Vliv podmínek fermentace na kvalitu ciderů

Anita Rejdlová

Bakalářská práce
2020

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Anita Rejdlová**
Osobní číslo:	**T17134**
Studijní program:	**B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie a technologie potravin**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Vliv podmínek fermentace na kvalitu ciderů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část
1. Technologie výroby ciderů.
2. Proces fermentace při výrobě ciderů.
3. Podmínky kultivace mikroorganizmů využívaných při výrobě ciderů.

II. Praktická část
1. Výroba ciderů za různých podmínek kultivace.
2. Analýza vyrobených ciderů.
3. Určení optimálních podmínek kultivace.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

[1] SUÁREZ VALLES, Belén et al., 2008. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). Food Microbiology. 25 (5), 690-697. DOI: 10.1016/j.fm.2008.03.004. ISSN 07400020. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000506.
[2] JEANTET, Romain et al., 2016. Handbook of food science and technology. Hoboken, NJ. Food science and technology series (London, England). ISBN 978-184-8219-342.
[3] KUCK, Ulrich, FRANKENBERG-DINKEL, Nicole, 2015. Biotechnology. De Gruyter. Retrieved from https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpB0000011/biotechnology/biotechnology.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zuzana Míšková, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Teoretická část této práce se zabývá technologií výroby alkoholického nápoje cider, dále procesem fermentace a kvasinkami, které se k výrobě ciderů využívají.

V praktické části této práce bylo cílem sledovat změny vybraných parametrů vyrobených ciderů během 30 dní fermentace při 15 a 25 °C, popřípadě určit vhodné kultivační podmínky pro výrobu ciderů. Vzorky byly analyzovány 1., 2., 3., 4., 5., 11. a 30. den fermentace. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že při vyšší kultivační teplotě kvasinek (25 °C) bylo již 11. den fermentace dosaženo nejvyššího skutečného stupně prokvašení (86,04 %) a také byl naměřen nejvyšší obsah alkoholu (6,90 %,), zmíněné hodnoty zůstaly stabilní, čímž bylo potvrzeno, že byla v médiu vyčerpána zásoba zkvasitelných sacharidů. Při nižší kultivační teplotě (15 °C) byl nejvyšší skutečný stupeň prokvašení (86,04 %) a nejvyšší obsah alkoholu (6,98 %) zaznamenán teprve 30. den fermentace. Bylo tedy potvrzeno, že při vyšších teplotách fermentace je metabolismus použitých kvasinek rychlejší, avšak nelze říct, která ze dvou teplot je vhodná pro výrobu alkoholického nápoje typu cider vyvážené chuti. Z výsledků stanovení obsahu rozpustné sušiny a zdánlivého stupně prokvašení bylo totiž patrné, že i když byly vyčerpány zkvasitelné sacharidy, pokračovala v médiu přeměna dusíkatých látek na vedlejší produkty ovlivňující organoleptické vlastnosti cideru. Tudíž by bylo vhodné doplnit provedené analýzy senzorickým hodnocením vyrobených ciderů.

Klíčová slova: cider, technologie výroby, kultivační podmínky, fermentace

ABSTRACT

The theoretical part of my bachelor thesis deals with technology of alcoholic beverage cider production, the fermentation process and yeasts, which are used in cider making.

In the practical part, the aim of this work was to monitor changes in selected parameters of produced ciders during 30 days of fermentation at 15 and 25 ° C, and to determine suitable culture conditions for cider production. Samples were analyzed on days 1, 2, 3, 4, 5, 11 and 30 of fermentation. From the obtained results it was found that at a higher culture temperature of the yeast (25 °C) the highest real degree of fermentation (86.04 %) was reached on the 11th day of fermentation and the highest alcohol content (6.90 %) was also measured, mentioned the values remained stable, confirming that the supply of fermentable carbohydrates in the medium had been depleted. At a lower culture temperature (15 ° C), the highest real degree of fermentation (86.04 %) and the highest alcohol content (6.98 %) were recorded on day 30 of fermentation. Thus, it was confirmed that at higher fermentation temperatures, the metabolism of the yeast used is faster, but it is not possible to say which of the two temperatures is suitable for the production of an alcoholic beverage of the balanced taste type. Indeed, the results of the determination of the soluble solids content and the apparent degree of fermentation showed that even though the fermentable carbohydrates had been depleted, the conversion of nitrogenous substances into by-products affecting the organoleptic properties of cider continued in the medium. Therefore, it would be appropriate to supplement the performed analyzes with a sensory evaluation of the produced ciders.

Keywords: cider, technology of production, culture conditions, fermentation

Tímto bych chtěla poděkovat především Ing. Zuzaně Míškové, PhD, vedoucí bakalářské práce, za užitečné rady, věcné připomínky, ochotu a trpělivost při zpracovávání bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří při mně stáli, a mohla jsem se na ně vždy ve všem spolehnout.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 TECHNOLOGIE VÝROBY CIDERŮ **12**
1.1 VÝBĚR OVOCE 12
1.1.1 Skupiny jablek podle chuti dužiny 13
1.1.2 Skupiny jablek podle doby zrání 13
1.2 TŘÍDĚNÍ 14
1.3 PRANÍ 14
1.4 DRCENÍ 14
1.5 LOUŽENÍ 15
1.6 LISOVÁNÍ 16
1.6.2 Měření hustoty 17
1.6.3 Síření 18
1.6.4 Samočištění „keeving“ 18
1.7 KVAŠENÍ 19
1.8 LAHVOVÁNÍ 21
2 PROCES FERMENTACE PŘI VÝROBĚ CIDERŮ **22**
2.1 ALKOHOLOVÉ KVAŠENÍ 22
2.1.1 Charakteristika 22
2.1.2 Podmínky pro průběh alkoholického kvašení 23
2.1.3 Glykolýza (Embden-Meyerhof-Parnasova dráha) 24
2.2 MALOLAKTICKÁ FERMENTACE 26
2.2.1 Charakteristika 26
2.2.2 Podmíky pro průběh jablečno-mléčné fermentace 27
3 PODMÍNKY KULTIVACE MIKROORGANISMŮ VYUŽÍVANÝCH PŘI VÝROBĚ CIDERŮ **29**
3.1 KVASINKY 29
3.2 ŽIVINY 29
3.3 KULTIVACE 30
3.3.1 Kultivační půdy 31
II PRAKTICKÁ ČÁST **33**
4 CÍL PRÁCE **34**
5 METODIKA PRÁCE **35**
5.1 POPIS EXPERIMENTU 35
5.2 CHEMICKÁ ANALÝZA 35
5.2.1 Měření pH 35

5.2.2 Stanovení obsahu rozpustné sušiny 36
5.2.3 Stanovení stupně fermentace, obsahu alkoholu a hustoty 36
6 VÝSLEDKY A DISKUSE 37
6.1.1 Výsledky stanovení pH 37
6.1.2 Výsledky stanovení obsahu rozpustné sušiny 39
6.1.3 Výsledky stanovení stupně fermentace, obsahu alkoholu a hustoty 40
ZÁVĚR 44
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 45
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 50
SEZNAM OBRÁZKŮ 51
SEZNAM TABULEK 52
SEZNAM PŘÍLOH 53

ÚVOD

Cider je alkoholický nápoj vyráběný fermentací jablečného moštu. Obsah alkoholu se pohybuje od 0,5–8,2 %. Výroba nápoje je poměrně jednoduchá a sestává z několika základních technologických operací od výběru jablek až po lahvování. Již výběr jablek významně ovlivňuje výslednou kvalitu cideru, a je proto důležité vytvořit směs z odrůd vhodných k výrobě ciderů. [1,2,3,4]

Během výroby se, jako u každého alkoholického nápoje, využívá fermentace pomocí vhodných mikroorganismů. Jedná se o složitý biochemický proces, kdy dochází k přeměně zkvasitelných sacharidů na alkohol. Při výrobě ciderů se uplatňuje jak ethanolové kvašení, tak kvašení jablečno-mléčné, díky čemuž dochází ke zlepšení organoleptických vlastností cideru. Během fermentace vznikají i jiné sloučeniny, které ovlivňují výsledné aroma i chuť ciderů. [5]

Cílem bakalářské práce bylo sledování změn vybraných vlastností vyrobených ciderů během 30 dní fermentace při teplotě 15 a 25 °C. Byly sledovány změny pH, obsahu rozpustné sušiny, stupně prokvašení, hustoty a obsahu alkoholu vždy 1., 2., 3., 4., 5., 11. a 30. den fermentace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY CIDERŮ

Cider je alkoholický nápoj vyrobený ze zkvašeného jablečného moštu. Vyhláška č. 248/2018 Sb. definuje cider jako „nápoj vyrobený úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvé nebo koncentrované jablečné šťávy nebo sušené jablečné šťávy, ke které byla přidána voda, nebo jejich směsi; přídavek vody, cukru a nejvýše 25 % objemových jiné šťávy, a to před i po kvašení; aromatizace přírodními aromatickými látkami z ovoce je možná; přípustné je též přidání čerstvé nebo koncentrované jablečné šťávy po kvašení a upravení obsahu oxidu uhličitého jeho přidáním nebo částečným či úplným odstraněním; přípustné je rovněž použití sušených nebo koncentrovaných potravin přidávaných v průběhu výroby pro jejich barvicí účinek“. [1,2]

Postup tradiční výroby zkvašeného moštu typu cider se dá shrnout do devíti základních operací, které zahrnují [3,4]:

- Výběr ovoce
- Třídění ovoce
- Praní ovoce
- Drcení ovoce
- Loužení (macerace)
- Lisování
- Předfermentační úprava
- Kvašení (fermentace)
- Stáčení

Jednotlivými základními operacemi se podrobněji zabývají podkapitoly 1.1 až 1.9.

1.1 Výběr ovoce

K výrobě ciderů se využívají speciální odrůdy jablek. Hlavním rozdílem od běžně dostupných odrůd je vyšší obsah fenolických látek, které cideru dodávají specifické senzorické vlastnosti a přítomnost kyselin, kdy nejobsáhlejší je kyselina jablečná. Obecně by měla jablka obsahovat více sacharidů než kyselin, aby výsledná šťáva lépe fermentovala. Další důležitou látkou pro výrobu ciderů, kterou jablka obsahují, je tanin. Ten ovlivňuje sytost barvy cideru, která se mění v závislosti na množství přítomného taninu. Zjednodušeně se dá říct, že je cider sytější barvy, pokud jsou jablka

bohatší na taniny. Hořkost a trpkost dužiny je dána přítomnými prokyanidiny. Jedná se o fenolické látky, oligomery a polymery flavan-3-olu. V jablcích se vyskytuje jen jeden typ, a to prokyanidin B2. [3,4,5,6,8,11]

Výsledná jakost šťávy závisí na jakosti výchozí suroviny. Mezi nejčastější omyl při výběru ovoce je, že se může pro další zpracování využít ovoce nižší jakosti, zcela nekvalitní nebo i částečně zkvašené. Nesmí se využít ovoce napadené hnilobou nebo plísní. I po odstranění plesnivých částí se mohou v jablku vyskytovat škodlivé mykotoxiny. Stejně tak se nezpracovává ovoce nezralé a přezrálé. [9,10]

Směs pro výrobu ciderů obvykle tvoří více druhů jablek. Hlavním důvodem je, že každý druh dodá cideru určitou vlastnost. Takto vyrobený cider se nazývá „cider západního stylu“. Jablka, vhodná na výrobu, se dají dělit do dvou skupin podle jejich chuti a doby zrání. [3,4,5,8]

1.1.1 Skupiny jablek podle chuti dužiny

Jablka se dají podle jejich chuti rozdělit do čtyř základních skupin na sladká, kyselá, hořká nebo trpká a hořkosladká. [4]

Sladká jablka dodávají cideru sladkou chuť a obsahují zkvasitelné cukry. Obsah taninů a kyselin je v těchto jablcích nízký. [4,8]

Jablka **kyselá** využívají výrobci pro vyšší množství kyseliny jablečné, která chrání výsledný produkt před nežádoucí změnou barvy. Ve směsi jablek pro výrobu by měla být zastoupená však jen v malém množství, aby cider nebyl příliš kyselý. [4,8]

Jako další se využívají jablka **hořké** nebo **trpké** chuti. Ty se přidávají do směsi kvůli vysokému obsahu taninů. Jejich přítomnost usnadní následné čistění cideru, jeho uchovávání a taky dodá větší plnost v chuti. Podíl jablek této chuti by měl být ve směsi asi třetinový z celkového objemu. [4,8]

Nedílnou součástí jsou i jablka **hořkosladká**, která se podílejí na ustálení obsahu alkoholu v cideru. Mají také vysoký obsah taninů. [4,8]

1.1.2 Skupiny jablek podle doby zrání

Další možností, jak lze jablka vhodná na výrobu cideru rozdělit, je jejich doba zrání. Jedná se o letní, podzimní až raně zimní a zimní odrůdy. [4]

Letní odrůdy jablek se musí zpracovávat rychle v letním období. Fermentace těchto odrůd je velmi rychlá a obtížně kontrolovatelná. Výsledný produkt pak bývá obvykle v kategorii sec nebo brut. [4]

Podzimní až raně zimní odrůdy jsou pro zpracování nejlepší z důvodu vyrovnaného poměru obsahu sacharidů a kyselin. Cider je pak většinou označen jako polosuchý, tedy demi-sec. [4]

Zimní odrůdy jablek jsou hned po sklizni stále tvrdé, proto se na určitou dobu uskladní, aby dozrály. Obsahují velké množství cukru, proto je cider, vyrobený z těchto odrůd, kategorizovaný jako doux čili sladký. [4]

1.2 Třídění

Před dalším zpracováním je nutné jablka důkladně protřídit. Jablka, která jsou nahnilá, plesnivá, zčernalá se musí vyhodit. Dokonce i nahnědlé kusy se vyhazují, a to z důvodu možné přítomnosti patulinu. Patulin je toxin mikroskopických hub, především pak *Penicillium patulinum* a *Penicillium expansum*. Tento mykotoxin je však nebezpečný spíše při přímé konzumaci nebo u čerstvě vylisované šťávy. Během kvašení cideru se působením kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* patulin rozkládá na např. ascadiol, u kterého doposud nebyla toxicita zcela prokázána. [4,7]

1.3 Praní

Praní se využívá z hygienických i zpracovatelských důvodů. Při praní se odstraňují makroskopické nečistoty, jako kusy listí, hlína nebo tráva, ale i chemická rezidua po použití pesticidů. Těch se zbavuje oplachem ve vodě o teplotě nad 30 °C a následném oplachu ve vodě pitné. Praním snížíme také přítomnost nežádoucích mikroorganismů, které by mohly ovlivnit proces fermentace. Využívají se bubnové nebo kartáčové pračky a sprchy. Sprchový oplach natlakovanou vodou by měl trvat minimálně 15 sekund. [4,9]

1.4 Drcení

Během drcení dochází k narušení buněk jablka, díky čemuž dojde k uvolnění jablečné šťávy a zefektivnění procesu lisování. Jablka by se neměla drtit na příliš malé kusy, protože ty způsobují malou výlisnost, kdy se z drti stane homogenní hmota a šťáva se uvolňuje obtížně. Díky jemné směsi se do šťávy dostává i velké množství kalů.

V určitých případech může jemná drť ucpat odtok u lisu. Proto se jablka drtí na hrubější části. Výsledkem je jablečná drť, která se jinak označuje i jako tzv. matolina. K drcení se využívá mimo jiné tzv. pulpmaster, kdy se jedná o uzavřenou nádobu, do které víkem prochází tyč s upevněnými noži na jejím konci. K pohonu se využívá například vrtačka. Na obr. 1 je zjednodušený nákres tohoto přístroje. [4,5,8,9,10]

obrázek 1 Pulpmaster, upraveno podle [4]

Dřeň nadrceného ovoce za přísunu vzduchu rychle hnědne. Proces hnědnutí způsobuje enzymatická oxidace fenolických látek vyskytujících se v jablcích. Fenolické látky se nacházejí ve vakuolách a enzym polyfenoloxidasa (PPO), který tyto látky oxiduje, je v plastidech. Drcení, následná macerace a lisování způsobují, že se buněčné struktury molekul poškodí, fenolické látky a PPO se dostanou do kontaktu a za přítomnosti kyslíku se spouští proces hnědnutí. Některé polyfenolické látky jsou oxidovány na chinony díky přítomné PPO. Chinony jsou relativně reaktivní molekuly, které se účastní reakcí zodpovědných za hnědé zbarvení drti a šťávy. [3,10]

1.5 Loužení

Loužení je proces namáčení nadrcených jablek ve šťávě, která se během drcení uvolnila. Další z možností je máčení ve vodě. Tento postup však není povolen pro cidery s označením AOC, *Appellation d'Origine Contrôlée*, kdy se jedná o chráněné označení původu zboží používané ve Francii. Všechna drť musí být ponořena ve šťávě. Dlouhodobě uskladněné ovoce má vyšší obsah hydrofilního pektinu a je vhodné ho pro další zpracování uvolnit. Dále využívají ovocné buňky tkáňový kyslík a dochází k jejich odumírání. Pektin se zčásti rozkládá. [4,13,16]

Délka loužení závisí na hrubosti částic drti. Pokud jsou částice malé, maceruje se jen několik hodin. Delší loužení je vyžadováno u hrubších částic a také, pokud se ve výchozí směsi nachází více jablek kyselé chuti. Drť je ponechána v plastových nebo dřevěných nádobách. Je nezbytné nádoby překrýt, aby nedocházelo k přísunu kyslíku nebo další fyzikální, chemické nebo biologické kontaminaci. Další důležitý faktor, který se musí ohlídat, je teplota, při které loužení probíhá. Při teplotě 18–20 °C je doba máčení 6–12 hodin. Vysoká teplota zkrátí tuto dobu přibližně na 2 hodiny. Pokud se při vyšší teplotě nesníží doba loužení, ovoce může začít kvasit, dojde k pomnožení octových baterií z důvodu přítomnosti kyslíku a šťáva dostane octovou chuť. [4,9]

Loužení s sebou nese mnoho výhod, jako jedna z nich je vyšší zisk jablečné šťávy během procesu lisování. Dále je důležité zmínit zisk lepší barvy a v neposlední řadě se lépe čistí díky uvolněným pektinovým látkám. Loužení také napomáhá zlepšit výslednou chuť, kdy zjemní hořkost a trpkost šťávy. [4,5]

1.6 Lisování

Určitý podíl šťávy je získaný při drcení, ale velké množství setrvá v buňkách a je získáno při procesu lisování. K oddělení jablečné šťávy z nadrceného ovoce dochází za využití tlakových sil pomocí lisů. Po vylisování zbyde v lisu pevná část, která se nazývá pokrutiny či výlisky. [10]

Při lisování ovocné drti by měly být dodrženy určité zásady:

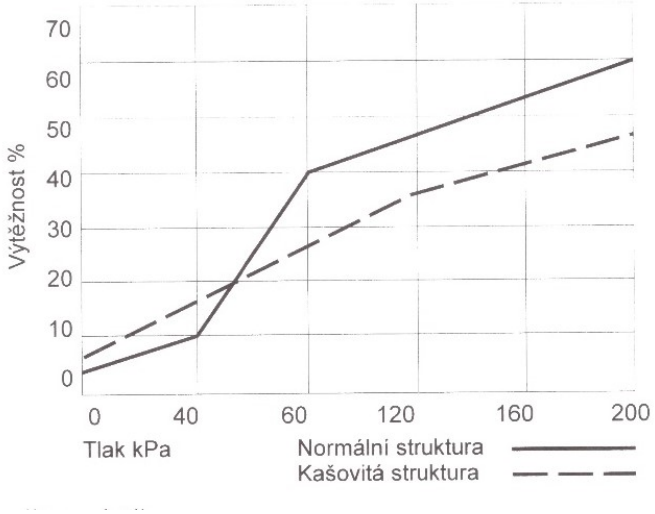
- lisování probíhá za minimálního přístupu kyslíku kvůli oxidativním procesům, které by mohly znehodnotit cider
- šťáva po lisování musí obsahovat co nejméně kalů
- rychlost odtoku závisí na rychlosti lisování
- nelisovat příliš dlouho
- tlak lisu postupně navyšovat a lisovat přerušovaně. [10]

Lisování jablečné šťávy musí probíhat pomaleji ve srovnání se získáváním hroznové šťávy, využívané k výrobě vína. Množství získané šťávy závisí na faktorech, jako je šťavnatost ovoce i použitý druh lisu. [3,4,10]

Je vhodné vylisovanou šťávu rovnou filtrovat za využití sítek nebo sítek s plátnem, na která se zachytí veškeré nečistoty jako zbytky jadérek, dužiny a kaly, které mohou být zdrojem velkého množství mikroorganismů. Lisování se může provádět vícekrát,

nicméně získaný produkt je méně kvalitní, a není vhodné jej přidávat ke šťávě z prvního lisování. Výlisky se pak využijí jako například hnojivo, surovina do kompostu, krmivo pro zvířata, nebo k výrobě pektinu. [4,10,11,12,13]

Údaj, díky kterému zjistíme efektivnost lisování, se nazývá výlisnost. Hodnota se uvádí v procentech a jedná se o množství získané šťávy celkové hmotnosti výchozí suroviny. Výlisnost u jablek se pohybuje u ručního lisu mezi 45–50 % z prvního lisování. Pokud se provádí lisování opakovaně, zisk můžeme zvýšit až na 65 %. U hydraulického lisu se výlisnost pohybuje až kolem 80 %. V kapitole 1.4 bylo zmíněno, že výlisnost závisí i na struktuře jablečné drti. Na obr. 2 je graficky znázorněna výtěžnost moštu z nadrcených jablek v závislosti na tlaku při lisování. Z grafu vyplývá, že objem vylisované šťávy závisí i na struktuře drti jablek. Jestliže je drť příliš jemná až kašovitá je výlisnost se zvyšujícím se tlakem menší oproti drti hrubější. [4,10,12]



obrázek 2 Výtěžnost moštu z drtě, upraveno podle [10]

1.7 Předfermentační úprava

Před samotným kvašením se jablečný mošt vyčistí od nečistot díky procesu samočištění (keeving). Dále je měřena hustota ke zjištění cukernatosti moštu. Síření se využívá z důvodu inhibice růstu nežádoucí mikroflóry. [11]

1.7.1 Měření hustoty

Kvalita zpracování jablek se projeví v získaném moštu. Ke zjištění této kvality se uplatňuje měření hustoty (viz Tabulka 1). Naměřená hodnota hustoty udává obsah sušiny, jejíž součástí jsou i sacharidy. [4,10]

Tabulka 1 Závislost mezi kvalitou jablek a naměřenou hustotou, upraveno dle [4]

Hustota [kg·dm^{-3}]	Kvalita
1,047–1,056	Podprůměrná
1,057–1,065	Průměrná
1,066–1,070	Dobrá
> 1,070	Výtečná až excelentní

Cukernatost, což je obsah cukrů v moštu, se měří hustoměrem, cukroměrem nebo se využívá refraktometrické stanovení. Obsah cukru může být ukazatelem výsledného obsahu alkoholu v cideru. Využívá se velké množství pomůcek, kdy nejznámější pomůcky pro zjišťování hustoty jsou:

- **Normalizovaný moštoměr (°NM**) vyjadřuje počet kilogramů cukru ve 100 litrech moštu.
- **Klosterneuburský moštoměr (°Kl),** který udává váhové procento cukru v moštu bez ohledu na obsah necukerných látek. Správnost měření tímto moštoměrem je závislá na teplotě. Moštoměr je kalibrován na teplotu 17,5 °C, pokud je tedy teplota moštu odlišná, hodnota na moštoměru je nepřesná.
- **Cejchovaný hustoměr** udává množství cukrů v jednom litru moštu (kg·dm^{-3}, kg·l^{-1}).
- **Cejchovaný refraktometr** měří index lomu kapaliny v jednotkách °Bx [4,10]

1.7.2 Síření

Nezbytné je také zneškodnění nežádoucích mikroorganismů, které se mohou vyskytovat jak v moštu, tak v nádobách využívaných k fermentaci. Z tohoto důvodu se přidává malé množství oxidu siřičitého (SO_2), který má konzervační a redukční účinky. Bakterie a jiné nežádoucí mikroorganismy v jeho přítomnosti nepřežívají, oproti tomu kvasinky (např. *Saccharomyces cerevisiae*, nebo *Saccharomyces uvarum*) jeho přítomnost snášejí. Množství přidaného SO_2 závisí na pH moštu. Množství přidaného SO2 se snižuje s klesající hodnotou pH jablečného moštu. Nízká hodnota pH s sebou nese nízké riziko kontaminace nežádoucí mikroflórou. [4,15]

1.7.3 Samočištění „keeving“

Jablečný mošt by se měl před začátkem fermentace vyčistit. Nečistoty, přítomné v jablečné šťávě, padají buď dolů (např. kousky dužiny) nebo stoupají vzhůru (např.

kousky semen). Aby byla zachována dobrá kvalita výsledného cideru je nutné dále pracovat s čistou tekutinou. Samočištění neboli „keeving“ zajistí dlouhou pomalou fermentaci, sladkou chuť, cider není příliš pěnivý a po lahvování nedochází ke zpětnému kvašení. [3,4,14]

Principem samočištění je odstranění nutrientů z moštu za využití navázání na pektinové složky. Jablka obsahují velké množství bílkovin a dalších dusíkatých látek, které jsou zdrojem výživy kvasinek. Aby probíhala fermentace pomalu, je nutné přebytečné množství těchto látek odstranit. Pektin se pomalu sráží a vytváří gel, ve kterém jsou přítomné rostoucí kvasinky, kaly, nečistoty a také až 40 % dusíkatých látek. Díky produkci oxidu uhličitého je tato sraženina vynášena k horní části nádrže. Tam vytváří hnědou pěnu, jinak nazývanou „chapeu brun“. [3,4,14]

V minulosti se využívalo spontánní gelovatění pektinu v přítomnosti vápníku. Proces trval přibližně pět dní. V dnešní době se využívá přídavku PME (pektin methylesterasa), která zaručí dostatečnou demethylaci pektinových látek, a dále přídavek rozpustného $CaCl_2$ způsobí lepší kontrolu nad procesem samočištění. Dochází zde tedy k denaturaci a vysrážení bílkovin a částečné hydrolýze pektinu. [3,4,14]

Šťávy se ponechají sedimentovat přibližně 12 hodin v naprostém klidu. Je nutné udržovat nízkou teplotu v místnosti, nejlépe 6 až 12 °C, a maximálně 20 °C. Hlavním důvodem je zabránění nakvášení a octovatění moštu. Šťáva z jablek, která nejsou dostatečně vyzrálá, a tudíž jsou kyselejší, sedimentuje rychleji než ta z jablka v plné zralosti. I proto by měla být směs tvořena jablky ve stejném stupni zralosti. [4,9]

1.8 Kvašení

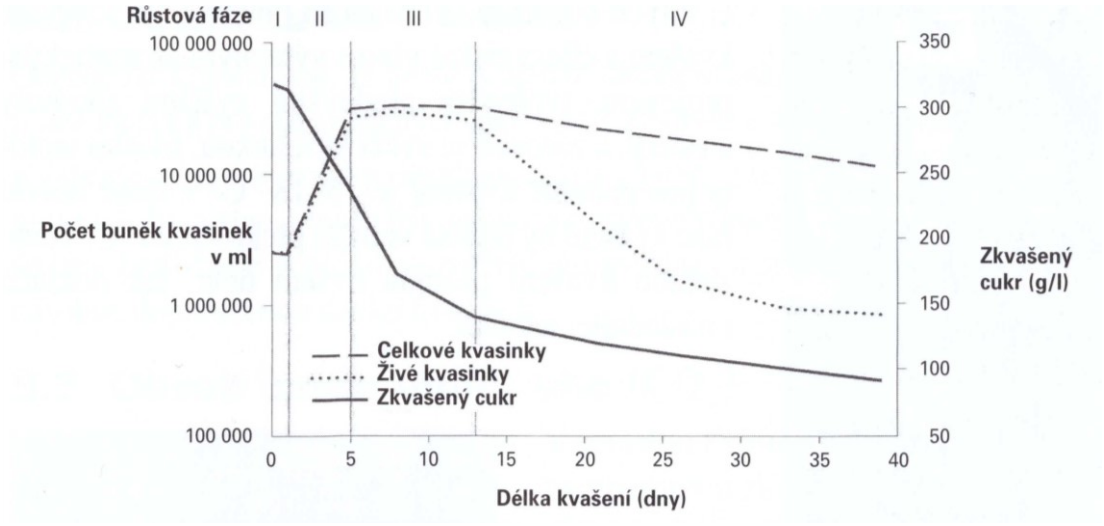
Pro výrobu jakéhokoli alkoholického nápoje je potřebná určitá mikroflóra. Při výrobě cideru se využívá nejčastěji bakteriální kmen *Saccharomycces*. U spontánní fermentace, využívané ve Španělsku, Francii a Velké Británii, se uplatňují bakterie *Kloeckera apiculata* a *Hanseniaspora valbiensis*. Množství alkoholu vzniklého fermentací závisí na množství zkvasitelných cukrů, které se vyskytují v moštu, stejně jako na teplotě, za které fermentace probíhá. V příloze I je uvedena přepočítací tabulka, ze které se podle hustoty moštu dá zjistit množství sacharidů a vypočítat

teoretický obsah alkoholu, jestliže dojde k prokvašení všech přítomných sacharidů. [4,11]

První kvašení probíhá při nízké teplotě (max. 12 °C) přibližně 3–8 dní. Během této doby již začnou kvasinky přeměňovat sacharidy na alkohol a CO_2. Jakmile se na hladině objeví bílá pěna, proběhne první stáčení, které probíhá bez přístupu vzduchu. Tekutina se vyčistí od nečistot (viz kapitola 1.7). Čirá tekutina získaná během stáčení obsahuje dostatek kvasinek i živin pro další, nicméně pomalejší a lépe kontrolovatelné kvašení. [4,5,11]

Následuje hlavní kvašení, během kterého se opět nastartuje aktivita kvasinek. Hlavní kvašení trvá i několik měsíců a mělo by probíhat při nízkých teplotách. Nádoby, ve kterých fermentace probíhá, by měly být opatřeny kvasnou zátkou, kvůli odvodu CO_2. Součástí fermentace je i jablečno-mléčné (malolaktické) kvašení. [3,4,11]

V poslední fázi se již netvoří CO_2 z důvodu neprobíhajícího alkoholového kvašení a cider zraje. Probíhají chemické a biochemické reakce, díky kterým cider získává svou typickou chuť a aroma. Bakterie mléčného kvašení (*Oenococcus, Lactobacillus, Pediococcus*) konvertují kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou a tím zjemňují výslednou chuť cideru. Během fermentace a zrání jsou přítomné netěkavé glykosidy hydrolyzovány za vzniku volných alkoholů, které pak mohou být zdrojem specifické chuti a aroma nebo mohou dále reagovat za vzniku dalších sloučenin. Jedná se například o 2-fenylketon, zodpovědný za medové tóny v chuti, nebo pro jablečný mošt specifický oktan-1,3-diol, který reaguje s acetaldehydem a vytváří dioxolaminy. Tyto sloučeniny významně přispívají k chuti ciderů. Přítomné nečistoty se usazují na dně nádoby a je provedeno druhé stáčení, čímž získáme čistý cider. Na obrázku 3 lze vidět měnící se počet kvasinek během procesu fermentace, stejně tak snižující se obsah zkvasitelných cukrů v závislosti na délce kvašení. Aktivita kvasinek je nejvyšší přibližně 5. den od zahájení fermentace. Následuje fáze stacionární do asi 13. dne, následně začíná fáze odumírání z důsledku vyčerpání živného média, kterým jsou zkvasitelné cukry. [4,5,11]



obrázek 3 Průběh fermentace, upraveno dle [18]

1.9 Lahvování

Cider se stáčí do lahví, jakmile ustane aktivita kvasinek a neprobíhá kvašení. Cider by měl mít konstantní hustotu, což značí konec kvašení. Pokud by se cider lahvoval dříve, mohlo by dojít ke tvorbě usazeniny a v lahvi by vznikl velký tlak. Lahvuje se převážně do skleněných lahví, neboť nejlépe odolávají tlaku. Stejně tak musejí odolávat tlaku použité uzávěry. Nejčastěji se využívá korunkový uzávěr, použít se dají i uzávěry s kovovým košíčkem nebo, v zahraničí oblíbený, mechanický uzávěr. Cider se může tepelně ošetřit (pasterovat) teplotou 60–65 °C po dobu 20–60 minut v tunelovém pastéru, čímž dojde k inaktivaci mikroorganismů. [3,4,11]

2 PROCES FERMENTACE PŘI VÝROBĚ CIDERŮ

Alkoholické nápoje jsou známy již staletí. Hrály významnou roli v kulturním i duchovním životě. V Evropě se nápoje vyráběly a vyrábí z ovocných šťáv, kdežto v Asii převažuje jako výchozí surovina obilnina. Alkoholové kvašení, je základní a nejdůležitější biochemický proces během výroby alkoholických nápojů včetně cideru. [17,18]

2.1 Alkoholové kvašení

2.1.1 Charakteristika

Na začátku 19. století Guy-Lussac zavedl rovnici fermentace, když z jednoho molu glukosy vznikají dva moly ethanolu a CO_2. V roce 1863 Louis Pasteur objevil princip ethanolového kvašení, kdy zjistil, že probíhá díky aktivitě mikroorganismů. Během alkoholového kvašení je pomocí kvasinek, které jsou schopny přežívat v přítomnosti alkoholu, rozkládána molekula zkvasitelné cukru (glukosy) na ethanol a CO_2. [17,19,20]

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + ATP + teplo$$

Nejdříve probíhá fáze aerobiózy, kdy se spotřebovává okolní kyslík. Dochází k degradaci sacharidu (jednoho molu glukosy nebo fruktosy) a vzniká energie ve formě ATP (adenosintrifosfát), která je potřebná pro růst kvasinek. Z degradovaných molekul sacharidu se během této fáze nevytváří alkohol. Reakce probíhá podle následující rovnice [3,18,19]:

$$C_6H_{12}O_6 + \ O_2 \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O + 38\ ATP$$

Přítomný kyslík se postupně spotřebovává a snižuje se jeho koncentrace ve fermentační nádobě. Stává se limitním faktorem pro růst, a proto kvasinky přeměňují svůj metabolismus na anaerobní metabolismus, kterým je v tomto případě alkoholové kvašení. Za těchto podmínek má degradace jednoho molu sacharidu za následek tvorbu dvou molů ethanolu, CO_2 i ATP, což je znázorněno chemickou rovnicí [3]:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP$$

Alkoholové kvašení je anaerobní proces. Pro kvasinky je však nevýhodný, protože se tvoří výrazně méně molekul energie. V závislosti na objemu kvasné nádoby, teplotě

během kvašení i na použitém kmenu kvasinek se odvíjí výsledný obsah těchto látek ve výrobku. Součástí kvašení je i vznik mnoha dalších sloučenin. Jedná se o primární a sekundární produkty kvašení. Mezi primární vedlejší produkty kvašení se řadí glycerol, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina jantarová nebo kyselina citronová. Sekundární vedlejší produkty kvašení mohou být aceton, diacetyl, vyšší alkoholy, estery, aldehydy, ketony a aromatické látky. [3,18]

2.1.2 Podmínky pro průběh alkoholického kvašení

Průběh fermentace je ovlivněn mnoha faktory, mezi které patří teplota, obsah zkvasitelných cukrů, čirost moštu, koncentrace CO_2, dusíku, oxidu siřičitého i alkoholu. [18]

Teplota

Teplota při kvašení ovlivňuje nejen její průběh, ale i výsledný obsah alkoholu a jiné organoleptické vlastnosti. Fermentace výrazně zpomaluje, pokud je teplota vyšší jak 35 °C a nižší než 10 °C. [3,18]

Hodnota pH

pH moštu také hraje roli při fermentaci. Mělo by se pohybovat v rozmezí 2,8–3,8 pro správný průběh fermentace. [3,15]

Obsah zkvasitelných cukrů

Mošty s nižším obsahem zkvasitelných cukru kvasí lépe. Kvašení moštu s vyšším obsahem cukru lze podpořit přídavkem vyššího množství kvasinek, nebo přidáním doplňkové výživy pro kvasinky. [18]

Čirost moštu

Odkalený mošt je zbaven nežádoucí mikroflóry (divoké kvasinky, bakterie, aj.), které se běžně vyskytují na povrchu jablek. Z čirých moštů vznikají cidery s vyšším obsahem alkoholu a CO_2. Z toho důvodu musí být přidáno i více SO_2 v průběhu fermentace. [18]

Koncentrace CO_2

Při nedokonalém odvodu CO_2, který vzniká při fermentaci, může docházet k zastavení fermentace. CO_2 reaguje s vodou a vytváří kyselinu uhličitou (H_2CO_3), která

způsobuje problémy během kvašení. Je proto nutné vznikající CO_2 odvádět např. skrz kvasící zátky, díky kterým není mošt náchylný k oxidaci. [18]

Koncentrace asimilovaného dusíku

Obsah dusíkatých látek hraje významnou roli během fermentace, neboť jsou zdrojem živin pro kvasinky. Jejich nedostatek výrazně zpomaluje kvašení. Zdrojem dusíku jsou vitaminy, amonné ionty nebo aminokyseliny, které mohou být i zdrojem síry. [3,11,18]

Koncentrace SO_2

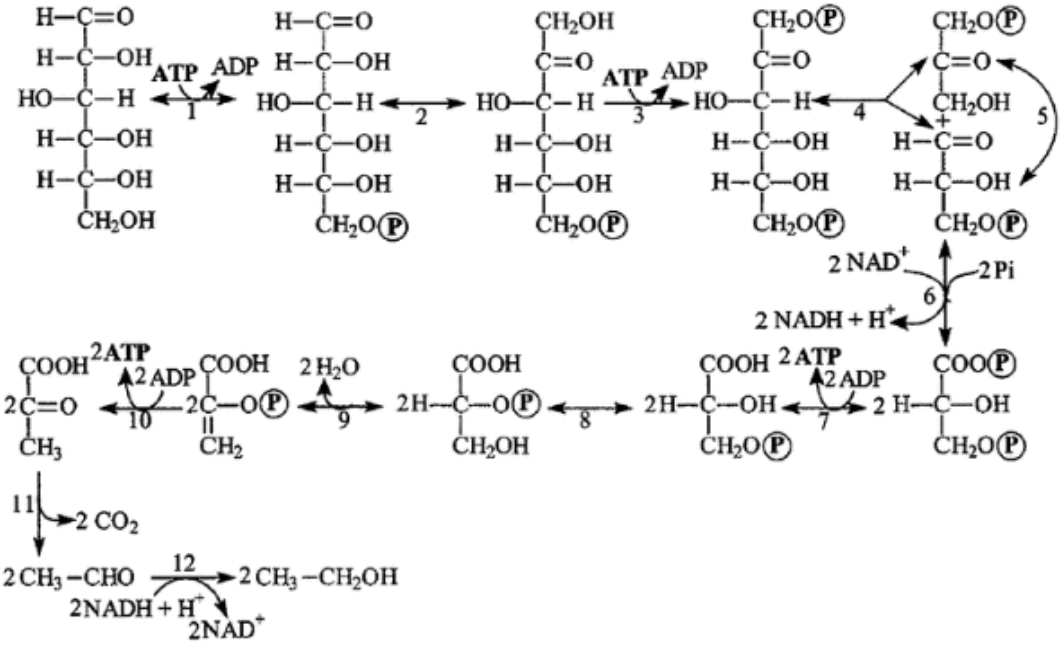
Inhibiční účinek SO_2 je při koncentraci vyšší než 50 $mg \cdot l^{-1}$. Při vyšších koncentracích může zpomalovat aktivitu kvasinek. [3,18]

Koncentrace ethanolu

Se stoupajícím obsahem alkoholu v moštu se zpomaluje aktivita kvasinek. Divoké kvasinky uplatněné při spontánním kvašením odumírají již při 4 % obj. alkoholu. Kvasinky rodu *Saccharomycces cerevisiae* přežívají i při 13 % obj. alkoholu. [3,18]

2.1.3 Glykolýza (Embden-Meyerhof-Parnasova dráha)

Přeměna glukosy na ethanol probíhá pomocí glykolysy neboli Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy. Glukosa je sledem reakcí přeměněna na pyruvát, ATP a redukovanou formu NADH (nikotinamidadenindinukleotid). Pyruvát je derkarboxylován na acetaldehyd a nádledně redukován na výsledný produkt – ethanol. EMP dráha probíhá podle schématu vyobrazeném na obrázku 3. [11,21]



obrázek 4 Schéma EMP dráhy, upraveno dle [21] *

*Vysvětlivky k obrázku 3 – enzymy:

1. hexokinasa
2. fosfoglukoisomerasa
3. fosfofruktokinasa
4. fruktosa-1,6–bisfosfátaldolasa
5. triosafosfátisomerasa
6. glyceraldehyd–3–fosfátdehydrogenasa
7. 3–fosfoglycerátkinasa
8. fosfoglycerátmutasa
9. enolasa
10. pyruvátkinasa
11. pyruvátdekarboxylasa
12. alkoholdehydrogenasa

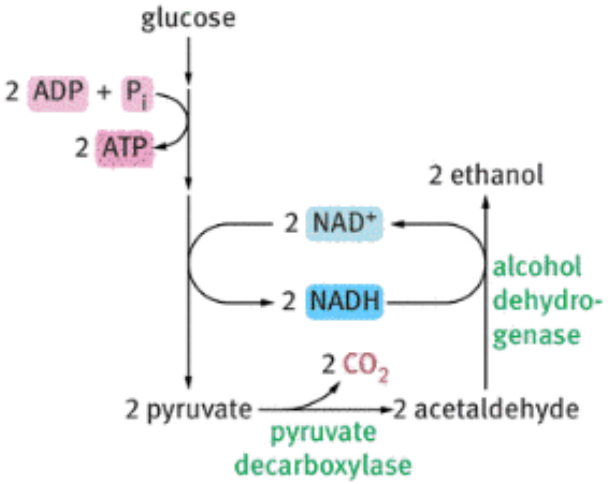
Vznik pyruvátu

Proces glykolysy je oxidativní proces. Glykolysa je proces o deseti krocích a každý z nich je katalyzován jiným ensymem. Molekula glukosy se během procesu rozpadá a vzniká energie ve formě ATP i NADH. Prvním krokem v glykolyse vyžaduje vstup energie ve formě ATP a slouží k isomeraci molekuly glukosy. Kvasinky produkují tři enzymy potřebné pro fosforylaci glukosy. Glukosa je díky nim převedena z glukosa-6-fosfátu přes izomeraci molekuly na fruktosa-6-fosfát až na výslednou molekulu fruktosa-1,6-bisfosfát. Aldolasa tuto molekulu štěpí na dvě různé triosy – dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Pomocí isomerasy nebo dehydrogenasy vzniká 1,3-bisfosfoglycerát. V další fázi dochází k extrakci energie prostřednictvím fosforylace ve dvou reakcích. První z reakcí je přeměna 1,3-bisfosfoglycerátu pomocí fosfoglycerátkinasy na 3-fosfoglycerát. Druhou z reakcí, při které se energie uvolňuje, je vznik pyruvátu z molekuly fosfoenolpyruvátu pomocí

pyruvátkinasy. Všechny enzymy uplatňující se při glykolyse se vyskytují v cytoplasmě kvasinek. [11,21,22]

Vznik ethanolu

Pyruvát vzniklý v oxidativní fázi je dekarboxylován pomocí pyruvátdekarboxylasy a vzniká acetaldehyd a uvolňuje se CO_2. Dalším krokem je přeměna na ethanol díky alkoholdehydrogenase. Vzniklé NADH působí jako redukční činidlo, kdy redukuje aceltaldehyd, akceptor elektronů, na koncový ethanol. Proces je důležitý k zachování redoxní rovnováhy v buňce. Vznik je znázorněn na obrázku 4. [11,22]



obrázek 5 Schéma vzniku ethanolu, upraveno dle [22]

2.2 Malolaktická fermentace

2.2.1 Charakteristika

Jablečno-mléčná, malolaktická, fermentace (JMF) je ensymatický proces přeměny kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou a CO_2 za využití bakterií mléčného kvašení. Podle definice se však nejedná o fermentaci, ale spíše o dekarboxylaci, která je katalyzována rozpustnými dekarboxylasami. Jedná se o proces anaerobní, je náročný na kontrolu a vede ke zlepšení chuťových vlastností cideru. Kyselina jablečná není příliš příjemná v chuti, kdežto kyselina mléčná je jemnější. Během JMF se vytváří diacetyl (2,3-butandiol), což je těkavá senzoricky aktivní sloučenina zodpovědná např. za máselné tóny typické pro JMF. [3,11,18,22]

JMF začíná přibližně 2–3 týdny po skončení alkoholového kvašení a trvá až 4 týdny. JMF může probíhat jak spontánně, tak řízeně. **Spontánní** fermentace může však mít za následek vznik negativních senzorických látek (těkavé kyseliny, sirnaté látky nebo nežádoucí mléčné aroma). Rozvoj JMF je urychlen kontaktem s kvasničnými kaly, vyšší teplotou kolem 22 °C a také nízkou koncentrací SO_2. Aby nedocházelo k rozvoji spontánní JMF je nutné hlídat obsah SO_2 ve fermentačních nádobách. **Řízená** JMF umožnuje kontrolu nad průběhem a tedy i vliv na vzniku požadovaných senzorických látek. [18,23]

Mléčné bakterie mohou být **homofermentativní** a **heterofermentativní**. Mezi homofermentativní mléčné bakterie se řadí např. *Pediococcus*, ty přeměňují glukosu především na kyselinu mléčnou. Pro JMF se využívají heterofermentativní mléčné bakterie – nejčastěji *Oenococcus oeni*. Kromě kyseliny mléčné produkují heterofermentativní mléčné bakterie i kyselinu octovou, ethanol a CO_2 . Pro úspěšný průběh JMF je důležité vhodně zkombinovat kvasinky a mléčné bakterie. [18,23,24]

2.2.2 Podmíky pro průběh jablečno-mléčné fermentace

Úroveň inokulace

Je potřebné připravit inokulum o určitém množství mléčných bakterií, aby bylo docíleno přesného začátku JMF a také potřebné doby. Při nižším počtu bakterií se prodlužuje jejich adaptace a dochází k nadbytečné produkci diacetylu, který může negativně ovlivnit chuť a aroma cideru. [18]

pH

Bakterie *Oenococcus oeni* jsou náchylné na hodnoty pH. Při nižším pH se jejich růst zpomaluje a tím i průběh JMF. Nejvýhodnější je mít pH moštu ≈ 3,4. Při vyšším pH se mohou uplatňovat bakterie rodu *Pediococcus* nebo *Lactobacillus* a dochází k přeměně kyseliny mléčné. Výsledkem je pak vznik nežádoucích látek a kvalita produktu klesá. [3,18]

Koncentrace SO_2

SO_2 je pro bakterie mléčného kvašení toxický. Měl by se přidávat až ve fázi exponenciálního růstu těchto bakterií. [3,18]

Živiny

Bakterie *Oenococcus oeni* jsou na živiny velmi náročné. Potřebují zdroj uhlíku (cukry), dusík (ve formě aminokyselin a peptidů), vitaminy (především ze skupiny B) a minerály (mangan, hořčík, draslík i sodík). Živiny jsou důležité i pro kvasinky a je proto nutné vhodně zvolit danou výživu. [18]

3 PODMÍNKY KULTIVACE MIKROORGANISMŮ VYUŽÍVANÝCH PŘI VÝROBĚ CIDERŮ

Při výrobě cideru se využívá spontánní fermentace již přítomnými kvasinkami, nebo řízená fermentace přidáním komerčně vyráběných kvasinek. Nejčastěji se využívají kvasinky rodu *Saccharomyces*. Jejich název je odvozen z latinského *Saccharo* (cukr) a *myces* (houba), tedy ze schopnosti zkvašovat sacharidy. [5,11,25,26]

3.1 Kvasinky

Jedná se o jednobuněčné eukaryotické organismy. Mají heterotrofní způsob výživy, kdy pro svůj metabolismus využívají uhlík z organických sloučenin. Řadí se mezi houby (*Fungi*). Nejvýznamnějšími kvasinkami, využívanými při výrobě ciderů, je *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces bayanus.* Kvasinky mají vysokou odolnost vůči SO_2, který se přidává do cideru pro zabránění mikrobiální kontaminace. Další vlastností kvasinek je tolerance k alkoholu, kdy rostou v prostředí obsahující 8–12 % ethanolu. Některé druhy přežívají i v prostředí s obsahem alkoholu kolem 17 %. [5,25,27]

Velikost buňky kvasinek se pohybuje okolo 3–15 μm a je tedy větší než bakteriální buňka. Tvar buňky je různý, avšak nejčastěji je pozorovatelný okrouhlý nebo vejčitý. [25,29]

Kvasinky se rozmnožují vegetativně pučením nebo přímým dělením. U většiny kvasinek probíhá rozmnožování **pučením**. Na mateřské buňce vytváří se pupen, který postupně roste. V mateřské buňce probíhá dělení organel a část se přesouvá do vznikajícího pupenu. Jakmile dojde k oddělení pupenu, lze na obou buňkách pozorovat vzniklou jizvu. [25,30]

3.2 Živiny

Zdroj uhlíku

Zdrojem uhlíku a energie jsou v případě kvasinek organické sloučeniny. Kvasinky jako zdroj uhlíku využívají hlavně monosacharidy (např. glukosu, fruktosu), disacharidy (např. sacharosu) a oligosacharidy (např. maltoriosu). [31]

Zdroj dusíku

Jako zdroj dusíku využívají kvasinky primární aminokyseliny a amonné ionty, označované jako „asimilovatelný dusík“. Amonné ionty kvasinky jako zdroj dusíku upřednostňují. Aminokyseliny slouží jako zdroj dusíku a síry. Při výrobě ciderů se využívá hydrogenfosforečnan amonný ve formě krystalků, který se přidává v průběhu fermentace. Jestliže je mošt s vyšší cukernatostí, je nutné zvýšit přísun asimilovatelného dusíku. Stejně tak vyšší teploty během fermentace zvyšují spotřebu dusíkatých látek během fermentace. Při nedostatku dusíku je zvýšené riziko tvorby sirovodíku. [5,18,31]

Anorganické soli

Prvky solí se dělí podle potřebného množství na makroelementy (Mg, K, Ca, P, S, Cl), mikroelementy (Co, B, Cd, Mo, Cu, Va, Ni, Cr, I) a stopové prvky (Zn, Fe a Mn). Zinek positivně ovlivňuje průběh hlavního kvašení, avšak jeho nedostatek kvašení zpomaluje. Sirné sloučeniny jsou zdrojem pro tvorbu sirných aminokyselin. Dále se také podílejí na tvorbě látek (sulfanu, aj.), které ovlivňují výsledné organoleptické vlastnosti produktu kvašení. [30]

Vitaminy a enzymy

Kvasinky pro svůj růst vyžadují přítomnost vitaminů skupiny B. Mezi nejdůležitější vitaminy patří thiamin, biotin a kyselina pantothenová. Thiamin je důležitý pro tvorbu biomasy a má positivní vliv na celkový průběh fermentace. Biotin napomáhá tvorbě nových kvasinek, řídí metabolismus sacharidů, dusíku i mastných kyselin. Kyselina pantothenová a pyridoxin zajišťují syntesu aminokyselin, které obsahují síru. Pokud je množství těchto vitaminů nedostatečné, dochází k tvorbě nežádoucího sirovodíku. Další potřebné látky jsou kyselina nikotinová nebo *myo*-inositol. [5,18,30,31]

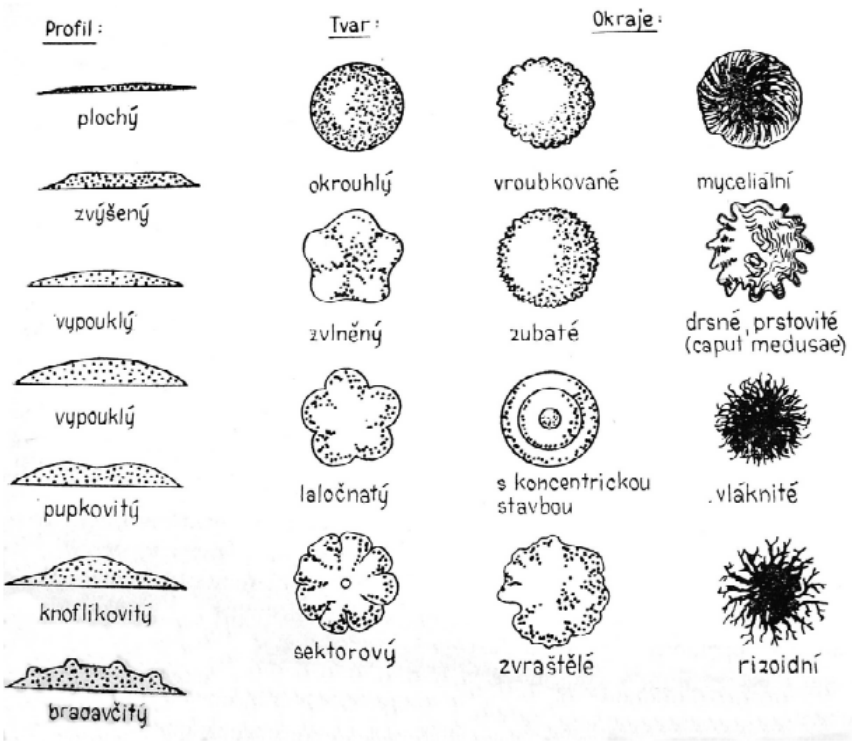
3.3 Kultivace

Pro správný růst kvasinek je potřebná přítomnost kyslíku, živin i vhodného prostředí. Kvasinky řadíme mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, což značí, že kyslík mohou využívat oxidačním i fermentačním způsobem. Během kultivace v anaerobním prostředí vyžadují alespoň stopová množství kyslíku. [25,30]

Kvasinky jsou mezofilní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy mohou růst při teplotách 0–48 °C, přičemž optimální teplota kvasinek je 30 °C. Při této teplotě

probíhají i kultivace v laboratorních podmínkách. Maximální teplota, kdy ještě kvasinky přežívají, se pohybuje kolem 57–59 °C. [25,31]

Kultivace probíhá v tekutém nebo na tuhém médiu. Média tvoří bujón, obohacený o živiny (vitaminy, stopové prvky, aj.). Během statické kultivace kvasinek v tekutém médiu se vytváří zákal, následně dochází ke shlukování kvasinek, následně usazování na dně nádoby. Tímto způsobem dochází k čiření tekutiny. Na pevných půdách se vytváří kolonie, jejichž morfologie je různá v závislosti na kultivovaném rodu a druhu mikroorganismu. Morfologie kolonií je znázorněna na obrázku 6. [25,32]



Obrázek 6 Morfologie kolonií, upraveno podle [25]

3.3.1 Kultivační půdy

Sabouraudův agar

Jedná se o selektivní agar, který potlačuje růst jiných mikroorganismů kromě kvasinek. pH půdy je kyselé (přibližně 5,6), čímž je nevhodný pro bakterie. Skládá se z peptonu a 2 % glukosy nebo maltosy. [32]

GPY agar (Glucose Yeast Peptone Agar)

Půda slouží k izolaci kvasinek. Skládá se z kvasnicového extraktu, peptonu, dextrosy a agaru. pH půdy je neutrální. Kultivace probíhá při 30 °C 72 hodin. [33,34]

ESA

Tato půda je využívána pro stanovení mikroorganismů odolávajících vysoké koncentraci ethanolu. Půda se skládá z kvasnicového extraktu, peptonu, glukosy a 12 % ethanolu. Kultivace probíhá při 30 °C po dobu 48 hodin. [33]

YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar)

YPD agar obsahuje dextrosu, pepton, kvasnicový extrakt a agar. V tekuté formě se využívá k pozorování tolerance SO_2. Agar po kultivaci při 30 °C po dobu 72 hodin sníží svou hustotu, čímž se tolerance k obsahu SO_2 potvrdí. [33,35]

BiGGY agar (Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast Agar)

Schopnost kvasinek produkovat sirovodík (H_2S) se potvrzuje na půdě zvané Biggy. Skládá se z agaru, dextrosy a bismut amonium citrátu, glycinu, kvasnicového extraktu a siřičitanu sodného. Kolonie kvasinek po kultivaci při 30 °C po dobu 24 hodin zčerná, čímž se produkce H_2S potvrdí. [33,36]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo sledovat změny vybraných parametrů vyrobených ciderů během 30 dní fermentace při různých teplotách a popřípadě určit vhodné kultivační podmínky pro výrobu alkoholického nápoje typu cider.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Popis experimentu

Jablečný mošt zakoupený v tržní síti (100 %, FRUTA Bohemia, a.s.) byl zaočkován sušenou kulturou obsahující kvasinky *Saccharomyces bayanus* (SafCider, Fermentis by Lesaffre) [42]:

- selektovány z oblasti Champagne
- pro všechny druhy cideru
- široké teplotní rozmezí 10–30 °C
- ideální teplota 18–24 °C [43]

Zaočkovaný jablečný mošt byl promíchán a rozdělen do reagenčních láhví o objemu 250 ml. Ty byly rovnoměrně rozděleny a umístěny do termostatů nastavených na teploty:

- 15 °C (značení skupiny vzorků = A)
- 25 °C (značení skupiny vzorků = B)

V termostatech probíhala fermentace, jejíž proces byl při obou teplotách sledován po dobu 30 dní.

U obou skupin vzorků (A, B) byly v průběhu fermentace sledovány změny pH, obsahu rozpustné sušiny, skutečného a zdánlivého stupně prokvašení, hustoty a obsahu alkoholu vždy 1., 2., 3., 4., 5., 11. a 30. den fermentace. Vzorky byly před každým měřením zbaveny plynů, zfiltrovány přes laboratorní filtrační papír následně podrobeny daným analýzám.

5.2 Chemická analýza

5.2.1 Měření pH

Aktivní kyselost roztoku neboli pH je dána koncentrací H+ iontů v daném roztoku. Hodnoty pH cideru se pohybují před fermentací kolem hodnot 2,8–3,8. Hodnoty pH se mění v závislosti na obsahu dusíkatých látek, organických kyselin (např. citronová, pyrohroznová, octová, aj.) a obsahu ethanolu v roztoku. [15,30,37,38]

Měření pH probíhalo ve zfiltrovaných vzorcích pomocí digitálního pH metru HI 99161 (Foodcare). Do vzorku byla ponořena měrná elektroda a po ustálení hodnoty na displeji byla hodnota zapsána. Hodnota pH byla měřena vždy 3x u každého vzorku 1., 2., 3., 4., 5., 11. a 30. den fermentace. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány.

5.2.2 Stanovení obsahu rozpustné sušiny

Obsah rozpustné sušiny podle ČSN EN 12143 udává obsah sacharosy ve vodném roztoku v gramech na 100 g. Jednotkou je stupeň Brix (°Bx) a obsah je měřen při teplotě 20 °C. [39,40]

Měření obsahu rozpustné sušiny bylo provedeno pomocí přenosného refraktometru. Před každým měřením byl refraktometr kalibrován destilovanou vodou. Vzorky byly naneseny kapátkem na měřící čočku a naměřená hodnota byla zapsána ve °Bx. Měření probíhalo vždy 3x u každého vzorku ve stejných časových intervalech jako bylo měřeno pH. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány.

5.2.3 Stanovení stupně fermentace, obsahu alkoholu a hustoty

Stupeň zdánlivého a skutečného stupně fermentace, obsahu etanolu a hustoty připravených vzorků ciderů byl měřen pomocí přístroje Anton Paar Density Meter DMA 4500M s Alcolyzer Beer ME module (Anton Paar GmbH, Austria).

Před samotným měřením byla provedena kalibrace přístroje nejdříve pomocí destilované vody a následně připraveným 10% roztokem ethanolu. Kyvety naplněné těmito roztoky byly vloženy do zásobníku a proběhlo kalibrování. Poté byly kyvety naplněny zfiltrovanými vzorky. Měření bylo provedeno ve stejných intervalech jako měření pH a obsahu rozpustné sušiny.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1.1 Výsledky stanovení pH

Hodnoty pH vyrobených ciderů byly měřeny 1., 2., 3., 4., 5., 11. den a 30. den fermentace při teplotách 15 a 25 °C.

Fermentace probíhá správně, jestliže je pH na počátku v rozmezí 2,8–3,8 [15], což bylo u obou skupin připravených ciderů splněno, viz tabulka 2 a 3. Počáteční hodnota pH zakoupeného 100% jablečného moštu před zaočkováním byla 3,52. První den fermentace byl u skupiny vzorků A vidět nepatrně nižší vzrůst hodnoty pH než u skupiny vzorků B, což potvrzuje vyšší aktivitu kvasinek při vyšší kultivační teplotě [18], i když rozdíl mezi zmíněnými hodnotami jednotlivých skupin vzorků nebyl statisticky významný ($p < 0,05$).

Jinak výraznější změny hodnot pH v celém průběhu fermentace byly pozorovány u skupiny vzorků A, vzhledem k nižší aktivitě kvasinek při nižší teplotě kultivace, a tedy pomalejšímu metabolismu. Během prvních třech dní od začátku fermentace byl u vzorků kultivovaných při 15 °C sledován výrazný nárůst hodnoty pH ($p < 0,05$), což znamená, že v připravených vzorcích nejdříve probíhala tzv. fáze aerobiózy, kdy kvasinky utilisují přítomný kyslík a dochází k degradaci sacharidu za vzniku CO_2 a H_2O, kvasinky tak získávají energii ve formě ATP. [3,18,19] Zatímco vzniklý oxid uhličitý, unikal skrz fermentační zátku, naprodukovaná voda zvyšovala pH roztoku. Kyslík byl limitním faktorem pro růst kvasinek, kdy po vyčerpání kyslíku a snížení jeho koncentrace, přítomné kvasinky přeměnily svůj metabolismus na anaerobní, v tomto případě alkoholové kvašení. Při alkoholovém kvašení se ze sacharidu tvoří ethanol, CO_2 a menší množství energie ve formě ATP než u aerobiosy. [3] Přechod kvasinek na anaerobní kvašení byl u skupiny vzorků A patrný 4. den fermentace, kdy došlo k mírnému snížení hodnoty pH. Pátý den fermentace při teplotě 15 °C byl pozorován výrazný pokles hodnoty pH ($p < 0,05$), s největší pravděpodobností způsobený naprodukovanými vedlejšími produkty kvašení, jako např. kyselina octová, mléčná, jantarová, citronová, glycerol, diacetyl aj. [3,18] Vedlejší produkty kvašení vznikají v průběhu fermentace spotřebou dusíkatých látek kvasinkami. Během kvašení jsou dusíkaté látky rozkládány a vznikají H^+ ionty okyselující prostředí. [3,18,19,37,45] Koncentrace H^+ iontů byla 5. den fermentace evidentně vyšší než koncentrace OH^- iontů, tedy obsah vedlejších produktů kvašení byl vyšší než obsah

alkoholu, viz kapitola 6.1.3. Od 11. dne fermentace je u skupiny vzorků A opět pozorován vzrůst pH, což značí vyšší obsah alkoholu než obsah vedlejších produktů kvašení. Ve studii Riekstina-Dolge et al. (2011) byly zkoumány látky vznikající při výrobě ciderů, které snižují aciditu ciderů a zároveň se podílejí na vzniku aroma a chuti. Zvyšující se obsah ethanolu vznikající v průběhu kvašení má pak za následek nárůst pH roztoku. [3,18,19,37,45] Konečná hodnota pH naměřená 30. den fermentace u skupiny vzorků A byla 3,79 ± 0,02.

Z výsledků získaných pro skupinu vzorků B bylo patrné postupně se zvyšující pH, z čehož by se mohlo usuzovat, že aktivita použitých kvasinek je při teplotě 25 °C výraznější. Jako optimální teplota pro růst kvasinek je udávána teplota 30 °C. [25,31] Proto je vyšší aktivita kvasinek pozorována u vzorků kultivovaných při teplotě 25 °C, neboť je tato teplota blíž k optimální teplotě růstu kvasinek než teplota 15 °C. Tedy u skupiny vzorků B docházelo k rychlejší spotřebě kyslíku, rychlejšímu nástupu alkoholového kvašení, a tedy rychlejší produkci ethanolu. Při vyšších teplotách mají kvasinky také vyšší spotřebu dusíkatých látek. [5,18,31] Proto nebyly změny pH v průběhu 30 dní fermentace při teplotě 25 °C tak výrazné jako při teplotě kultivace 15 °C. Navíc u skupiny vzorků B bylo konečné hodnoty pH (3,91 ± 0,02) dosaženo již 11. den fermentace, tato hodnota byla do 30. dne fermentace stabilní. Toto zjištění nasvědčuje tomu, že obsah ethanolu a vedlejších produktů se od 11. dne neměnil.

Tabulka 2 Průměrné hodnoty pH pro skupinu vzorků A

Skupina vzorků A							
Délka fermentace [den]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**11**	**30**
Hodnota pH	3,53 ± 0,02	3,66 ± 0,01	3,97 ± 0,01	3,92 ± 0,03	3,64 ± 0,02	3,69 ± 0,01	3,79 ± 0,02

Tabulka 3 Průměrné hodnoty pH pro skupinu vzorků B

Skupina vzorků B							
Délka fermentace [den]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**11**	**30**
Hodnota pH	3,57 ± 0,01	3,68 ± 0,02	3,82 ± 0,01	3,84 ± 0,01	3,86 ± 0,03	3,91 ± 0,02	3,90 ± 0,01

6.1.2 Výsledky stanovení obsahu rozpustné sušiny

Ve stejných intervalech jako pH byl stanoven u obou skupin připravených ciderů obsah rozpustné sušiny (°Bx). Obsah rozpustné sušiny během fermentace klesá z důvodu přeměny sacharosy na alkohol přítomnými kvasinkami. U obou skupin vzorků lze pozorovat v průběhu 30. dní fermentace snížení obsahu rozpustné sušiny, viz tabulky 4 a 5.

U skupiny vzorků A byl pozorován pomalejší pokles obsahu rozpustné sušiny (°Bx), což zřejmě souvisí s pozvolnější adaptací kvasinek na prostředí, a tudíž i pozvolnější tvorbou alkoholu. Významný pokles obsahu rozpustné sušiny ($p < 0,05$) je u vzorků kultivovaných při 15 °C zaznamenán až 11. a 30. den kultivace, což zřejmě souvisí i se zvýšenou aktivitou již adaptovaných kvasinek a tedy i s množstvím naprodukovaného alkoholu. Hodnota z 12,73 °Bx 1.den klesla během 30 dní fermentace na 3,8 °Bx.

U skupiny vzorků B byl pokles obsahu rozpustné sušiny výraznější v celém průběhu fermentace. K významnému poklesu obsahu rozpustné sušiny došlo již 3. den fermentace ($p < 0,05$), což by mohlo souviset s rychlejší adaptací kvasinek na prostředí a rychlejší tvorbou alkoholu při vyšší kultivační teplotě. [18] Navíc hodnota 3,8 °Bx byla u skupiny vzorků B naměřena již 11. den, na rozdíl od skupiny vzorků A, to potvrzuje vyšší aktivitu kvasinek při vyšší teplotě kultivace. [18] Výsledná hodnota obsahu rozpustné sušiny 30. den fermentace byla 3,56 °Bx, oproti hodnotě 12,23 °Bx 1. den fermentace. Z hodnot pH bylo zřejmé, že se obsah alkoholu a vedlejších metabolitů u skupiny vzorků B neměnil již 11. den fermentace. Z hodnot obsahu rozpustné sušiny mezi 11. a 30. dnem kultivace, to však nebylo tak jednoznačné. To by mohlo znamenat, že obsah alkoholu se již neměnil díky vyčerpání živin (sacharidů) [18], ale přeměna dusíkatých látek na vedlejší produkty zřejmě pokračovala. Dále by pokles hodnot °Bx mohl poukazovat na sedimentaci kvasinek, a tedy vyčeření vzorku.

Tabulka 4 Průměrné hodnoty obsahu rozpustné sušiny pro skupinu vzorků A

Skupina vzorků A							
Délka fermentace [den]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**11**	**30**
Obsah rozpustné sušiny [°Bx]	12,73 ± 0,05	12,23 ± 0,05	11,70 ± 0,22	11,57 ± 0,05	11,50 ± 0,00	7,40 ± 0,05	3,80 ±0,08

Tabulka 5 Průměrné hodnoty obsahu rozpustné sušiny pro skupinu vzorků B

Skupina vzorků B							
Délka fermentace [den]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**11**	**30**
Obsah rozpustné sušiny [°Bx]	12,23 ± 0,12	11,93 ± 0,05	10,17 ± 0,05	8,30 ± 0,00	6,13 ± 0,09	3,80 ± 0,05	3,56 ± 0,05

6.1.3 Výsledky stanovení stupně fermentace, obsahu alkoholu a hustoty

Výsledky všech uvedených měření jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

Obsah alkoholu závisí na teplotě fermentace, hustotě a na obsahu zkvasitelných sacharidů na počátku fermentace. [11] Tuto závislost lze vidět i v příloze I, v tabulce je uveden teoretický obsah alkoholu, kterého lze dosáhnout v cideru na základě obsahu sacharidů v moštu. Danému obsahu sacharidů v moštu je přidělena i hustota. Tedy na základě cukernatosti, či hustoty cideru lze předpokládat jaký obsah alkoholu by se dal ve vyrobeném cideru očekávat při plném prokvašení moštu.

U skupiny vzorků A byl pozorován pomalejší nárůst obsahu alkoholu, což souvisí s nižší aktivitou kvasinek, a tedy pomalejším průběhem fermentace. U skupiny vzorků B byl zjištěn významný vzrůst v obsahu alkoholu ($p < 0,05$) již 3. den fermentace. Navíc 11. den fermentace již byl obsah alkoholu ve vzorku B poměrně stabilní (viz tabulka 7), což značí vyčerpání zkvasitelných sacharidů. Obsah alkoholu dosažený u skupiny vzorků B 11. den fermentace byl u skupiny vzorků A zaznamenán až 30. den fermentace. To opět potvrzuje vyšší aktivitu kvasinek při vyšší teplotě kultivace.

Skutečný stupeň prokvašení (RDF) vyjadřuje, kolik zkvasitelných sacharidů bylo zfermentováno. [44]

U obou skupin vzorků byla výsledná hodnota skutečného stupně prokvašení totožná, a to 86 %. Avšak zmíněná hodnota byla u skupiny vzorků A dosažena 30. den, na rozdíl od skupiny vzorků B, kde byla tato hodnota zaznamenána již 11. den fermentace. Tomu odpovídaly také výsledky měření pH, obsahu rozpustné sušiny a obsahu alkoholu, kde bylo stanoveno, že obsah zkvasitelných cukrů byl u skupiny vzorků A vyčerpán 30. den a u skupiny vzorků B již 11. den fermentace. U skupiny vzorků A byl významný nárůst hodnoty RDF zaznamenán až 11. den fermentace,

avšak u skupiny vzorků B byl tento významný nárůst hodnoty RDF viditelný již 3. den fermentace ($p < 0,05$).

Zdánlivý stupeň prokvašení (ADF) poukazuje na plnost chuti. Nápoje s vyšším ADF jsou obvykle považovány za suché, nejsou příliš bohaté v chuti a obsahují více alkoholu. [44]**.** Obě skupiny vzorků vykazovaly po 30 dnech fermentace přibližně stejnou hodnotu zdánlivého stupně prokvašení 105, 29 (vzorek A) a 105,37 (vzorek B). Tudíž dle výše zmíněného tvrzení [44] nelze říci, který ze dvou připravených ciderů má lepší organoleptické vlastnosti. Proto by bylo vhodné se v následujících studiích zaměřit na senzorické hodnocení vyrobených ciderů.

U skupiny vzorků A byl významný nárůst hodnoty ADF zaznamenán až 11. den fermentace, avšak u skupiny vzorků B byl tento významný nárůst hodnoty ADF viditelný již 3. den fermentace ($p < 0,05$). Z výsledků stanovení obsahu rozpustné sušiny u skupiny vzorků B bylo patrné, že 11. den byl vyčerpán obsah zkvasitelných cukrů, ale že přeměna dusíkatých látek na vedlejší produkty pokračovala, to by se dalo usuzovat i z naměřených hodnot ADF, kdy se hodnota ADF 30. den nepatrně zvýšila, což by mohlo značit nepatrně vyšší obsah vedlejších produktů fermentace.

Jak u hodnot RDF, tak hodnot ADF, byla potvrzena vyšší aktivita kvasinek při teplotě kultivace 25 °C.

Hustota jablečného moštu poukazuje na kvalitu jablečné šťávy. Naměřená hodnota hustoty udává obsah sušiny, jejíž součástí jsou i sacharidy, na obsahu sacharidů pak závisí výsledný obsah alkoholu vyrobeného cideru. [4,10]. Dle Tabulky 1 v kapitole 1.6.2 lze říci [4], že 100% jablečný mošt byl podprůměrné kvality, neboť jeho hustota byla 1,054 $kg \cdot m^{-3}$. Pokles hustoty je způsoben úbytkem sušiny a nárůstem obsahu alkoholu, jež má nižší hustotu než voda [3], toto tvrzení bylo prokázáno i v této práci.

U skupiny vzorků A bylo opět pozorováno pozvolné snižování hustoty během 30 dní fermentace. Nejnižší hodnota, která byla u této skupiny zaznamenána 30. den (0,997 $kg \cdot m^{-3}$), byla u skupiny vzorků B zaznamenána již 11. den fermentace (0,998 $kg \cdot m^{-3}$), tato hodnota se již neměnila. To značí ukončení procesu fermentace u skupiny vzorků A 30. den a u skupiny vzorků B 11. den. Opět byla potvrzena vyšší aktivita kvasinek při teplotě kultivace 25 °C.

Tabulka 6 Naměřené hodnoty pro skupinu vzorků A během 30 dnů fermentace

Skupina vzorků A							
délka fermentace [den]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**11**	**30**
Alcohol [% V/V]	0,00	-0,02	0,03	0,18	0,37	3,89	6,98
RDF [%]	0,00	0,00	0,37	2,16	4,6	47,89	86,04
ADF [% m/m]	-0,13	-0,21	0,44	2,54	5,39	57,36	105,29
ρ [kg·m^{-3}]	1,052	1,052	1,051	1,050	1,048	1,021	0,997

Tabulka 7 Naměřené hodnoty pro skupinu vzorků B během 30 dnů fermentace

Skupina vzorků B							
délka fermentace [den]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**11**	**30**
Alcohol [% V/V]	-0,04	0,20	1,28	2,98	4,88	6,90	6,86
RDF [%]	0,00	2,48	16,53	36,88	60,42	86,04	86,07
ADF [% m/m]	-0,59	2,91	19,52	43,91	72,87	104,77	105,37
ρ [kg·m^{-3}]	1,052	1,050	1,039	1,028	1,013	0,998	0,998

V závislosti na objemu kvasné nádoby, teplotě během kvašení i na použitém kmenu kvasinek se odvíjí výsledný obsah alkoholu a CO_2 ve výrobku. [3,18] Vzhledem k tomu, že byl objem kvasných nádob i použitý kmen kvasinek stejný u obou skupin vzorků, výsledný obsah alkoholu a CO_2 v této práci byl ovlivněn především teplotou kultivace. Navíc teplota při kvašení ovlivňuje nejen její průběh, ale i výsledný obsah alkoholu a jiné organoleptické vlastnosti. [3,18] Při srovnání výsledků získaných v této práci byl taktéž pozorován vliv teploty kultivace na průběh fermentace, výsledný obsah alkoholu a vedlejších produktů, které dávají ciderům jejich typickou chuť. U všech získaných výsledků bylo potvrzeno, že aktivita kvasinek byla vyšší u vzorků kultivovaných při 25 °C. U těchto vzorků bylo dříve dosaženo skutečného stupně prokvašení (86 %), což je maximální hodnota, které lze při kultivaci dosáhnout, tedy tato hodnota znamená, že v médiu byly spotřebovány všechny zkvasitelné cukry a obsah alkoholu dosáhl maxima. [46] Při nižší teplotě bylo této maximální hodnoty taktéž dosaženo, ale za delší dobu fermentace. Výroba ciderů při vyšších teplotách fermentace by tedy mohla být pro firmy vyrábějící tyto nápoje zajímavá z ekonomického hlediska, protože by jim na výrobu stačil téměř poloviční čas než při

teplotě nižší. Otázkou však zůstává plnost chuti ciderů vyrobených za vyšších teplot, a tedy nutnost doplnění provedených analýz senzorickým hodnocením vzorků.

ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zabývala technologií výroby alkoholického nápoje typu cider. Následující část byla zaměřena na bližší popis procesu fermentace během výroby ciderů a kultivační podmínky mikroorganismů, které jsou při fermentaci využívány.

Praktická část byla zaměřena na sledování vlivu podmínek fermentace na kvalitu ciderů. Fermentace ciderů probíhala při teplotě 15 a 25 °C po dobu 30 dní. V průběhu fermentace byly u vzorků pozorovány změny hodnot pH, obsahu rozpustné sušiny, alkoholu, hustoty a stupně prokvašení, a to 1., 2., 3., 4., 5., 11. a 30. den fermentace.

Srovnáním výsledků získaných v této práci byl pozorován vliv teploty kultivace na průběh fermentace, výsledný obsah alkoholu a vedlejších produktů, které dávají ciderům jejich typickou chuť. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že při vyšší teplotě fermentace (25 °C) bylo již 11. den dosaženo nejvyššího skutečného stupně prokvašení (86,04 %) a také byl naměřen nejvyšší obsah alkoholu (6,90 %), zmíněné hodnoty zůstaly stabilní, čímž bylo potvrzeno, že byla v médiu vyčerpána zásoba zkvasitelných sacharidů. Při nižší kultivační teplotě (15 °C) byl nejvyšší skutečný stupeň prokvašení (86,04 %) a nejvyšší obsah alkoholu (6,98 %) zaznamenán teprve 30. den fermentace. Bylo tedy potvrzeno, že při vyšších teplotách fermentace je metabolismus použitých kvasinek rychlejší, avšak nelze říct, která ze dvou teplot je vhodná pro výrobu alkoholického nápoje typu cider vyvážené chuti. Z výsledků stanovení obsahu rozpustné sušiny a zdánlivého stupně prokvašení bylo totiž patrné, že i když byly vyčerpány zkvasitelné sacharidy, pokračovala v médiu přeměna dusíkatých látek na vedlejší produkty ovlivňující organoleptické vlastnosti cideru.

Pro následné studie by bylo tedy vhodné zařadit k jednotlivým analýzám i senzorické hodnocení výrobků pro zjištění vlivu teploty a rychlosti fermentace na vznik chuťových a aromatizujících látek, a tudíž na kvalitu ciderů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Vyhláška č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: Sbírka zákonů České republiky [online]. [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248

[2] Co je to cider? Cider club [online]. [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: https://ciderclub.com/co-je-cider/

[3] JEANTET, Romain et al., 2016. *Handbook of food science and technology*. Hoboken, NJ. Food science and technology series (London, England). ISBN 978-184-8219-342.

[4] UHROVÁ, Helena. Jak se dělá cidre, calvados, pommeau. Líbeznice: Víkend, 2016. ISBN 978-80-7433-151-0

[5] JOLICOEUR, C., 2013. The new cider maker's handbook: a comprehensive guide for craft producers. 352 s. White River Junction, Vermont: Chelsea Green Publishing. ISBN 978-1-60358-473-9.

[6] MOYLE, Nick a Richard HOOD. *Děláme si sami: pivo, víno, medovinu, cider, šumivé nápoje a další unikátní speciality*. Přeložil Marcela NEJEDLÁ. Líbeznice: Víkend, 2017. ISBN 978-80-7433-181-7

[7] Patulin, Bezpečnost potravin – slovník [online]. [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76802.aspx

[8] FORBES, K., 2013. Domácí vaření piva: vaříme si vlastní pivo, připravujeme víno a cider. 1. české vyd., 164 s. Praha: Svojtka & Co. ISBN 978-80-256-1247-7.

[9] CIBULKA, Jiří. *Domácí vína, piva, likéry a medoviny*. Liberec: GEN, 2003. ISBN 80-86681-23-8.

[10] HANOUSEK, Miloš. Domácí výroba moštů. Praha: Grada, 2006. Česká zahrada. ISBN 80-247-1445-0.

[11] BUGLASS, A. J., 2011. Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects. 2nd ed., 1204 s. Chichester, West Sussex, England: John Wiley. ISBN 978-047-0512-029.

[12] Výlisnost, Znalec vín: Encyklopedie vína, vinařství a vinohradnictví [online]. [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: http://www.znalecvin.cz/vylisnost/

[13] PROULX, A., NICHOLS, L., c2003. Cider: making, using & enjoying sweet & hard cider. 3rd ed., 224 s. North Adams, MA: Storey Publishing. ISBN 15-801-7520-1.

[14] Keeving – What's that? [online], [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: http://www.cider.org.uk/keeving.html

[15] THE SCIENCE OF CIDERMAKING [online], [cit. 2020-03-16]. Dostupné z: http://www.cider.org.uk/frameset.htm

[16] Appellation d'origine protégée/contrôlée (AOP/AOC), *Institut national de l'origine et de la qualité* [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQO/Appellation-d-origine-protegee-controlee-AOP-AOC

[17] CAMPBELL-PLATT, Geoffrey, 2009. *Food science and technology*. Oakville, Ont.: IUFoST. ISBN 0632064218.

[18] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.

[19] PANDEY, Ashok et al., 2015. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology: Alcoholic Fermentation* [online]. Elsevier, s. 183-188 [cit. 2020-05-09]. ISBN 978-0-44463-464-1. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00UOU27C/industrial-biorefineries/alcoholic-fermentation

[20] MOTARJEMI, Yasmine, 2014. Alcoholic Fermentation. *Encyclopedia of Food Safety* [online]. Elsevier, s. 170-171 [cit. 2020-05-14]. ISBN 978-0-12-378613-5. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C6DJO3/encyclopedia-food-safety/alcoholic-fermentation

[21] MEGANATHAN, R.; RANGANATHAN Y.; REDDY, C. A. 2007. Carbohydrate Fermentation. REDDY, C.A. *Methods for General and Molecular Microbiology* [online]. 3rd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM), s. 559-582 [cit. 2020-05-14]. ISBN 978-1-61344-274-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpMGMME001/cid:kt0090KHJ1/viewerType:khtml//root_slug:methods-general-

molecular/url_slug:construction-fermentation?page=1&view=collapsed&zoom=1

[22] KÜCK, Ulrich; FRANKENBERG-DINKEL, Nicole. 2015. *Biotechnology* [online]. Germany: De Gruyter [cit. 2020-05-14]. ISBN 978-1-5231-0449-9. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpB0000011/viewerType:toc//root_slug:biotechnology/url_slug:alcohol-fermentation?issue_id=kt010ZJBZ1

[23] PARISH, Mickey E.; FLEET, Graham H., 2013. Malolactic Fermentation. DOYLE, Michael P.; BUCHANAN, Robert L. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* [online]. 4th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM), s. 918 [cit. 2020-05-14]. ISBN 978-1-62870-225-5. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpFMFFE001/cid:kt00C3L2XE/viewerType:khtml/root_slug:food-microbiology-fundamentals/url_slug:malolactic-fermentation?&page=4&view=collapsed&zoom=1

[24] PHISTER, T.G., 2009. Using Microbial Succession to the Processor's Advantage: Food Fermentation and Biocontrol. JAYKUS, Lee-Ann; WANG, Hua H.; SCHLESINGER, Larry S. *Food-Borne Microbes – Shaping the Host Ecosystem* [online]. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM), s. 161-182 [cit. 2020-05-09]. ISBN 978-1-61344-264-7. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpFBMSHE05/cid:kt0098ZWJ1/viewerType:khtml//root_slug:food-borne-microbes-shaping/url_slug:wine?page=1&view=collapsed&zoom=1

[25] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-973-0.

[26] ANAISSIE, Elias J, Michael R MCGINNIS a Michael A PFALLER. Clinical mycology. New York: Churchill Livingstone, c2003, xii, 608 p. ISBN 04-430-7937-4.

[27] KOSEVA, M.R., 2017. Waste From Fruit Wine Production. *Science and Technology of Fruit Wine Production* [online]. Elsevier, s. 557-598 [cit. 2020-

05-03]. ISBN 978-0-12-800850-8. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/saccharomyces-bayanus

[28] ROBINSON, Richard K., 2000. Saccharomyces cerevisiae. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, s. 1918-1924 [cit. 2020-05-14]. ISBN 978-0-08-052359-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0051M651/encyclopedia-food-microbiology/saccharomyces-characteristics

[29] ŠULCOVÁ, Margaréta. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učební texty pro zdravotnické obory*. Vydání třetí přepracované. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta zdravotnických studií, 2018. ISBN 978-80-7561-116-1

[30] BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ a Tomáš LEJSEK. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

[31] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.

[32] VOTAVA, Miroslav. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vyd. Brno, 2000. ISBN 80-238- 5058-X.

[33] SUÁREZ VALLES, Bellén, et al., 2008. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). *Food Microbiology* [online]. 25(5), 690-697 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1016/j.fm.2008.03.004. ISSN 07400020. Dostupné z: https://www-sciencedirect-com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0740002008000506

[34] Technical Data: Glucose Yeast Peptone Agar, 2015. In: *HimediaLabs* [online]. [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: http://www.himedialabs.com/TD/M757.pdf

[35] YPD (YEPD) agar, powder, *MP Biomedicals* [online]. [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://eu.mpbio.com/114001222-ypd-yepd-agar-powder-cf?SID=rfatfbsvknm9603qol37m0jop2

[36] BIGGY AGAR, *Hardy Diagnostics* [online]. [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/BiGGYAgar.Htm

[37] HUBERSON, Akin, 2008. A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by Saccharomyces cerevisiae. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* [online]. 47(11), 1986-1993 [cit. 2020-05-16]. ISSN 0255-2701. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0255270107003819.

[38] Chemicool dictionary: Definiton of pH, Chemicool [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: https://www.chemicool.com/definition/ph.html

[39] ČSN ISO 12143. *Ovocné a zeleninové šťávy – Odhad obsahu rozpustné sušiny – Refraktometrická metoda.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1998, 12 s. Třídící znak 560414.

[40] *Stupnice pro měření cukernatosti Brix, Balling, Plato, ČNM, KMW, Oechsle, Baumé: Stupeň Brix (°Bx)* [online], [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://www.refraktometr.cz/stupnice-pro-mereni-cukernatosti

[41] *Systém Alcolyzer Beer* [online], [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://www.anton-paar.com/cz-cs/produkty/detaily/system-alcolyzer-beer/

[42] *YOU CREATE OTHER FERMENTED BEVERAGES?* [online], [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://fermentis.com/en/fermentation-solutions/you-create-other-fermented-beverages/

[43] *Safcider* [online], [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://www.vyrobtesipivo.cz/safcider-p451

[44] Understanding Beer Attenuation, *Winning Homebrew* [online]. [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: https://www.winning-homebrew.com/beer-attenuation.html

[45] RIEKSTINA-DOLGE, Rita, et al., 2011. Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. *Procedia Food Science 1* [online]. Elsevier, **1**, 1709-1716 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.252. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002537

[46] WHITE, Chris a Jamil ZAINASHEFF, 2010. *Yeast: The Pracical Guide to Bear Fermentation*. USA: Brewers Publications. ISBN 0-937-381-96-9.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADF zdánlivý stupeň fermentace

ATP adenosintrifosfát

EMP Embden-Mayerhof-Parnas

JMF Jablečno-mléčná fermentace

NADH nikotinamidadendinukleotid

PME pektin methylesterasa

PPO polyfenoloxidasa

RDF skutečný stupeň fermentace

SEZNAM OBRÁZKŮ

obrázek 1 Pulpmaster, upraveno podle [4] 15
obrázek 2 Výtěžnost moštu z drtě, upraveno podle [10] 17
obrázek 3 Průběh fermentace, upraveno dle [18] 21
obrázek 4 Schéma EMP dráhy, upraveno dle [21] * 25
obrázek 5 Schéma vzniku ethanolu, upraveno dle [22] 26
Obrázek 6 Morfologie kolonií, upraveno podle [25] 31

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Závislost mezi kvalitou jablek a naměřenou hustotou, upraveno dle [4] . 18
Tabulka 2 Průměrné hodnoty pH pro skupinu vzorků A 38
Tabulka 3 Průměrné hodnoty pH pro skupinu vzorků B 38
Tabulka 4 Průměrné hodnoty obsahu rozpustné sušiny pro skupinu vzorků A 39
Tabulka 5 Průměrné hodnoty obsahu rozpustné sušiny pro skupinu vzorků B 40
Tabulka 6 Naměřené hodnoty pro skupinu vzorků A během 30 dnů fermentace 42
Tabulka 7 Naměřené hodnoty pro skupinu vzorků B během 30 dnů fermentace 42

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Závislost hustoty a obsahu zkvasitelných cukrů na výsledném obsahu alkoholu, upraveno dle [13]

hustota [kg·m^{-3}]	obsah sacharidů [g·l^{-1}]	potenciální obsah alkoholu [%]	hustota [kg·m^{-3}]	obsah sacharidů [g·l^{-1}]	potenciální obsah alkoholu [%]
1,000	0,3	*	1,034	70	4,10
1,001	1,8	*	1,035	72,5	4,20
1,002	3	0,05	1,036	74,5	4,35
1,003	5	0,20	1,037	76,5	4,45
1,004	7	0,30	1,038	79	4,60
1,005	9	0,40	1,039	81	4,75
1,006	11	0,55	1,040	83	4,90
1,007	13,5	0,70	1,041	86	5,05
1,008	15,5	0,80	1,042	88	5,15
1,009	18	0,95	1,043	90,5	5,30
1,010	20	1,10	1,044	93	5,45
1,011	22	1,20	1,045	95,5	5,60
1,012	24	1,30	1,046	98	5,75
1,013	26	1,45	1,047	100	5,90
1,014	28	1,55	1,048	102,5	6,05
1,015	30	1,70	1,049	105	6,20
1,016	32	1,80	1,050	107,5	6,35
1,017	34	1,90	1,051	110	6,50
1,018	36,5	2,10	1,052	112	6,60
1,019	38,5	2,20	1,053	114,5	6,75
1,020	40,5	2,30	1,054	117	6,90
1,021	42,5	2,40	1,055	119,5	7,05
1,022	44,5	2,55	1,056	122	7,20
1,023	46,5	2,65	1,057	124	7,30
1,024	48,5	2,80	1,058	126,5	7,45
1,025	51	2,95	1,059	129	7,60
1,026	53	3,05	1,060	131	7,75
1,027	55	3,20	1,061	133	7,85
1,028	57,5	3,30	1,062	135	8,00
1,029	59,5	3,40	1,063	137	8,10
1,030	61,5	3,55	1,064	139,5	8,25
1,031	64	3,70	1,065	141,5	8,35
1,032	66	3,85	1,066	143,5	8,50
1,033	68	3,95	1,067	145,5	8,60