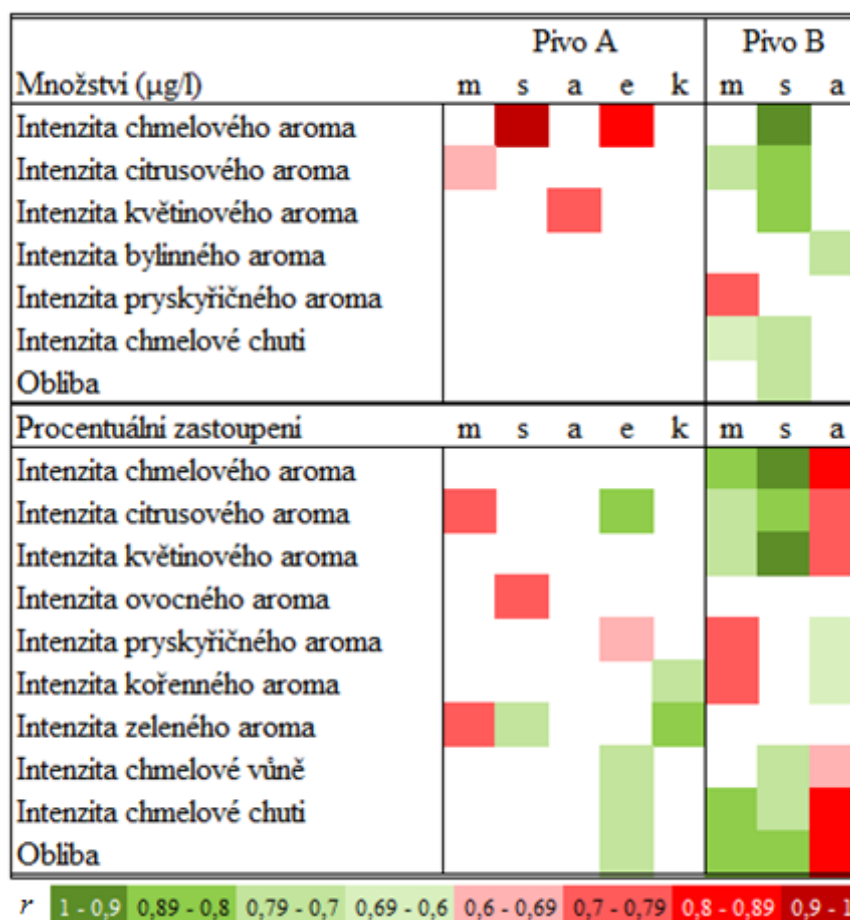
Nicméně snížení intenzity chmelového aroma v souvislosti s převahou kyslíkatých látek nad terpenickými je v rozporu s objevem Howarda a Stevense, kteří ve vodě dokázali, že kyslíkatá frakce je s nižším sensorickým prahem účinnějším poskytovatelem chmelového aroma než uhlovodíková.[16] Snížení intenzity chmelového aroma a zejména jeho oblíby tedy nemusí být výhradně výsledkem snížení množství stěžejních aroma poskytujících látek, ale také maskovacími efekty vznikajícími markerů stáří piva, kteří nebyli danou metodou stanovovány.

Opačně Pivu A, v Pivu B s převyšujícím množstvím kyslíkatých látek nad terpenickými klesala Vyuváženost chuti a zde také Celkový dojem. To buď

v tak komplexní matici nemusí nijak souviset, nebo to může to být přisuzováno vlivu tohoto poměru alespoň na jednu chuťovou složku.

#### 4.3.3.1 *Senzorické vlastnosti piv z pohledu chemických skupin silic v průběhu stárnutí*

Při bližším pohledu na množství a zastoupení konkrétních skupin silic v průběhu šestiměsíčního stárnutí ve spojitosti s měnícím se sensorickým profilem piva bylo zjištěno hned několik silných korelací (Obr. 17).



**Obr. 17 – Graf korelačních závislostí množství chemických skupin silic se sensorickými atributy chmelových zkoušek v průběhu šestiměsíčního stárnutí**

Minuskule jsou zkratky jednotlivých skupin silic: m – monoterpeny, s – seskviterpeny, a – alkoholy, e – estery, k – ketony.

Velikost korelačních koeficientů (*r*) je vysvětlena pod grafem. Zelená barva udává kladnou korelaci, červená pak zápornou. Sytost těchto barev vyjadřuje velikost závislosti (velmi silná, silná, středně silná, střední).

Obě sledovaná piva se lišila odlišnými korelačními koeficienty, a to nejen svou velikostí, ale také kladnými či zápornými hodnotami.

### **Korelace z hlediska množství skupin silic**

Z hlediska množství silic, chmelové atributy Piva A pro všechny chemické skupiny kromě ketonů vykazovaly různě silné záporné korelace alespoň s jednou atributou. To pro převážně hyperbolický vývoj funkce množství skupin silic (Obr. 13, str. - 69 -) znamená, že po dobu prvních tří měsíců, kdy docházelo k nárůstu v množství těchto sledovaných chemických skupin, specifické intenzity aroma piva naopak klesaly.

Monoterpenické frakci byl přisouzen střední vliv na Intenzitu citrusového aroma a potvrzen zápornou korelací samotného myrcenu jako majoritního zástupce s touto atributou. Seskviterpeny v Pivu A vykazovaly velmi silnou korelaci s Intenzitou chmelového aroma, která byla potvrzena velmi silnou korelací alfa-humulenu s touto atributou. Toto zjištění je naprosto v rozporu s literární rešerší i s výsledky Piva B.

Pivo B vykazovalo větší množství korelací polí množství skupin silic s chmelovými atributami. Až na Intenzitu pryskyřičného aroma, podle závislosti v Obr. 17 (str. - 78 -) údajně neposkytovanou monoterpeny, byly všechny ostatní korelace kladné, tzn. se zvyšujícím se množstvím zástupců těchto silic se zvyšovaly i intenzity jednotlivých druhů aroma v pivu. Zde se jako signifikantní poskytovatelé většiny tónů chmelového aroma jevily seskviterpeny, které až na bylinné a pryskyřičné aroma, měly vliv na všechny ostatní intenzity, nejvíce však na samotně charakteristické chmelové aroma, s jejichž množstvím byla zjištěna velmi silná korelace ( $r = 0,91$ ). Bereme-li ohled na zastoupení konkrétních seskviterpenů v průběhu stárnutí (Obr. 14, str. - 72 -), jediný alfa-humulén byl z počátku vývoje v koncentracích zajišťujících sensorický přínos, poté rapidně klesal. Prověřením korelace hodnot alfa-humulenu s intenzitou chmelového aroma byla potvrzena velmi silná korelace ( $r = 0,93$ ) mezi těmito dvěma poli, z čehož lze vyvodit alfa-humulén jako hlavní komponentou chmelového aroma. To a také kladná korelace s Intenzitou chmelové chuti je zřejmě důvodem, proč seskviterpeny z hlediska svého množství jako jediní kladně ovlivňují také pole Obliba.

### **Korelace z hlediska zastoupení skupin silic**

Pro lepší pochopení aromatických vlastností jednotlivých skupin silic bylo spočítáno procentuální zastoupení zástupců těchto skupin vzhledem k celkovému množství silic v každém měsíci stárnutí a hledána souvislost s intenzitami chmelových vjemů v pivu.

V **Pivu A** byly opět nalezeny negativní převážně středně silné korelace monoterpenů, seskviterpenů a esterů s konkrétními intenzitami. Monoterpeny vykazovaly středně velkou negativní korelaci s Intenzitou citrusového aroma již z hlediska svého množství. Mezi zástupce monoterpenů patří limonen, signifikantní poskytovatel právě citrusového aroma, jež samotný ale nevykázal statisticky významnou korelaci s intenzitou tohoto vjemu. Na rozdíl od korelace množství seskviterpenů, v tomto případě již zmizel negativní vliv na Intenzitu chmelového aroma.

Skupina esterů se zde ukázala jako středně silný poskytovatel citrusového aroma ( $r = 0,84$ ) a intenzivnějšího vjemu chmelové vůně a chutě mající vliv i na celkovou Oblibu. Zástupci této skupiny jsou význační svým ovocným aroma [13, 23], korelace s jeho intenzitou pro tuto skupinu ale nalezena nebyla, a to ani z hlediska konkrétních signifikantně zastoupených látek. U Piva A se objevila i středně velká korelace ( $r = 0,86$ ) ketonů se zeleným aroma, která je vzhledem k této obsáhle skupině poskytující mnoho různých vjemů možná.

Procentuální zastoupení silic v **Pivu B** poskytlo korelační analýzou překvapivé výsledky. Přestože korelací množství poskytla skupina alkoholů pouze středně silný vliv na intenzitu bylinného aroma, korelace zastoupení těchto látek s chmelovými atributy vykazovala negativní silný vliv na Intenzitu chmelového aroma ( $r = -0,83$ ), Intenzitu chmelové chuti, a tím pádem i Oblibu a středně silný vliv na Intenzitu citrusového a ovocného aroma. Studené chmelení je praktikováno právě za účelem importu těchto látek do piv, kde se podílejí na chmelovém aroma s květinovými a citrusovými tóny.[6, 19, 21] Tato zjištění jsou tedy v rozporu s literárními zdroji.

Korelační analýza i v případě relativního zastoupení seskviterpenů potvrdila vliv této frakce na intenzity většiny tónů chmelového aroma. Silná kladná korelace této skupiny byla objevena s chmelovým ( $r = 0,97$ ) a květinovým aroma ( $r = 0,90$ ), a společně se skupinou monoterpenů měli zástupci této frakce vliv na chmelovou chuť a tím i oblibu chmelového aroma. Monoterpeny zde vykazaly kladnou

silnou korelaci s Intenzitou chmelového aroma ( $r = 0,80$ ), jehož typickým poskytovatelem je během studeného chmelení myrcen [20, 22], nicméně středně silnou zápornou korelaci s pryskyřičným a kořeněným aroma [21], které je mu také občas přisuzováno.

Autor si je vědom, že výsledky korelační analýzy může mírně zkreslit přisuzování specifických aromatických vlastností celé samotné skupině chemicky podobných látek chmelových silic, nicméně pro účely této práce byl tento zjednodušený přístup aplikován.

Ač se výsledky v mnoha případech neshodují s literární rešerší, chmelové silice i nadále zůstávají hlavními sloučeninami propůjčující pivu jeho aromatické vlastnosti. Pro úplné pochopení by bylo nutné analyzovat všechny přítomné aromaticky aktivní látky, což by v tak komplexní matici jako je pivo velmi obtížné, stanovit jejich sensorické prahy a podrobně srovnat výsledky se sensorickým hodnocením těchto piv. I tak by se ale nesmělo opomenout, že pouhým součtem příspěvků jednotlivých aromatických látek, či skupin látek nelze vyvodit podobu celkového aroma, pouze dojít k odhadu tohoto vjemu.

Pivo bylo v tomto sensorickém testování hodnoceno komplexně, stanovovány však byly pouze chmelové silice, mohlo tedy dojít ke zmiňované synergii či maskování chmelového aroma za jiné aromatické látky, které již nebyly předmětem analýz.[13]

## 4.4 SENZORICKÁ ANALÝZA

### 4.4.1 Specifikace piv v kontrastu se SH

Pro tuto studii byla vybrána dvě druhově různá piva z roku 2019, Pivo B a Pivo A. Specifikace těchto piv na Obr. 5 uvedené výrobcem byly dány do kontrastu se sensorickým hodnocením čerstvého piva, doplněné o sensorické hodnocení piv stařených (Tab. 5, str. - 83 - a Tab. 6, str. - 84 -).

Pivo B	Pivo A
Obsah alkoholu: 4,1	Obsah alkoholu: 5,3 %
Odpočiňte si u osvěžujícího piva, které bylo speciálně uvařené na léto. Svrchně kvašený Ale nabízí patrné chmelové aroma, které je tvořeno příjemnými ovocnými a citrusovými tóny, díky kterým je pivo výjimečně pitelné. Pivo bylo chmeleno kombinací českého chmele Kazbek a amerického chmele Citra a působí celkově velmi lehkým dojmem s vyváženou hořkostí a sladkostí. Naši sládkci toto pivo uvařili pro pravou letní pohodu, a na vás je si ji s tímto speciálem užít.	Ochutnejte jemně zakalené měděné pivo s krémovou pěnou. Pro vaření tohoto typicky amerického ležáku jsme použili i populární americký chmel El Dorado. Vůně je mírně nasládlá po meruňkách či vodním melounu s lehce kořenitým a sladovým dozvukem. Po napití se projevuje karamelová chuť s plností, která je vyvážená střední hořkostí a ta nakonec mírně převažuje a přechází do středně dlouhého suchého dozívání. Pivo je čisté a vybízí k dalšímu napití.
Na zdraví!	Na zdraví!

Obr. 5 – Specifikace piv Piva B a Piva A

Převzato z [32] (20.5.2020), upraveno v programu Malování 6.3.

#### 4.4.1.1 Sensorický profil Piva B

Pivo B bylo svrchně kvašené pivo, studeně chmelené za použití chmelů Kazbek a Citra. Tyto odrůdy mu propůjčily patrné chmelové aroma dosahující bezmála 70 % v čerstvém pivu, s dobou skladování však jeho intenzita klesala až na 50 %. Citrusové tóny chmele byly dle hodnocení výrazné se stejným poklesem za čas uložení jako chmelové. Naopak ovocné tóny se nejvíce rozvinuly během pozdějších měsíců a na intenzitě narostly. Nositeli ovocného aroma v pivu jsou především estery, jejichž zastoupení s dobou uložení piva roste, což bylo potvrzeno i SH (Tab. 5). Rozdílný vývoj ovocného aroma od citrusového, a chmelového obecně, může být prisuzován odlišnému původu esterů než chmelovému.

Vyváženost, hodnocená ze základních chuťových charakteristik, čerstvě uvařeného Piva B byla velmi vysoká, s délkou skladování piva klesala lineárně až na 2/3 své původní hodnoty při stáří 6 měsíců. Hořkost byla příjemné intenzity s konstantním vývojem – od uvaření

po celou dobu stárnutí byla její hodnota stabilní a jen mírně oscillovala kolem hodnoty 36 %. Sladká chuť se v čerstvém pivu projevovala v o něco nižší intenzitě 26 % a ani stárnutím nepřekročila hodnotou intenzitu hořkosti, což potvrzuje udávanou vyváženost. S dobou skladování se v jejím vývinu neobjevil žádný pravidelný trend, což se neshoduje s Dalglieshovým odhadem [37], naopak lze říci, že čím starší bylo pivo, tím větší výkyvy ve svých hodnotách sladká chuť vykazovala.

Celkový dojem udělalo čerstvé pivo na sensorické hodnotitele z 88 %, lze tedy říci, že vzhledem k vysokému hodnocení bylo vyvážené a nemělo žádné závažné vady, které by rapidně tento ranking snižovaly. S přibývajícím dobou skladování ale hodnota celkového dojmu z piva značně lineárně klesala, a to až o polovinu do 6. měsíce. V pivu se projevila výše diskutovaná nevyváženost chutí, a společně s přibývajícím vjemovými vadami znehodnotila pivo.

#### **Tab. 5 – Srovnání sensorických charakteristik Piva B**

Srovnávány byly výsledky SH s charakteristikami deklarovanými výrobcem. Sloupce M (Nejvíce) a M (Nejméně) vyjadřují, v kolikátém měsíci byly dané atributy hodnoceny nejvyšší/nejnižší rel. známkou, která je pak uvedena v závorce.

<b>Pivo B</b>	<b>Čerstvé pivo</b>	M (Nejvíce)	M (Nejméně)
Chmelové aroma	<b>69 %</b>	-	4., 5. (50 %)
Ovocné tóny	<b>26 %</b>	5. (37 %)	2. (21 %)
Citrusové tóny	<b>46 %</b>	-	6. (26 %)
Vyváženost	<b>91 %</b>	-	6. (59 %)
Hořká chuť	<b>33 %</b>	3. (39 %)	-
Sladká chuť	<b>26 %</b>	4. (31 %)	3., 5. (20 %)
Celkový dojem	<b>88 %</b>	-	6. (42 %)

#### **4.4.1.1 Sensorický profil Piva A**

Pivo A byl polotmavý ležák amerického typu, uvařený za použití karamelového sladu a americké odrůdy chmele El Dorado. Dle specifikace výrobce má Pivo A nasládlou vůni s tóny meruněk, které se ale v sensorickém hodnocení podařilo potvrdit pouze u 4 měsíce stařeného piva, nikoli však u piva čerstvého. Aroma vodního melounu dle SH nevykazoval žádný vzorek tohoto piva. Tyto údaje lze vyčíst z **Tab. 6**.

**Tab. 6 – Srovnání sensorických charakteristik Piva A**

Srovnávány byly výsledky SH s charakteristikami deklarovanými výrobcem. Sloupce M (Nejvíce) a M (Nejméně) vyjadřují, v kolikátém měsíci byly dané atributy hodnoceny nejvyšší/nejnižší rel. známkou, která je pak uvedena v závorce.

<b>Pivo A</b>	<b>Čerstvé pivo</b>	<b>M (Nejvíce)</b>	<b>M (Nejméně)</b>
Meruňkové aroma	-	4. (4,3 %)	-
Kořenité tóny	<b>22 %</b>	6. (28 %)	1. (0,0 %)
Sladové tóny	<b>20 %</b>	5. (29 %)	2. *
Karamelová chuť	<b>27 %</b>	6. (35 %)	2. (19 %)
Plnost	<b>53 %</b>	4. (60 %)	-
Hořká chuť	<b>39 %</b>	5. (47 %)	4. (38 %)
Kulminace	<b>57 %</b>	5. (66 %)	3. (54 %)
Doznívání	<b>24 %</b>	5. (36 %)	4. (18 %)
Vyváženost	<b>83 %</b>	-	2. (58 %)
Celkový dojem	<b>81 %</b>	-	4., 6. (46 %)

Kořenité aroma bylo, až na vzorek stařený 1 měsíc, potvrzeno u všech vzorků v intenzitách pohybujících se kolem 22 %, což značí příjemně silné vjemy. Sladové tóny dosahovaly stejných hodnot jako kořenité aroma a během stárnutí vzorků také nepatrně fluktuovaly bez pravidelného trendu.

Jako další výrazná charakteristika tohoto piva byla uváděna karamelová chuť, která v čerstvém pivu dosahovala 27 % značících příjemnou intenzitu. Její další vývin však se stárnutím piva osciloval s mírně rostoucí průměrnou hodnotou, což je dle Dalglisha [37] (Obr. 6, str. - 42 -) předpokládaný vývoj této sladké chuti.

Plnost chuti byla potvrzena SH čerstvého piva hodnotami přes 50 %, s narůstajícím časem plnost piva mírně vzrůstala až k 60 %. Vyváženost byla skoro 40 % intenzity hořkosti s výraznější kulminací a slabším dozníváním. Parametry plnosti a hořkosti notně přispívají k celkové vyváženosti chuti, která byla s 83 % nejvyšší právě v čerstvém pivu, poté už pouze klesala. Nejlépe dopadlo čerstvé pivo také co se celkového dojmu týče – hodnoceno bylo podobně jako vyváženost 81 %, s přibývajícím časem skladování celkový dojem rapidně klesal až bezmála k polovině původní hodnoty.

Pohledem na Tab. 6 lze také pozorovat jisté trendy v klasifikaci různě starých vzorků. Zpravidla nejvyššími známkami skrz vjemové parametry bylo ohodnoceno pivo staré 4 – 5 měsíců. Při srovnání s čerstvým pivem se zde více rozvinuly všechny jednotlivé

organoleptické charakteristiky, nicméně vysoké hodnocení vždy neznamená nejlepší výsledek, jak lze potvrdit hodnotami vyváženosti a celkového dojmu. Některé vjemy jsou pro daný styl piva pozitivní, ne-li dokonce žádoucí, jiné naopak interferují a ubírají na celkovém dojmu konzumenta. Svou roli hraje také výraznost konkrétního vjemu – nelze totiž opomenout, že pivo je velmi komplexní nápoj, o jehož chuti rozhoduje právě nejen intenzita jednotlivých organoleptických vlastností, ale především poměr mezi nimi.

## 5 ZÁVĚR

1. Cíl: Provedení validace izolačních metod silic z chmelového materiálu a piva.

Retrospektivní validace metod extrakce silic z chmele a piva byla splněna v rozsahu všech parametrů, které bylo možné z poskytnutých dat extrahovat.

Metoda FBE-SPE/GC-MS pro izolaci silic z **chmelového materiálu** poskytla z důvodu statisticky nízkého množství měření ( $n = 4$ ) a použití vysokoobsažného chmele zkreslené záznamy s nadprůměrně vysokými hodnotami validačních parametrů, nicméně díky záznamu měření validačních parametrů VÚPS z minulých let mohly být některé tyto výsledky uvedeny na pravou míru (Tab. 3, str. - 56 -).

Koncentrace 33 stanovovaných analytů se v měřeném chmelu pohybovala v rozmezí 0,32 – 5109,06 mg/kg a jejich měření ( $n = 4$ ) poskytlo průměrnou 11% varianci, ze které byla stanovena nominální 22 % rozšířená nejistota. Průměrná opakovatelnost dosahovala 0,31, jejíž nadprůměrnou hodnotu vykazovaly hlavně látky skupiny ketonů a látky seskviterpenické povahy. Limit detekce a stanovení se pro každou látku lišil, přičemž nejnižších hodnot LOD pod 0,50 mg/kg vykazovaly ve chmelu minoritně zastoupené látky (např. methylestery), naopak hojně zastoupené silice (myrcen, alfa-humulen) nabývaly hodnot LOD přes 1000,00 mg/kg.

Metoda SD/GC-MS použitá pro extrakci silic ze vzorků **piva** vykazovala uspokojivější výsledky. Stanovováno bylo 33 analytů ( $n = 12$ ) a výsledky měření piv napříč jejich stárnutím navíc posloužily také pro ověření preciznosti metody (Obr. 7, str. - 53 -). Koncentrace sledovaných látek se v čerstvém pivu pohybovala v rozmezí 0,09 – 202,62  $\mu\text{g/l}$  s koeficientem variance 14% a průměrnou 28% rozšířenou nejistotou a opakovatelností 0,39. Limity detekce se pro různé analyty pohybovaly ve spektru hodnot 0,01  $\mu\text{g/l}$  (beta-ionon) – 42,49  $\mu\text{g/l}$  (myrcen). Validací parametry silic v pivu byly VÚPS doplněny o data výtěžnosti, jejíž průměrná hodnota byla 100 %.(Tab. 2, str. - 55 -)

Vysoké hodnoty limitů detekce analytů získaných oběma metodami mohou být přisuzovány nemožnosti optimalizace koncentračních hladin konkrétních analytů jejich doporučené 1-5násobky očekávaných LOD v tak komplexních maticích, kterými chmel i pivo bezpochyby jsou.

## 2. Cíl: Studium přenosu silic z chmele do piva v průběhu studeného chmelení.

Přenos silic z chmelového materiálu do piva je řízen prostou difúzí hlavně v závislosti na chemické povaze látek, složení matrice a obsahu alkoholu. Jak se dle literární rešerše potvrdilo, do piva velmi dobře přecházejí látky alkoholové povahy (Tab. 4, str. - 58 -), které jsou označovány jako jedny z poskytovatelů chmelového aroma. Vůbec nejvyššího stupně extrakce dosahoval linalool s 69% přechodem do Piva A a až 94% mírou přechodu do Piva B, což koresponduje s údaji uvedenými v literární rešerši v Kapitole 2.2.3.2. Nadprůměrně přecházel do Piva B i další alkohol cis-geraniol. Nicméně přenosové míry terpenických alkoholů z chmele do piva mohou být zkreslené, neboť byly působením kvasinek dokázány biotransformační přeměny a vzájemné konverze (Obr. 3, str. - 22 -).

Vysoké míry přenosu vykazovaly také velmi aromatické estery v čele s isobutylisobutyratem s 56% přechodem do Piva A, méně do Piva B s 44%. Výsledky opět relativně odpovídaly studiím reportovaným v Kapitole 2.2.3.2.

Naopak nepolární zástupci frakce monoterpenů se do piva dostávaly v nízké extrakční míře okolo 2 %, seskviterpeny během studeného chmelení dokonce podléhaly ztrátám. Je však udáváno, že podléhají autooxidaci poskytující kyslíkaté produkty, jež se do piva dostávají lépe a vykazují dokonce silnější chmelové aroma.

Přestože extrakční míra těchto látek není vysoká, díky svému majoritnímu zastoupení v hotových čerstvých pivech (58 % z celkových silic v Pivu A, 63 % z celkových silic v Pivu B) mají velký přínos na aroma výsledného produktu.[25]

Přenosové míry většiny ostatních látek se pohybovaly kolem nulových hodnot, což znamená, že se z chmele do piva v procesu studeného chmelení vůbec nepřenášely,

nebo jejich ztráty během tohoto technologického kroku byly větší než procento přenosu.

3. Cíl: Studium profilu sensoricky aktivních látek během stárnutí studeně chmelených piv. Korelace se sensorickým testováním.

Přestože byla Piva A a B stařena stejně dlouhou dobu za identické teploty, obě poskytla odlišný vývoj v množství silic. Funkce vývoje celkových silic v obou pivech (Obr. 13, str. - 69 - a Obr. 14, str. - 72 -) kopírovala vývoj myrcenu a linaloolu, dvou v pivech nejvíce zastoupených silic.

Funkce změny množství celkových silic v **Pivu A** měla hyperbolický tvar s maximem ve 3. měsíci. Výsledky pozorování byly v rozporu s literární rešerší:

- množství linaloolu nebylo konstantní, ani se nezvýšilo o 30 %, avšak roli mohlo hrát množství 3,5krát větší oproti literatuře
- ztráty myrcenu nebyly ve sledovaném období tak rapidní
- estery a ketony vykazovaly udávané ztráty, ale až od 3. měsíce dále

Funkce změny množství celkových silic v **Pivu B** měla nepravidelný průběh s několika skokovými změnami v množství ve 2. a 3. měsíci. Výsledky pozorování byly srovnány s literární rešerší:

- rychlost úbytku myrcenu v prvních 2 měsících odpovídala rešerši, poté docházelo k jeho nepředvídanému nárůstu v množství
- rychlost úbytku alfa-humulenu zhruba odpovídala rychlosti úbytku seskviterpenů v literární rešerši, zbylých dvou seskviterpenů již ne
- množství linaloolu nebylo konstantní, s časem fluktuovalo
- 50% úbytky v množství ketonů odpovídají pouze vývoji 2-undekanonu v prvních 2 měsících

Ačkoli změny v obsahu aromatických látek ne vždy zcela korespondovaly s uvedenými zdroji, je potřeba brát v potazu odlišné vstupní suroviny a technologie studeného chmelení, které mohly mít vliv na vývoj konkrétních látek.

Dále byla v Kapitole 4.3.3 za použití korelační analýzy zjišťována souvislost mezi obsahem a zastoupením silic v pivu a jeho sensorickými vlastnostmi napříč celé doby stárnutí.

V jedné chmeleném **Pivu A** se obecně vyskytovaly tyto korelace spíše negativní (**Obr. 17**, str. - 78 -), počínaje středně silným negativním vlivem celkového množství silic na Intenzitu chmelového aroma. Tato negativní korelace by mohla dokazovat, že sensorický profil piv není v takové míře přímo závislý na celkovém množství přítomných silic, jako spíše na poměru všech aromaticky aktivních komponent a jejich interakcí.[13] Další velmi silné negativní korelace byly v Pivu A nalezeny kontrastem množství a procentuálního zastoupení konkrétních chemických skupin silic s chmelovými atributy, za zmínku stojí zejména velmi silná negativní korelace seskviterpenů s intenzitou chmelového aroma ( $r = -0,95$ ), která je v rozporu s literární rešerší.

V obou pivech byla nalezena korelace (v případě Piva A kladná, u Piva B záporná) poměru kyslíkaté vůči uhlíkaté frakci s Vyvážeností. Ta reflektuje shodu zejména chuťových vjemů, ale je možné, že poměr kyslíkatých a uhlíkatých látek silic ovlivňuje alespoň jeden tento vjem, a tím i hodnotu celkové vyváženosti.

V dvakrát chmeleném **Pivu B** tento poměr silně negativně koreloval s Oblibou a Intenzitou chmelového aroma, z čehož vyplývá, že při převaze kyslíkatých látek nad uhlovodíky – jevu doprovázejícímu sensorické stárnutí piv – sláblo i chmelové aroma, za nějž je z valné části zodpovědná právě uhlíkatá frakce.[2, 16, 17]

Dále byl v Pivu B potvrzen kladný vliv na většinu chmelových atribut, hlavně díky seskviterpenické frakci v čele s alfa-humulénem, který, na rozdíl od výsledků korelace v Pivu A, velmi silně kladně koreloval s Intenzitou chmelového aroma ( $r = 0,93$ ), a tím pádem byl označen za jednoho z jeho signifikantních poskytovatelů.

Stěžejní komponenta studeného chmelení, linalool, samotný nevykázal žádnou statisticky významnou korelaci s chmelovými atributy testovanými v rámci SH.

Přestože v této diplomové práci byla použita analyticky naměřená data reflektující přesné množství hlavních poskytovatelů chmelového aroma, nelze opomínat, že pivo je velmi složitá matrice. Jeho výsledný sensorický profil tedy nelze přesně spočítat pouhým součtem příspěvků těchto látek. Aroma výsledného produktu musí být uvažováno z komplexního hlediska jako výsledek synergických a antagonistických působení všech přítomných sensoricky aktivních složek.[13, 36]

#### 4. Cíl: Sensorické zhodnocení piv.

Srovnáním sensorického profilu analyzovaných studeně chmelených čerstvých vzorků piv došlo ke shodě sensorického hodnocení s výrobcem avizovanou specifikací těchto piv. Toto zjištění může zpětně posloužit jednak k potvrzení, že sensorické testování na VÚPS poskytuje správné a jakostní výsledky, dále pak ke zvýšení důvěryhodnosti k výrobcí ze strany běžného konzumenta.

## SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] STEVENS, Roger. The Chemistry of Hop Constituents [online]. 1966 [vid. 2019-07-22]. Dostupné z: <https://datapdf.com/the-chemistry-of-hop-constituents.html>
- [2] ALMAGUER, Cynthia, Christina SCHÖNBERGER, Martina GASTL, Elke K. ARENDT a Thomas BECKER. Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2014, **120**(4), 289–314. ISSN 0046-9750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.160
- [3] KROFTA, Karel, Josef PATZAK, Tomáš SEDLÁK, Alexandr MIKYŠKA, Karel ŠTĚRBA a Marie JURKOVÁ. Kazbek – The First Czech Aroma “Flavor Hops” Variety: Characteristics and Utilization. *KVASNY PRUMYSL* [online]. 2019, **65**. Dostupné z: doi:10.18832/kp2019.65.72
- [4] XIE, Zhisheng, Qundi LIU, Zhikun LIANG, Mingqian ZHAO, Xiaoxue YU, Depo YANG a Xinjun XU. The GC/MS Analysis of Volatile Components Extracted by Different Methods from Exocarpium Citri Grandis. *Journal of analytical methods in chemistry* [online]. 2013, **2013**, 918406. Dostupné z: doi:10.1155/2013/918406
- [5] KNEZ HRNČIČ, Maša, Eva ŠPANINGER, Iztok KOŠIR, Željko KNEZ a Urban BREN. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients* [online]. 2019, **11**(2), 257. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11020257
- [6] ŠTĚRBA, Karel, ČEJKA PAVEL, ČULÍK JIŘÍ, JURKOVÁ MARIE, KROFTA KAREL, Martin PAVLOVIC, Alexandr MIKYŠKA a Jana OLŠOVSKÁ. Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Detection. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2015, **73**, 151–158. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2015-0406-01
- [7] MARSILI, Ray. *Sensory-directed flavor analysis*. B.m.: CRC Press, 2006. ISBN 1-4200-1704-7.
- [8] OPSTAELE, Filip Van, Gert De ROUCK, Jessika De CLIPPELEER, Guido AERTS a Luc De COOMAN. Analytical and Sensory Assessment of Hoppy Aroma and Bitterness of Conventionally Hopped and Advanced Hopped Pilsner Beers. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2010, **116**(4), 445–458. ISSN 2050-0416. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2010.tb00796.x
- [9] FORSTER, A a Andreas GAHR. On the Fate of Certain Hop Substances during Dry Hopping. *Brewing Science*. 2013, **66**, 93–103.

- [10] HAUSER, Dean, Scott LAFONTAINE a T.H. SHELLHAMMER. Extraction Efficiency of Dry-Hopping. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2019. Dostupné z: doi:10.1080/03610470.2019.1617622
- [11] CLIPPELEER, Jessika, Filip OPSTAELE, Andreas GAHR a Adrian FORSTER. Reproducibility Trials in a Research Brewery and Effects on the Evaluation of Hop Substances in Beer - Part 3: Transfer Rates of Aroma Compounds from Hops to Beer and their Ageing Behaviour [online]. 2019, **72**, 217–227. Dostupné z: doi:10.23763/BrSc19-27gahr
- [12] PREEDY, Victor R., ed. *Beer in health and disease prevention*. Burlington, Mass.: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978-0-12-373891-2.
- [13] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ a Tomáš LEJSEK. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [14] ŠKODA, Jakub, Petr GABRIEL a Miroslav DIENSTBIER. Světelná degradace piva a tvorba letinkové příchuti. *Chemické listy*. nedatováno, **2016**(110), 112–117.
- [15] HUGHES, Paul a William SIMPSON. Production and composition of hop products. *MBAA Tech. Q.* 1993, **30**, 146–154.
- [16] STEVENS, Roger. The Chemistry of Hop Constituents. *Chemical Reviews* [online]. 1967, **67**(1), 19–71. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr60245a002
- [17] BRIGGS, D. E. *Brewing: science and practice* [online]. Boca Raton; Cambridge, England: CRC Press ; Woodhead Pub., 2004 [vid. 2019-07-22]. ISBN 978-1-59124-919-1. Dostupné z: [http://vinic.com/files/books/Brewing\\_Science\\_and\\_Practice\\_\\_2004\\_.pdf](http://vinic.com/files/books/Brewing_Science_and_Practice__2004_.pdf)
- [18] MEILGAARD, M. HOP ANALYSIS, COHUMULONE FACTOR AND THE BITTERNESS OF BEER: REVIEW AND CRITICAL EVALUATION. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2. leden 1960 [vid. 2019-07-19]. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1960.tb01696.x
- [19] BAMFORTH, C. *Brewing: New Technologies*. B.m.: Woodhead Publishing, 2006. ISBN 978-1-84569-173-8.
- [20] ESSLINGER, Hans Michael. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. B.m.: John Wiley & Sons, 2009. ISBN 978-3-527-62349-5.
- [21] The Oxford Companion to Beer Definition of dry hopping,. *Craft Beer & Brewing* [online]. [vid. 2020-08-05]. Dostupné z: <http://beerandbrewing.com/definition/96jvGQTSdT/>

- [22] JELÍNEK, Lukáš, Jana MÜLLEROVÁ, Marcel KARABIN a Pavel DOSTÁLEK. The secret of dry hopped beers - Review. *Kvasny Prumysl* [online]. 2018, **64**, 287–296. Dostupné z: doi:10.18832/kp201836
- [23] TAKOI, Kiyoshi, Keita TOKITA, Ayako SANEKATA, Yoshiharu USAMI, Yutaka ITOGA, Koichiro KOIE, Ichiro MATSUMOTO a Yasuyuki NAKAYAMA. Varietal Difference of Hop-Derived Flavour Compounds in Late-Hopped/Dry-Hopped Beers. *BrewingScience*. 2016, **69**, 1–7.
- [24] Linalool – Fresh and Floral Hop Aroma. *beer sensory science* [online]. 16. únor 2012 [vid. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://beersensoryscience.wordpress.com/2012/02/16/linalool-fresh-and-floral-hop-aroma/>
- [25] GOIRIS, Koen, Marjan de RIDDER, Gert de ROUCK, Annick BOEYKENS, Filip Van OPSTAELE, Guido AERTS, Luc de COOMAN a Denis de KEUKELEIRE. The Oxygenated Sesquiterpenoid Fraction of Hops in Relation to the Spicy Hop Character of Beer. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2002, **108**(1), 86–93. ISSN 2050-0416. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2002.tb00129.x
- [26] JACKSON, John F. a H. F. LINSKENS. *Analysis of Taste and Aroma*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 978-3-662-04857-3.
- [27] LAWS, D. R. J. a T. L. PEPPARD. The stability of flavour constituents in alcoholic beverages. *Food Chemistry* [online]. 1982, **9**(1), 131–146. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/0308-8146(82)90074-7
- [28] PUSHPANGADAN, P. a V. GEORGE. 4 - Basil. In: K. V. PETER, ed. *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2012 [vid. 2020-05-24], Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, s. 55–72. ISBN 978-0-85709-039-3. Dostupné z: doi:10.1533/9780857095671.55
- [29] *Hop report for the harvest year 2018* [online]. B.m.: European Commission. 13. červen 2019. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/food-farming-fisheries/plants\\_and\\_plant\\_products/documents/hop-report-2018\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/food-farming-fisheries/plants_and_plant_products/documents/hop-report-2018_en.pdf)
- [30] *European beer trends: Statistics report, 2019 edition* [online]. B.m.: The Brewers of Europe. 5. prosinec 2019. Dostupné z: <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2019/european-beer-trends-2019-web.pdf>
- [31] PROGRAM PLZEŇSKÉHO PRADROJE „VOLBA SLÁDKŮ“ MÁ ZA SEBOU PRVNÍCH 7 ÚSPĚŠNÝCH MĚSÍCŮ. DÍKY POPULARITĚ POKRAČUJE. *Prazdroj* [online]. 24. listopad 2015 [vid. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.prazdroj.cz/1562-program-plze-sk-ho-pradroje-volba-sl-dk-m-za-sebou-prvn-ch-7-sp-insch-m-s-c-d-ky-popularit-pokra-uje>

- [32] *Volba sládků* [online]. [vid. 2020-05-20]. Dostupné z: <https://www.volbasladku.cz/#beer-on-spigot>
- [33] České pivo. *Prazdroj* [online]. [vid. 2020-05-30]. Dostupné z: <https://www.prazdroj.cz/nas-pribeh/ceske-pivo>
- [34] COCUZZA, Sandro, Martin ZARNKOW, Alexander STALLFORTH, Frank PEIFER a Fritz JACOB. The impact of dry hopping on selected physical and chemical attributes of beer. *BrewingScience* [online]. 2019, (Volume 72), 118–124. ISSN 1613-2041. Dostupné z: doi:10.23763/BrSc19-13cocuzza
- [35] FORSTER, Adrian, Andreas GAHR a Filip OPSTAELE. On the transfer rate of geraniol with dry hopping. *BrewingScience*. 2014, **67**, 60.
- [36] OLŠOVSKÁ, Jana, Karel ŠTĚRBA, Tomáš VRZAL, Marie JURKOVÁ a PAVEL ČEJKA. Sensory Beer Aging. *Kvasný průmysl* [online]. 2016, **62**, 250–257. Dostupné z: doi:10.18832/kp2016027
- [37] DALGLIESH, C. E. Flavour stability [of beer]. In: *Proceedings of the 16th congress-European Brewery Convention. Amsterdam (Netherlands). May 1977*. 1977.