

# Mikroflóra spontánně kvašených piv

Agáta Horáková

---

Bakalářská práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Agáta Horáková**  
Osobní číslo: **T18103**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Mikroflóra spontánně kvašených piv**

## Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši. V textu práce:

1. Charakterizujte spontánně kvašená piva; popište technologii výroby a sortiment na trhu EU.
2. Charakterizujte skupiny mikroorganismů ve spontánně kvašených pivech.
3. Popište metody izolace a typizace kmenů mikroorganismů.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Boekhout, T. Robert, V., (2003). Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects – 13.5 Physiological Background of Brewing Yeast. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C7JW62/yeasts-in-food-beneficial/brewing-ye-physiological>
- [2] Briggs, Dennis E. Boulton, Chris A. Brookes, Peter A. Stevens, Roger. (2004). Brewing Science and Practice – 1.9 Fermentation. Woodhead Publishing. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt003RWPZ1/brewing-science-practice/fermentation>
- [3] Doyle, Michael P. Buchanan, Robert L. (2013). Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers (4th Edition) – 36.4.2 Brewing Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). American Society for Microbiology (ASM). Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C3L2G2/food-microbiology-fundamentals/brewing-yeast-saccharomyces>
- [4] Robinson, Richard K.. (2000). Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3 – Pickles. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0051JPJ1/encyclopedia-food-microbiology/pickles>

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

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 25. února 2022

## **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, považuji 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**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou mikroflóry spontánně kvašených piv, nejčastěji tedy lambických piv, které se vaří v Belgii. Cílem této práce bylo vytvořit přehled mikroflóry v určitých fázích procesu fermentace produktu a důvodu jejich přítomnosti. Proces fermentace byl rozdělen do čtyř základních fází, kde v každé fázi se vyskytuje jiná mikroflóra přispívající ke konečné chuti a aroma piva. Bakalářská práce dále popisuje způsoby izolace a identifikace mikroorganismů a dostupný sortiment na českém a evropském trhu.

Klíčová slova: spontánně kvašené pivo, mikroflóra, fermentace

## **ABSTRACT**

This Bachelor thesis deals with the issue of microflora of spontaneously fermented beers, most often about Lambic beers which are brewed in Belgium. The aim of this work was to create an overview of the microflora in certain stages of the product fermentation process and the reason for their presence. The process of fermentation was divided into four basic phases, where in each phase is a different microflora contributing to the final taste and aroma of the beer. The bachelor thesis also describes the methods of isolation and identification of microorganisms and the range of products available on the Czech and European markets.

Keywords: spontaneously fermented beer, microflora, fermentation

Tímto bych ráda poděkovala především své vedoucí práce Ing. Evě Lorencové Ph.D. za pozitivní přístup, věnovaný čas a podpoře při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a svým přátelům za motivaci, podporu a pochopení při závěrečném dokončování studia a této závěrečné práce.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA PIVA.....</b>	<b>10</b>
1.1 HISTORIE PIVA .....	10
1.2 DEFINICE PIVA PODLE PLATNÉ LEGISLATIVY .....	10
1.3 SPONTÁNNĚ KVAŠENÁ PIVA .....	11
1.3.1 LAMBIC.....	11
1.3.2 WILD ALES .....	12
1.3.3 OVOCNÁ PIVA .....	13
1.4 SUROVINY PRO VÝROBU PIVA .....	14
1.4.1 VODA.....	14
1.4.2 SLAD A SLADOVÉ SUROGÁTY .....	15
1.4.3 CHMEL.....	16
1.4.4 KULTURY PIVOVARSKÝCH KVASINEK .....	17
<b>2 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA .....</b>	<b>19</b>
2.1 VÝROBA SLADINY .....	20
2.2 VÝROBA MLADINY.....	21
2.3 FERMENTACE .....	22
2.3.1 ŘÍZENÁ FERMENTACE .....	23
2.3.2 SPONTÁNNÍ FERMENTACE .....	23
2.4 ZRÁNÍ .....	24
2.5 FINÁLNÍ ÚPRAVY PIVA.....	24
2.5.1 FILTRACE .....	24
2.5.2 PASTERACE.....	25
2.6 SPECIFIKA VE VÝROBĚ LAMBICKÉHO TYPU PIVA .....	26
2.6.1 VYUŽITÍ DŘEVĚNÝCH SUDŮ VE FERMENTAČNÍM PROCESU SPONTÁNNĚ KVAŠENÝCH PIV .....	28

<b>3</b>	<b>SKUPINY MIKROORGANIZMŮ VE SPONTÁNNĚ KVAŠENÝCH PIVECH</b> .....	<b>30</b>
3.1	PRVNÍ FÁZE FERMENTACE U LAMBICKÝCH PIV .....	30
3.1.1	ENTEROBAKTERIE .....	31
3.1.2	KVASINKY .....	32
3.1.3	BAKTERIE OCTOVÉHO KVAŠENÍ .....	33
3.2	DRUHÁ FÁZE FERMENTACE U LAMBICKÝCH PIV .....	33
3.2.1	KVASINKY .....	34
3.3	TŘETÍ FÁZE FERMENTACE U LAMBICKÝCH PIV .....	35
3.3.1	BAKTERIE OCTOVÉHO KVAŠENÍ .....	36
3.3.2	BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....	37
3.4	ČTVRTÁ FÁZE FERMENTACE U LAMBICKÝCH PIV .....	39
3.4.1	KVASINKY .....	39
<b>4</b>	<b>METODY IZOLACE MIKROORGANIZMŮ</b> .....	<b>42</b>
4.1	KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	42
4.2	INOKULACE .....	42
4.3	IDENTIFIKACE .....	43
4.3.1	TECHNIKY ZALOŽENÉ NA SEKVENOVÁNÍ DNA .....	43
<b>5</b>	<b>DOSTUPNÝ SORTIMENT SPONTÁNNĚ KVAŠENÝCH PIV V RÁMCI EU</b> .....	<b>48</b>
5.1	BELGICKÉ PIVOVARY .....	48
5.2	ČESKÉ PIVOVARY .....	51
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>54</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>65</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>66</b>



## ÚVOD

Pivo se na světě vaří už od starověku, kdy tento nápoj byl objeven pouhou náhodou při pečení chleba. V průběhu staletích se tento alkoholický nápoj stal jedním z nejvíce vyhledávaným nápojem po celém světě (Chládek, 2007)

S výrobou piva jde ruku s rukou mnoho pravidel, která byla ustavena již v roce 1516 v Německu a dále pak upravena v roce 1993, kdy byly pivovarské kvasnice přidány jako nedílná součást surovin pro výrobu piva (Zýbrt, 2005)

Historicky se spontánní fermentace využívala nejen při výrobě piva ale i při výrobě vína a jablečných ciderů. Bohužel, kvůli své neovladatelnosti a nedostatečné kontrole nad procesem kvašení, se od tohoto upustilo (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020) a pivo se začalo vyrábět řízenou fermentací pomocí přidání pivovarských kvasnic; *Saccharomyces cerevisiae* u svrchně kvašeného piva a *Sacchaormyces pastorianus* u spodně kvašeného piva (Priest a Campbell, 1996). Nicméně, i přes nedostatečnou kontrolu při kvašení, se i nadále spontánně kvašená piva vyrábí. A to především lambické pivo vyráběné v Belgických pivovarech, které mají s výrobou tohoto druhu piva dlouholetou tradici a historii, jelikož právě lambická piva se od nepaměti vaří právě v okolí Bruselu (Spitaels et al., 2014a).

Lambická piva se dají rozdělit do několik kategorií, které závisí na procesu výroby, délce fermentace a dalších přidaných surovin. Největším rozdílem u výroby lambického piva a tradičních piv je proces fermentace, který může někdy trvat až tři roky (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020). Fermentace je rozdělena do čtyř fází a jejich celková délka závisí na výsledném produktu, kterého chceme dosáhnout (De Roos a De Vuyst, 2018b).

Kvůli své dlouhé době výroby a potřebných podmínkách pro správnou inokulaci mikroorganismů do mladiny, se počet pivovarů vařící tento druh piva nepohybuje ve velkých číslech. A v této době se většina z nich vyskytuje na území Belgie. I přes všechny tyto překážky se ale pivovary vařící spontánně kvašená piva dají objevit i v jiných zemích.

# 1 CHARAKTERISTIKA PIVA

## 1.1 Historie piva

Začátek výroby piva sahá hluboko do historie. V první polovině dvacátého století panovala domněnka, že kolébka piva se nachází v Egyptě, odkud se nápoj později rozšířil do dalších zemí. Archeologické nálezy ve starověké Mezopotámii tuto domněnku ale vyvracejí. Pivo dokázali vařit již starověcí Sumérové. K tomuto objevu posloužili i práce našeho orientalisty Bedřicha Hrozného (Chládek, 2007).

Archeologické nálezy podporují teorii, že pivo je náhodný objev u pečení chleba. Pivovarské kvasnice nejsou schopny fermentovat škrob z obilných zrn, proto je nutné předběžné klíčení, při kterém jsou škrob a bílkoviny enzymaticky hydrolyzovány na jednoduché cukry a aminokyseliny. Ty dále kvasinkám poskytují hlavní živiny pro provádění fermentace. Tento proces se mohl u vlkého obilí stát náhodou. Díky tomu by přirozeně se vyskytující kvasnice mohli vytvořit primitivní pivo (Novák Večerníček, 2015).

Je pravděpodobné a velice možné, že nápoj, vytvořený z nějaké obilniny a samovolně zkvašený, vznikl nezávisle na sobě na různých místech v přibližně stejnou dobu. V každé části světa vznikly rozdílné kvašené nápoje, například v jihovýchodní Asii se pilo rýžové pivo, v Africe kvašený nápoj z prosa a v Americe původní obyvatelé používali pro výrobu alkoholických nápojů kukuřici (Chládek, 2007).

V roce 1993 byl vydaný prozatímní zákon o pivu (*Vorläufiges Biergesetz*), který nahradil dřívější bavorskou regulaci (*Bavarian Reinheitsgebot*) z roku 1516. Ta stanovila, že pouze voda, sladový ječmen a chmel se může používat při vaření spodně kvašeného piva v Německu. Nový zákon přidal do seznamu používaných surovin ještě pivovarské kvasnice (Zýbrt, 2005).

## 1.2 Definice piva podle platné legislativy

Pivo je definováno pomocí vyhlášky č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. Pivem se rozumí „*pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových výrobků, který vedle kvasným procesem vzniklého etanolu a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu; slad lze do výše jedné třetiny hmotnosti celkového extraktu původní mladiny nahradit extraktem zejména cukru, obilného škrobu, nesladovaných*

*obilovin nebo rýže; u piv ochucených může být obsah alkoholu zvýšen přidavkem lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů“.*

### **1.3 Spontánně kvašená piva**

Spontánní fermentace byla využívána pro tradiční produkci piva, vína a jablečného cideru. Nicméně, využití spontánního kvašení u piva bylo velice vyjmečné, kvůli nedostatečné kontrole nad procesem kvašení. I přes tuto překážku jsou lambická piva stále produkována zkrze právě spontánní fermentaci (Witrick, Pitts a O’Keefe, 2020). Spontánně fermentovaná piva se od klasicky fermentovaných liší tím, že proces fermentace není zahájen přidáním inokula kvasinek nebo bakterií jako startovacích kultur. Namísto toho, mikrobiologický růst začíná přes noční chlazení uvařené mladiny v mělkých otevřených nádobách, které se nazývají chladicí kádě nebo coolshipy (Priest a Campbell, 1996).

V české legislativě, ve vyhlášce č. 248/2018 Sb., spontánně kvašené pivo není přímo definováno. Spontánně kvašená piva v této legislativě patří pod skupinu atypických pivních nápojů definováno takto: *„atypickým pivním nápojem nápoj na bázi piva s modifikovaným podílem sladu nebo modifikovaným způsobem kvašení“.*

Někteří výrobci tento druh piva, kvůli nedostatečné legislativě, označují pouze jako pivo, nebo takzvané „divoké“ pivo, kde název odkazuje na využití divoké, neboli spontánní, fermentace. Označení „Atypický pivní nápoj“ používají velice neradi, protože věří, že takto pojmenovaný nápoj si nikdo nekoupí (EuroZprávy.cz, 2019). Český pivovar Wild Creatures, který vaří pouze spontánně kvašená piva, označuje své výrobky na etiketách jako Wild Ale (Wild Creatures, 2022).

#### **1.3.1 Lambic**

Lambický typ spontánně kvašeného piva je jeden z nejstarších druhů piva, která se vaří i dnes, při kterém fermentace trvá až tři roky. Tradičně se tento druh piva vaří do 15 kilometrů (někdo tvrdí pouze do 10 kilometrů) od Bruselu (Witrick, Pitts a O’Keefe, 2020), poblíž údolí řeky Senne, v Belgii (Spitaels et al., 2014a).

**Gueuze** je tradiční Belgické láhvové pivo (Boulton, 2013). Tradičně je tvořeno směsí mladého (okolo 1 roku) a staršího (2-3 roky) lambického piva, které je následně lahvováno pro sekundární fermentaci, která může trvat další 1 až 2 roky (Witrick, Pitts a O’Keefe, 2020). To nastává díky tomu, že mladé lambické pivo, které je součástí směsi ještě není plně zkvašené a obsahuje cukry, které nastartují sekundární fermentaci u staršího lambického piva ve směsi (Van Oevelen, De L’Escaille a Verachtert, 1976). Čím déle se Gueuze nechá

sekundárně fermentovat v lahvi, tím více druhů aromat lze v lahvích najít (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020).

**Lambic doux** je nejmladší formou lambických piva. Pivo je tradičně zakalené (Boulton, 2013). Prodává se přímo ze sudu po proběhnutí fermentace, po dobu několika týdnů až jednoho roku (Guinard, 1990), což je na lambický druh piva považováno za relativně krátkou dobu. Pivo má charakteristický zakalený vzhled a velmi kyselou chuť (Boulton, 2013). Kavárna La Bécasse v Bruselu se proslavila právě podáváním tohoto typu piva (Guinard, 1990).

**Lambic vieux** je belgické pivo lambického typu, kde přípona „vieux“, neboli „stará“, odkazuje na skutečnost, že fermentace musí probíhat v sudu po dobu nejméně tří let a poté v lahvi probíhá sekundární fermentace po dobu jednoho roku (Guinard, 1990). Lambic vieux je pivo jasnější a působením, později se vyskytujících mikrobiálních populací, zejména kvasinek kmenů *Brettanomyces*, poskytuje sušší a vínu podobné vlastnosti (Boulton, 2013).

**Faro** je tradiční stolní pivo s nízkým obsahem alkoholu pro každodenní pití (Boulton, 2013). Faro bylo tradičně vyráběno ze směsi lambického piva a piva Meerts, což je verze lambického piva s velice nízkým podílem alkoholu. Kombinace méně cenově náročného piva Meerts s lambickým pivem udělalo Faro cenově dostupné pro každodenní požívání (Brewer, 2015). Tato směs byla poté oslazená pomocí třtinového cukru (Keersmaecker, 1996), melasy nebo karamelu. Výroba tohoto typu piva z většiny už vymizela, ale několik moderních verzí se stále vyrábí v Belgii. Tam jsou stále slazeny nějakou formou cukru. Ale po naplnění do lahví jsou pasterizovány, aby nedocházelo k sekundární fermentaci (Boulton, 2013).

**Meerts bier**, doslova přeloženo jako březnové pivo, odkazuje na skutečnost, že v mnoha zemích bylo během středověku vaření piva sezónní okupací (Guinard, 1990). Celoroční vaření nebylo možné, a to z důvodu nedostatečné kontroly kvality piva v teplejších měsících roku. Na jaře, ke konci pivovarské sezóny, se vyráběla proto speciální piva s nízkým obsahem alkoholu a chmele. Záměrem bylo, aby se taková piva konzumovala po celé léto, jelikož vyšší koncentrace alkoholu a chmele zajistila delší trvanlivost (Boulton, 2013).

### 1.3.2 Wild Ales

**Sikaru** je název piva, který byl popsán v Mezopotámii asi 5000 let před naším letopočtem, vyráběné Suméry (Keersmaecker, 1996). Pivo se vyrábělo ze špaldy, ječmene nebo směsi těchto dvou obilnin (Boulton, 2013). Nakonec se produkt ochutil kořením, zejména skořicí (Keersmaecker, 1996). Jelikož fermentace probíhala spontánně, bere se

Sikaru za předchůdce moderních belgických lambických piv, které se také vyrábí spontánní fermentací (Boulton, 2013).

**Vlámský červenohnědý Ale** je vyráběn z opečených sladů, které pivu dodávají načervenalé zabarvení. Typicky je tento druh piva kyselý s ovocnou příchutí (Brewer, 2015). Pivo je svrchně kvašené a využívá směs kultur kmenů pivních kvasinek a bakterií mléčného kvašení. Pivo většinou prochází velmi dlouhou fermentací, a to v řádu měsíců až několika letech v dřevěných sudech. Požadovaná chuť se získává mícháním mladé a staré šarže, stejně jako u piva druhu Gueuze (Boulton, 2013). V této době se tento druh vyrábí nejčastěji smícháním mladého svrchně kvašeného piva se spontánně kvašeným pivem, které zráló v dřevěných sudech nejméně 18 měsíců (De Roos a De Vuyst, 2018b).

**Americká chladné pivo**, American Coolship Ale, je typ spontánně fermentovaného piva, které využívá podobné výrobní metody jako tradiční belgické lambiky, ve snaze vytvořit podobný styl kyselého piva (Bokulich et al., 2012). Tyto piva jsou produkovány jako piva sezónní (De Roos a De Vuyst, 2018b).

### 1.3.3 Ovocná piva

**Kriek** je typ ovocného piva, které je velice často asociováno s Belgií. To z toho důvodu, že je tradičně vyráběno směsí lambického piva a macerovaných višní. Samotné jméno Kriek pochází z vlámského slova pro třešň (Keersmaecker, 1996). Ovocná dřev je přidána do tanků, aby se základ piva i přidaná ovocná dřev mohla účastnit spontánní fermentace až po dobu několika měsíců. Po naplnění do lahví se pivo podrobí sekundární fermentaci. U tohoto druhu piva existují i výjimky, které nejsou založené na Lambiku. Modernější druh tohoto piva nahrazuje ovocnou dřev sirupy a tak urychlují výrobní proces (Boulton, 2013).

**Framboise** je ovocné pivo spojené s Belgií a tradičně vyráběno směsí lambického piva a macerovaných malin (Keersmaecker, 1996). Název Framboise pochází z francouzského slova pro maliny (Brewer, 2015). Maliny jsou přidávány do tanků tak, aby se jak základní pivo, tak dužiny ovoce mohly účastnit spontánní fermentace po dobu několika měsíců. Výsledné pivo je následně smícháno s čerstvým lambikem a po naplnění do lahví se podrobuje dlouhé sekundární fermentaci (Boulton, 2013). Typické pivo tohoto druhu je na sladší straně (Brewer, 2015).

## 1.4 Suroviny pro výrobu piva

### 1.4.1 Voda

Procentním objemem konečného produktu je voda nejdůležitější složkou piva a s největší celkovou hmotnostní složkou, kterou lze jen těžko dopravit z jednoho místa na druhé (Mosher a Trantham, 2017). Konečné pivo totiž obsahuje 90-98 % vody. Jelikož je voda největší složkou využitou při výrobě piva, má tento komponent drastický impakt jak na konečný produkt, tak na proces (Boulton, 2013). Spotřeba vody mnohokrát převyšuje objem vyrobeného piva; na výrobu jednoho litru se spotřebuje v závislosti na velikosti a technickém stavu pivovaru od 7 do 12 litrů vody (Chládek, 2007). Proto i dnes pivovary získávají tuto složku lokálně. Voda sama o sobě má velmi malou vlastní chuť a proto je snadné přehlédnout přínos této suroviny (Mosher a Trantham, 2017).

V pivovarnictví se voda dá rozdělit podle účelu použití do tří skupin. Největší skupinu tvoří varní voda pro přípravu piva jako surovina. Další skupinu tvoří mycí a sterilační voda, která musí být bez mikroorganismů a chemických kontaminantů. Poslední skupinu tvoří provozní voda (Basařová, 2010).

Kvůli potřebě velkého množství kvalitní vody se pivovary vždy stavěly v místech, kde bylo vody dostatek. Povaha místní vody také zapříčinila vzniku různých druhů piva, například světlé ležáky potřebují na svoji výrobu měkkou vodu (Boulton, 2013).

Přírodní voda představuje velmi zředěný roztok solí a rozpuštěných plynů, případně suspendovaných organických a anorganických látek. Obsah nerostných látek je dán geologií místa původu vody. Voda v přírodě se dá rozdělit do dvou kategorií, a to na vodu spodní a povrchovou (Chládek, 2007). Spodní vody pocházejí z pramenů, studní nebo z vrtů. Také obsahují méně organických látek a mikroorganismů v porovnání s povrchovou vodou. Ty jsou naopak z hlediska čistoty podstatně horší. Obsahují více suspendovaných látek, často také i nepřipustné množství rozpuštěných anorganických a organických kontaminantů (Basařová, 2010).

Dalším důležitým kritériem posuzování kvality vody pro pivovarské účely je její tvrdost, tvořená obsahem iontů kovů alkalických zemin, zejména vápníku a hořčíku. Tvrdost vody se dělí na přechodnou a trvalou, kde přechodná je tvořena hydrogenuhličitanem, které se varem rozkládají (Chládek, 2007). Přechodná tvrdost je pouze dočasná, neboť jde odstranit varem. Trvalá tvrdost je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi, které jsou stále a nejde odstranit varem. Změkčení trvale tvrdé vody lze dosáhnout chemickými úpravami, pro větší množství se běžně používají iontoměničové pryskyřice (Boulton, 2013). Celková tvrdost se

pak vypočítá součtem přechodné a trvalé tvrdosti. Tvrdost vody se vyjadřuje nejčastěji v mmol/l (dříve se také používaly německé stupně °D), kdy 1 °D je přibližně 0,0179 mmol/l. Podle této hodnoty se tvrdost vody dělí na měkké do 1,3 mmol/l (do 7 °D), středně tvrdé do 2,5 mmol/l (do 14 °D), tvrdé do 3,8 mmol/l (do 21,3 °D) a velmi tvrdé nad 5,3 mmol/l (do 21,3 °D) (Basařová, 2010).

#### **1.4.2 Slad a sladové surogáty**

Slad se převážně vyrábí ze sladovnického dvouřadého ječmene (Chládek, 2007). Nejčastěji z jarních ječmenů. Druh vybrané odrůdy ječmene poté výrazně ovlivňuje kvalitu sladu a z něj vyrobeného piva (Basařová, 2010). Ostatní obilniny se sladují ze specifických důvodů, většinou pro výrobu speciálních piv (Van Oevelen et al., 1977), nebo se ostatní obiloviny a náhražky sladu používají z ekonomických důvodů. Rýže nebo čiroka se používá například pro výrobu bezlepkových druhů piv (Basařová, 2010).

Pšeničný slad se využívá při výrobě takzvaného bílého piva. Žitný slad se používá málo ve výrobě piva, kvůli pomalé separaci mladiny a konečného zákalu ve výsledném pivu, ale používá se při výrobě žitné whisky v Kanadě (Van Oevelen et al., 1977).

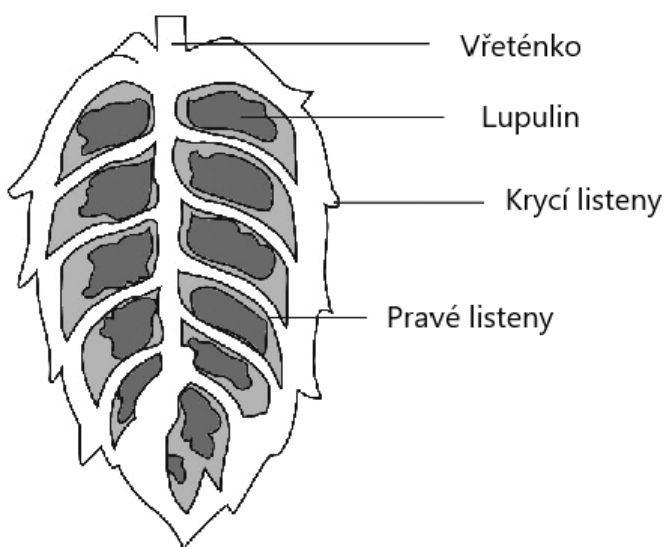
Náhražky sladu se dělí podle způsobu zpracování na škrobnaté (ty které jsou nepřímo zpracovatelné) a na cukernaté (ty které jsou přímo zpracovatelné). Mezi škrobnaté náhražky sladu můžeme zařadit nesladované obiloviny (kukuřice, rýže, pšenice, čirok či oves), škrobnaté výluhy, sirupy a koncentráty, a speciální sladové náhražky. Jako cukernaté náhražky bereme krystalový cukr, surový cukr, invertní cukr nebo škrobový cukr (Basařová, 2010).

První část procesu sladování napodobuje to, co by se stalo v přírodě, kdyby se zrna ječmene nechala klíčit na poli (Stewart et al., 2017). Zrno je nejprve ponoženo do studené vody, tento proces se opakuje dvakrát až třikrát. Hlavním cílem tohoto procesu je zvýšit vlkost zrna na hodnotu okolo 45 % (Mosher a Trantham, 2017). Jakmile jsou zrna důkladně mokrá, nechají se klíčit. V tomto okamžiku zrno produkuje a uvolňuje rostlinný hormon, gibberelin, který aktivuje aleuronovou vrstvu zrna k produkci enzymů (Stewart et al., 2017). Následující proces se nazývá hvozdnění. To zastavuje proces klíčení pomocí horkého vzduchu; při tomto procesu se také vyvíjí barva a chuť sladu. Nakonec se mechanicky odstraní kořeny a slad je připraven k použití (Van Oevelen et al., 1977).

### 1.4.3 Chmel

Chmel se ze začátku nevyužíval, v historických receptech se často nachází naopak jiné přísady, kterými byl výsledný produkt ochucen. Na to se využívaly různé rostliny, ovoce, zelenina a koření. Tento seznam je poměrně rozsáhlý. Zatímco chmel se při vaření používal už někdy v 800 letech, až ve 13. století se chmel stal konzistentní přísadou při ochucování (Mosher a Trantham, 2017).

Chmel otáčivý (Obr. 1), rostlina latinsky nazývaná *Humulus lupulus* L., je popínavá, bylinná trvalka z čeledi *Cannabaceae* (Boulton, 2013). Rostlina je dvoudomá a pro vaření piva je nejžádanější květina produkovaná samičí rostlinou (Mosher a Trantham, 2017). Chmel otáčivý se ještě rozlišuje na 3 další poddruhy, a to chmel evropský (který se dá rozlišit na tři variety), chmel novomexický a chmel srdčitolistý (Basařová, 2010). Po opylení samčí rostlinou začíná produkce semen, které výrazně snižují užitečnost květů pro vaření piva. Pěstovatelé chmele proto pracují na zajištění pouze samičí rostliny na poli (Mosher a Trantham, 2017). Květy chmele se nyní využívají jen v minimálním množství pivovarů, kde vaří pivo ještě tradičním způsobem. Většina pivovarů nyní využívá zpracovaný chmel, buďto jako chmelový extrakt nebo pelety připravené z mletých květů (Priest a Campbell, 1996).



Obr. 1 Schématický popis chmelové šišťice; přeloženo (Olšovská et al., 2016)

Pro výrobu piva jsou nejdůležitějšími složkami, které chmel obsahuje pryskyřice, silice a fenolické látky (Priest a Campbell, 1996). Tyto složky se ale vyvaří, pokud se mladina nechá vařit dostatečně dlouhou dobu. Z toho důvodu, pokud si sládek tyto sloučeniny přeje zachovat v konečném výrobku, se chmel přidává v posledních pěti až deseti minutách varu.



Různé druhy chmele jsou speciálně kultivovány, aby obsahovaly vyšší hodnoty těchto sloučenin a používaly se tedy jako aromatický chmel při vaření (Mosher a Trantham, 2017).

Chmelové pryskyřice jsou nejdůležitější složkou chmele. Jejich základními složkami jsou měkké chmelové pryskyřice, mezi které patří specifické  $\alpha$ -hořké kyseliny a  $\beta$ -hořké kyseliny, dále pak nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice.

$\alpha$ -Kyseliny jsou tvořeny směsí sedmi, dosud známých, analogů humulonů – humulon, kohumulon, adhumulon, prehumulon, posthumulon, adhumulon a adprehumulon. Analogy se liší acylovým zbytkem.  $\beta$ -Kyseliny jsou přirozenou směsí pěti a více analogů lupulonů – lupulon, kolupulon, adlupulon, prelupulon a postlupulon (Basařová, 2010).

Tyto kyseliny jsou během vaření izomerovány do více hořké iso- $\alpha$ -kyseliny isohumulon a iso- $\beta$ -kyseliny lupulon (Priest a Campbell, 1996). Po izomeraci jsou odpovědné nejen za intenzitu hořkosti piva, která záleží na vydatnosti a dávce chmelení, ale také jsou odpovědné za charakter hořkosti, který je ovlivněn složením a oxidačními změnami spektra hořkých látek (Basařová, 2010). Chmel se může přidávat v jakékoliv fázi vaření v závislosti na tom, jaký chce mít sládek výsledek (Boulton, 2013).

#### 1.4.4 Kultury pivovarských kvasinek

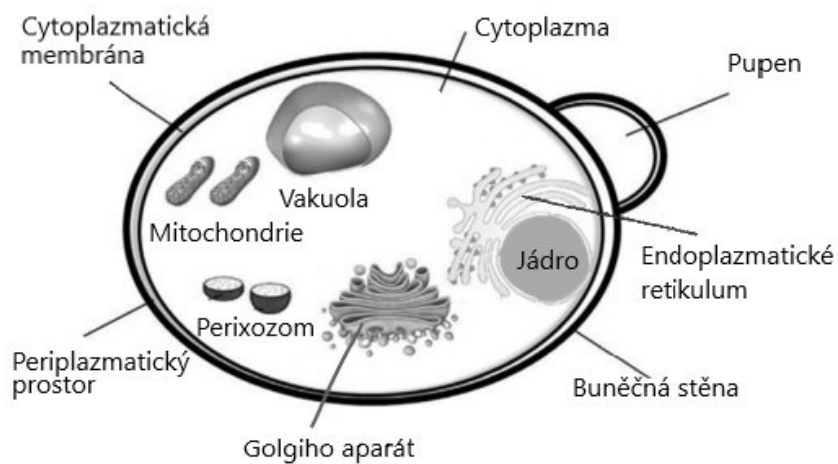
Kvasinky (Obr. 2) jsou jednobuněčné eukaryotické organizmy. Většina kvasinek je rozmnožována nepohlavně mitózou. Kvasinky, které se ale využívají k vaření piva nejvíce, jsou reprodukovány asymetrickým procesem zvaný pučení (Mosher a Trantham, 2017).

Pivovarské kvasnice lze rozdělit do dvou skupin, kvasnice pro výrobu svrchně kvašeného piva a kvasnice pro výrobu spodně kvašeného piva. Kvasnice jsou rozděleny podle místa, kde jsou nejčastěji aktivní (Mosher a Trantham, 2017).

Tradičně jsou to *Saccharomyces cerevisiae* (dále *S. cerevisiae*), které se využívají při výrobě svrchně kvašeného piva (Stewart et al., 2017). Tyto kvasnice se po fermentaci sesbívají odstraněním takzvané kvasnicové hlavy nebo vrchních kvasinek, které se zvedly na povrch aktivní fermentace (Priest a Campbell, 1996). Tyto kvasinky jsou nejvíce aktivní při teplotách 16-21 °C.

Pro spodně kvašená piva se naopak používají nejvíce kvasinky z kmene *Saccharomyces pastorianus* (dále *S. pastorianus*). Tyto kvasinky mohou fermentovat i při vyšších teplotách než *S. cerevisiae* ale naopak zůstávají aktivní při nízkých teplotách až 5 °C (Mosher a Trantham, 2017). Tento druh kvasinek při fermentaci nevytváří kvasnicové hlavy, a proto se musí na konci fermentace posbírat ze dna nádoby (Priest a Campbell, 1996). *S. pastorianus*

byly v minulosti nazývány jako *Saccharomyces uvarum* (dále *S. uvarum*) nebo *Saccharomyces carlsbergensis* (dále *S. carlsbergensis*) (Stewart et al., 2017).

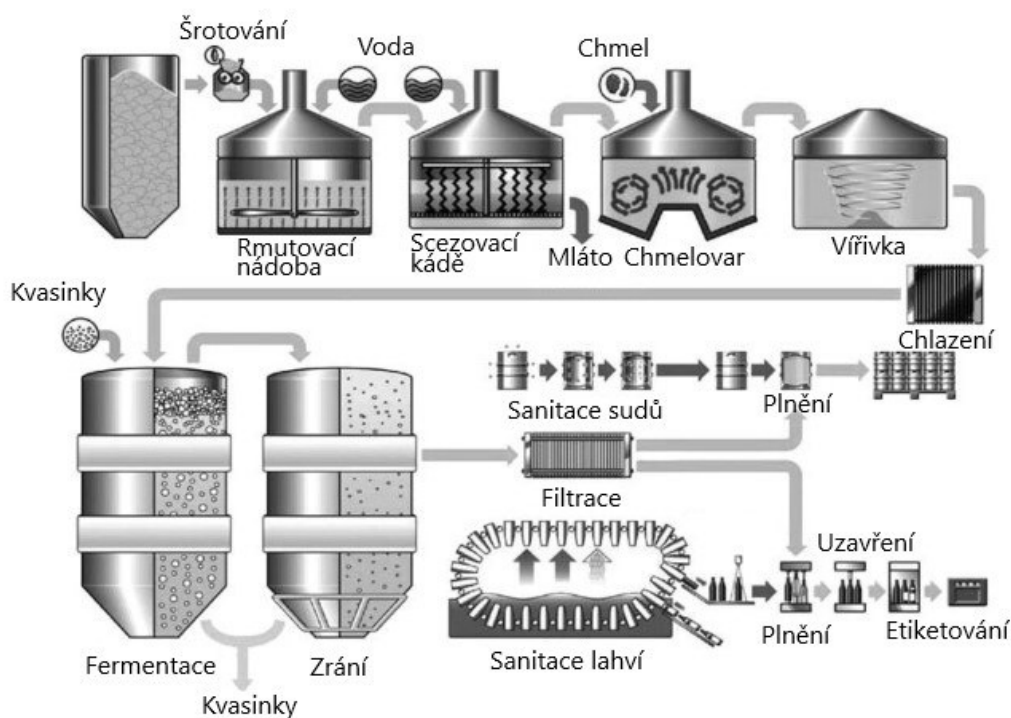


Obr. 2 Schéma buňky kvasinky; přeloženo (Tofalo a Suzzi, 2016)

## 2 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA

Proces výroby piva je velice složitý a zdlouhavý. V průběhu výroby piva se vystřídá několik fází, kde každá z nich má určitou funkci a vliv na konečný výsledek. Začátek tohoto procesu začíná sladováním a výrobou sladu. Následně se připravuje mladina šrotováním (mletím) sladu, vystíráním a zapařováním, rmutováním, scezováním sladiny a chmelovarem. Jedním z posledních kroků je chlazení mladiny, proces fermentace a zrání piva (Basařová, 2010). Na obrázku 3 si můžete prohlédnout základní schéma výroby piva tradičním způsobem.

Spontánní fermentace byla využívána pro tradiční produkci piva, vína a jablečného cideru. Nicméně, využití spontánního kvašení u piva, bylo velice vyjimečné, kvůli nedostatečné kontrole nad procesem kvašení. I přes tuto překážku jsou lambická piva stále produkována právě pomocí spontánní fermentace (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020). Spontánně fermentovaná piva se od klasicky fermentovaných liší tím, že proces fermentace není zahájen přidáním inokula kvasinek nebo bakterií jako startovacích kultur (Spitaels et al., 2014a). Namísto toho mikrobiologický růst začíná přes noční chlazení uvařené mladiny v mělkých otevřených nádobách, které se nazývají chladicí kádě nebo coolshipy (Priest a Campbell, 1996).



Obr. 3 Schéma výroby řízeným způsobem fermentace; přeloženo (Wunderlich a Back, 2009)

## 2.1 Výroba sladiny

Většina pivovarů začíná proces vaření piva v tomto bodě, po nákupu sladového zrna od sladovníka. Sladové zrno se mechanickým procesem rozdrťí, aby se odkryl endosperm plný bílého škrobu. Tento krok se nazývá šrotování (Mosher a Trantham, 2017). Odkrytí endospermu je nutné pro fyzikálně-chemické a enzymové reakce ve varně (Basařová, 2010). Výsledný šrot, rozbité kousky sladu a obalové vrstvy, může být jemný jako prášek nebo pouze mírně rozdrčený, to závisí na požadavcích sládka a nástrojovém vybavení varny (Mosher a Trantham, 2017). Šrot je spolu s vodou smíchán ve vystírací kádi, nebo na rmutovystírací pánvi. Této směsi se říká vystírka. Cílem vystírání je dobře smíchat sladový šrot a varní vodu. Slad obsahuje pouze malý obsah ve vodě rozpustných látek (cukry – sacharóza, maltóza, glukóza a fruktóza, lipidy, polyfenoly). Světla piva se vaří s větším nálevem vody pro získání řidšího rmutu. Naopak pro tmavá piva se vaří s menším nálevem vody pro hustý rmut. Doba vystírání se pohybuje mezi 10 až 30 minut (Basařová, 2010).

Vystírka se následně začne pomalu zahřívat, neboli rmutovat. Cílem rmutování je rozštěpit a převést optimální podíl extraktu do roztoku pro další technologický postup a určit kvalitu piva (Basařová, 2010). Škrobová zrna, která jsou obsažená v rozemletém sladu, začínají pomalu bobtnat a při určité teplotě z nich vzniká škrobový maz. Směs se dále zahřívá, kdy škrobový maz postupně ztekucuje při nižší cukrotvorné teplotě, a pak zcukřuje při vyšší cukrotvorné teplotě (Chládek, 2007).

Existují tři hlavní metody rmutování. Infúzní, dekokční a dvojité rmutování (Stewart et al., 2017). Způsob rmutování ovlivňuje kvalitu mladiny, a jednotlivé postupy se liší teplotami vystírky a rychlostmi vyhřívání (Basařová, 2010). Infúzní způsob představuje jednodušší způsob výroby než dekokční způsob, a to z důvodu toho, že infúzní způsob potřebuje pouze jednu varnou nádobu, zatímco dekokční rmutování potřebuje dvě. V České republice je nejčastější způsob rmutování dekokční, a to na dva rmuty. Infúzní rmutování se pak upřednostňuje v řadě jiných zemí jako je Velká Británie nebo Německo (Chládek, 2007). Dvojité rmutování, známé jako americký systém dvojitého rmutu, se využívá když obilné surogáty, kukuřice, rýže nebo pšenice, vyžadují předvaření před přidáním do sladové kaše (Stewart et al., 2017). U spontánně kvašených piv lambického typu je to poté také dekokční způsob, a to hlavně proto, že dekokční rmutování využívá nižší poměr vody k zrnu a je účinnější k extrakci sacharidů ze zrna (De Roos a De Vuyst, 2018b). Tyto postupy se liší především v tom, jak dlouho působí různé teploty, při kterých jsou optimálně aktivní určité enzymy ve sladu. Kyselinotvorná teplota, která je mezi 35 a 38 °C, zvyšuje aciditu a

podporuje v rozpouštění látek extraktu. Peptonizační teplota, mezi 45 až 50 °C, získáváme zapařováním. Podporuje proteolýzu a štěpení fosforečnanů a neškrobových polysacharidů, to nepřímo podporuje amylolyzu škrobu. Nižší cukrotravná teplota se pohybuje mezi 60 a 65 °C a v roztoku zvyšuje především podíl redukujících cukrů. Vyšší cukrotravná teplota, která se nachází mezi 70 a 75 °C, je naopak důležitá pro optimální působení  $\alpha$ -amylasy (Basařová, 2010).

Po konci rmutování se musí vzniklá směs rozdělit na dvě části. U klasického nálevového rmutu probíhá separace ve stejné nádobě, rmutovací kádi. U jiných systému se rmut převádí do další nádoby, scezovací kádě nebo rmutového filtru. Oba tyto systému urychlují proces separace. Scezovací kád' urychluje rozdělení díky velkému průměru kádě a tím i menší vrstvy zrna. Rmutovací filtr využívá tlak, velkou filtrovací oblast a velmi tenkou vrstvu rmutu pro rychlejší separaci a extrakci (Stewart et al., 2017). Rmut se rozděluje na kapalnou část, sladinu, a na pevnou část, která se nazývá mláto. První část sladiny je kalná, a proto se vrací zpět a proces se opakuje (Chládek, 2007).

## 2.2 Výroba mladiny

Po rmutování nastává vaření. Do sladiny se přidá chmel a povaří se, tím vzniká mladina. Většinou se přidá buďto chmelový granulát nebo granulát v kombinaci s chmelovým extraktem. Proto se tento krok nazývá také „chmelovar“. Chmelovar trvá přibližně 90 minut a to z důvodu převedení hořkých látek z chmele, jejich částečná změna a odstranění nežádoucích těkavých látek z vařící se mladiny (Chládek, 2007). Při chmelovaru probíhá řada různých reakcí, jak fyzikálních, chemických tak i biologických. Výsledek těchto reakcí, které poté nalezneme ve složení mladiny, ovlivňuje další průběh výroby a vlastnosti piva (Basařová, 2010).

Chmelovar má několik funkcí.

První funkcí je **sterilizace**, neboť při přípravě sladiny nejsou nutně žádné kroky, které by zabránili mikrobiálnímu znehodnocení. Po varu sladiny jsou už taková ochranná opatření povinná, v tomto kroku tedy vaření mladiny zajišťuje její sterilitu.

Další funkcí je **denaturace sladu a inaktivace enzymů**. Tato funkce je velice důležitá, neboť kdyby tento krok nenastal, slad a enzymy, které by dále přetrvávali v hotové mladině, by mohli pokračovat ve změnách složení. To by do procesu výroby piva vneslo nekonzistenci.

Dále se během výroby mladiny **koagulují proteiny**, sníží se pH mladiny a odpaří se voda, čím se sníží objem a zvýší se koncentrace mladiny (Boulton, 2013).

V chmelovaru se také **rozpouští a izomerují hořké látky chmele**, které způsobují výslednou hořkost v pivě, také se tvoří produkty Maillardovy reakce, nebo se zvyšuje acidita. Určitý druh chmele a sladu také při chmelovaru určí výslednou barvu produktu (Basařová, 2010).

Po skončení chmelovaru obsahuje mladina hrubé kaly. Tyto kaly jsou vysrážené bílkovinné vločky a další částičky ze sladu a chmele. Odstranění těchto kalů probíhá ve vířivé kádi, kde se vysokou rychlostí načerpá mladina, která se v kádi roztočí. Síly, vyvolané pohybem rotující mladiny, poté vynesou těžší kaly ke středu vířivé kádě, kde se ukládají ve formě kuželu (Mosher a Trantham, 2017). Kromě vířivé kádi lze kaly odstranit také sedimentací, odstředováním či filtrací.

Mladina se odčerpá do vybraného chladiče, v tomto okamžiku má teplotu okolo 95 °C, a musí se zchladit na teplotu 6 °C. Pro chlazení se výhradně využívají uzavřené jedno- a dvoustupňové chladiče. Jedná se o deskové nerezové zařízení, které je tvořené soustavou desek, mezi nimi střídavě proudí chlazená mladina a chladící médium. Jako chladící médium se nejčastěji používá voda (Chládek, 2007).

## 2.3 Fermentace

Fermentace piva poukazuje na část výroby, ve kterém je mladina přeměňována v mladé pivo. Tento proces probíhá díky kvasinkám; obvykle čisté kultury vybraného kmene. Taxonomicky kvasinky patří k houbám. Podle European Brewery Convention jsou pivovarské kvasinky definovány jako kulturní kvasinky k produkci spodně nebo svrchně kvašených piv. Díky této široké definici lze mezi tyto kvasinky zahrnout i ty méně používané, potřebné k výrobě speciálních piv (Basařová, 2010). Někdy se místo čistých kultur může využít směs dvou nebo více druhů kmene kvasinek nebo velmi vzácně směs kvasinek a bakterií. Krásou fermentace je řízení růstu kvasinek a metabolismu těchto organismů. Během fermentace kvasinky rostou díky živin, které se nachází v mladině (Boulton, 2013). Kvasinky využívají cukry a další živiny na produkci ethanolu, oxidu uhličitého CO<sub>2</sub>, nových kvasinek a velkého množství chutí (Stewart et al., 2017; Cuvas-Limon et al., 2021). Tato reakce byla popsáno poprvé Gay-Lussacovou rovnicí, která uvádí, že z každé molekuly zfermentované glukózy se vytvoří dvě molekuly ethanolu a dvě molekuly CO<sub>2</sub> (Boulton, 2013).

Ve skutečnosti je to ale tak, že za aerobních podmínek kvasinky metabolizují glukózu na dvě molekuly pyruvátu. Tento proces je popsán Embden-Meyerhof-Parnasovou dráhou

neboli glykolýzou, a poté, prostřednictvím Krebsova cyklu a oxidační fosforylace vzniká oxid uhličitý CO<sub>2</sub> a voda s velkou energetickou hodnotou (Stewart et al., 2017).

Existují různé faktory, které ovlivňují průběh hlavního kvašení, mezi ty rozhodující určitě patří složení mladiny a její koncentrace, vlastnosti použitého kmene kvasinek a jeho vitalita a viabilita. Teplotní průběh kvašení a regulace teploty, doba kvašení, stupeň provzdušnění mladiny a kvasnic. Dávka kvasnic a způsob zakvašování je další důležitý faktor, který ovlivní výsledek (Basařová, 2010). Tyto parametry lze jednoznačně lépe ovlivnit při výrobě piva fermentovaného řízenou fermentací.

### **2.3.1 Řízená fermentace**

Mezi řízenou fermentaci řadíme dva druhy způsobu kvašení, a to svrchní kvašení a spodní kvašení piva.

Spodní kvašení piva probíhá díky přidaným kulturám *Saccharomyces pastorianus*, pro produkci piva typu lager neboli ležák (De Roos a De Vuyst, 2018b). Produkce tohoto typu piva sahá do 90 % celkové produkce všech druhů piva po celém světě. Tato kvasinka je exkluzivní pro výrobu spodně kvašených piv (Dufour et al., 2013).

Svrchně kvašená piva využívají při fermentaci jako startérovou kulturu kmene kvasinky *S. cerevisiae* (De Roos a De Vuyst, 2018b; Cuvás-Limon et al., 2021).

Hlavními rozdíly mezi svrchními a spodními kvasinkami patří složení genetického materiálu, rozdílné složení buněčných stěn či růst na jiných specifických půdách (Basařová, 2010).

### **2.3.2 Spontánní fermentace**

Spontánní kvašení piva je méně časté. Nejznámější druh piva využívající tento druh kvašení jsou kyselé Ale piva, lambická piva, která pochází z Belgie, a jejich méně známí potomci „chladná piva“ pocházející z Ameriky (Petruzzi et al., 2015). Sice jsou si tyto druhy piva velice málo podobné, ale mají jeden faktor, který je sjednocuje. A to ten, že všech chybí jakékoliv přidání startérových kultur (Bokulich a Bamforth, 2013).

Tento druh piva se tradičně získává inokulací mladiny vzduchem v otevřených chladicích nádobách (De Roos a De Vuyst, 2018b), ve kterých se můžou nacházet zbytky pivovarnických kvasnic z předchozího naplnění mladinou. A také inokulací bakteriemi, které se v nich objevují v průběhu noční expozice (Bokulich a Bamforth, 2013; Petruzzi et al., 2015).

Do spontánní fermentace také nesmíme zapomenout zařadit ovocná piva, kde může probíhat spontánní ovocná fermentace. Ta probíhá díky přidání celých ovocných plodů do fermentujících lambiků v dřevěných sudech. Cukr, který se v ovoci nachází, poté spustí sekundární spontánní fermentaci (Daenen et al., 2008). Nejčastější mikroorganismy, které pocházejí z ovoce a napomáhají kvašení, jsou kvasinky z rodu *Brettanomyces* (De Roos a De Vuyst, 2018b).

## **2.4 Zrání**

Zrání mladého piva je velice důležitým krokem pro produkci stabilního a kvalitního produktu. Tento krok se také někdy nazývá kondicionování nebo dokvašování. Mladé pivo je nazýváno také jako zelené pivo, protože má často aromatický charakter zelených jablek díky obsahu acetaldehydu (Stewart et al., 2017). Cílem tohoto kroku je pomalé zkvašování sacharidů při nízkých teplotách (Basařová, 2010). Kromě acetaldehydu, toto zelené pivo obsahuje také diacetyl a další nežádoucí vedlejší produkty fermentace, které musí být odstraněny. I když jsou tyto vedlejší produkty obsaženy jen ve velice malých množstvích, dokáží mít veliký vliv na chuť a aroma piva. V ležáckých tancích, kde je pivo po hlavní fermentaci přečerpáno, může docházet k sekundární fermentaci (Priest a Campbell, 1996). Při tradičním postupu pivo zraje v ležáckých nádobách, ve sklepích nebo v chlazených budovách tak, aby byla zajištěna stálá nízká teplota. V moderních postupech se využívají velkoobjemové izolované nádoby jako Uni-tanky, Asahi-tanky či cylindrokónické tanky. Pro svrchně kvašená piva je také specifické zrání piva v lahvích (Basařová, 2010).

Proces zrání mladého piva trvá v závislosti na druhu piva. U ležáků to může být až více než 6 měsíců, u svrchně kvašených piv pak minimálně měsíc. To vše v závislosti na celkovém obsahu alkoholu. Rozdíl, v době zrání, je z důvodu teplot, při kterých kvasnice pracují (Mosher a Trantham, 2017).

## **2.5 Finální úpravy piva**

Mezi finální úpravy piva patří filtrace a pasterace. Poté jsou dalšími kroky jenom stáčení a expedice.

### **2.5.1 Filtrace**

Filtrace má velice významné místo ve výrobě piva a v nynější době je obvyklé filtrovat pivo do úplné čirosti (Priest a Campbell, 1996). Velikou část tvoří scezování na scezovací



nádobě či filtrace sladiny. Filtrování mladiny již není tak časté, více se filtrace používá při zahušťování kvasnic a zpětné separaci piva z nich (Basařová, 2010).

Když se podíváme na techniky využívané v posledních letech, všimneme si, že se v pivovarnictví ve větší míře uplatňuje membránová technika. A to proto, že při tomto způsobu filtrace lze přesně vymežit velikost pórů, které zajistí odstranění specifických látek díky rozdílné velikosti molekul. Filtrační materiály lze rozdělit do tří základních skupin, na vláknité, zrnité a práškovité, a nakonec na pórovité (Rögener, 2021).

Mezi vláknité filtrační materiály patří pivovarská hmota, což je vláknitý materiál; dnes je již málo používaný. Tato hmota je vyrobená z bavlněného linteru a má dlouhou životnost. Jelikož je vyráběná z textilních odpadů, musí se nejdříve vyčistit a vybělit. (Basařová, 2010). Mezi tento druh materiálů patří i syntetické tkaniny, ale ani ty se již moc nevyužívají. Tyto materiály jsou také více náročnější na likvidaci, což může být jeden z důvodů, proč dnes již nejsou tak populární (Slabý, Štěrbá a Olšovská, 2018).

Mezi práškovité filtrační materiály můžeme zařadit křemelinu. V současnosti je křemelina nejrozšířenější filtrační materiál. Před použitím musí projít úpravou, a to buďto kalcinací nebo mokrou cestou. Kalcinace probíhá buďto za vysokých teplot, když křemelina obsahuje nižší obsah železa, nebo při nižších teplotách, když se jedná o křemelinu z kvalitních ložisek. Úprava mokrou cestou je používaná pro křemeliny s vysokým obsahem železa. Je jak finančně, tak i časově více náročná (Slabý, Štěrbá a Olšovská, 2018). Výhodou křemeliny je její inertnost vůči pivu a vysoká pórovitost, nevýhodou je pak její jednorázové použití, které se může projevit na nákladech pro likvidaci. Mezi další práškové materiály patří perlit, aktivní uhlí či silikagely (Basařová, 2010). Perlit je produkt vyrobený z křemičitanů, výhodou perlitu je vyšší průtočnost a prostupnost než u křemeliny, nevýhodou jsou ale nižší filtrační schopnosti, a nižší ostrost filtrace (Slabý, Štěrbá a Olšovská, 2018).

Pórovité materiály jsou ty membrány, které jsou vyráběné z plastu, kovu či keramiky (Basařová, 2010).

## **2.5.2 Pasterace**

Cílem pasterace je zajištění biologické trvanlivosti piva. Pasterace je tepelná inaktivace mikroorganismů, které by mohly zkazit pivo. Sterilizace je naopak teplem inaktivace všech mikroorganismů.

Využívají se dva typy pasterace. A to buďto tunelová nebo průtoková.

Při vstupu láhví do tunelového pasteru se prohřívá obal a od něj i pivo. V pasteru se řady uzavřených obalů pohybují až 60 minut vpřed. Teplota se postupně zvyšuje a opět snižuje pomocí sprchování vodou. Používá se pasterační teplota 60 až 62 °C a výdrž 15 až 20 minut.

Jako průtokový paster se nejčastěji využívá deskový tepelný výměník. K ohřevu na pasterační teplotu 72 °C se využívá sekce vyhřívána párou či horkou vodou. Deskový výměník má několik sekcí a samotná pasterace trvá pouze 30 až 40 sekund a po ní následuje chlazení (Basařová, 2010).

## 2.6 Specifika ve výrobě lambického typu piva

První fáze procesu výroby lambiků jsou podobné výrobě piva typu Lager nebo Ale, i když se vyskytují určité rozdíly, které hrají zásadní roli v dalším průběhu výroby (De Roos a De Vuyst, 2018b). Tyto rozdíly jsou graficky znázorněny na obrázku 4.

Velký rozdíl spočívá v tom, že v průběhu rmutování je sladový ječmen smíchán s minimem 35 % nesladované pšenice. Někde lze najít, že správné množství nesladové pšenice je až 40 % (Van Oevelen, De L'Escaille a Verachtert, 1976). Přidání této pšenice, která má nízký obsah endogenních enzymů, vede k vysokým koncentracím maltodextridů ve sladince. Občas je pšenice nahrazena kukuřicí nebo rýží, poté je ale výsledné pivo v nižší kvalitě (Guinard, 1990), neboť ztratí svoje organoleptické vlastnosti; za to ale dozrává rychleji (Van Oevelen, De L'Escaille a Verachtert, 1976). To hraje roli v dlouhověkosti procesu fermentace a zrání lambického piva. Vysoce dextrinní sladina také pomáhá při umožnění růstu a přežití druhů *Brettanomyces* během zrání (De Roos a De Vuyst, 2018b). V procesu rmutování se rozhoduje na typu lambického piva, které bude výsledným produktem (Guinard, 1990).

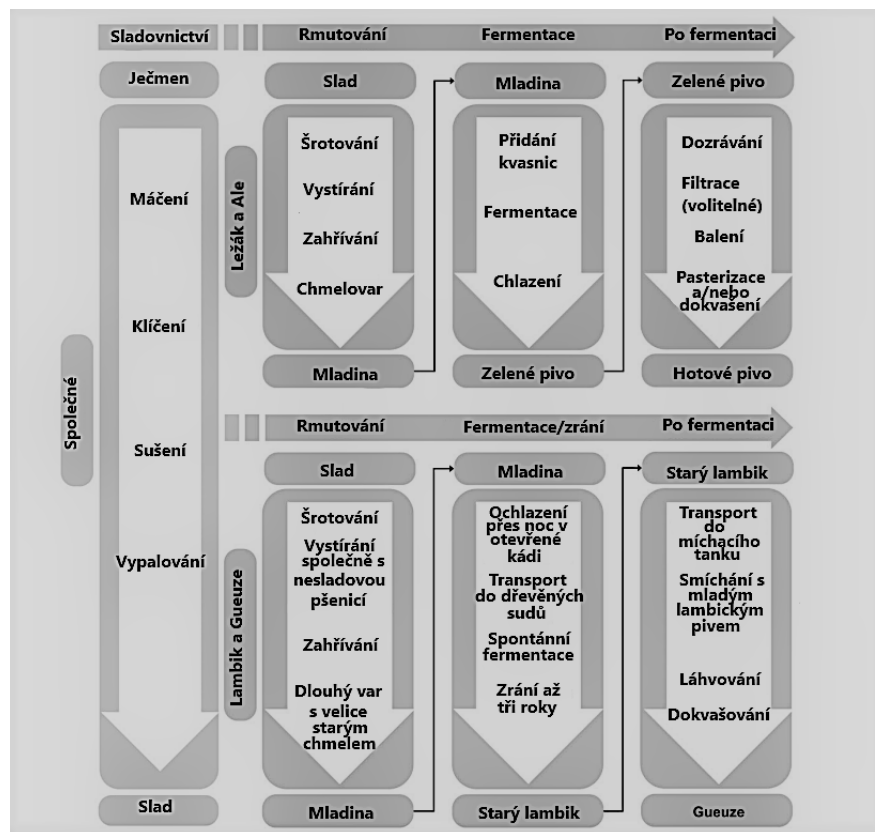
Po rmutování se sladina přečerpá do měděného kotle, který je vybaven pro intenzivní a rovnoměrný var, při kterém vzniká mladina (Guinard, 1990). Na začátku varu se přidávají typicky velice staré, celé chmelové šiščice, které obsahují méně hořkých látek než čerstvý chmel, čímž se zabrání narušení koláčového charakteru piva. Důležitější je ale přítomnost humulinových kyselin, méně hořkých derivátů iso- $\alpha$ -kyselin, vznikajících izomerizačními reakcemi, které probíhají během skladování a stárnutí chmele. Tyto kyseliny jsou vysoce inhibiční vůči bakteriím, a díky tomu zajišťují zvýšenou mikrobiologickou stabilitu piva, která je u spontánně kvašených piv velice důležitá. Použití starých chmelových zvonů vyžaduje dlouhou dobu vaření, přibližně tři až pět hodin, a to z důvodu vysokého obsahu oxidovaných pryskyřic, které jinak mohou způsobovat nežádoucí příchutě. (De Roos a De Vuyst, 2018b) Vyšší obsah pryskyřic také zaručuje inhibici množení bakterií odpovědných

za kažení. Tato konzervace potřebuje docela velké množství chmele, proto se při vaření lambického piva využívá chmel, nejméně tři roky starý, který zaručí, že pivo nebude zhořklé (Keersmaecker, 1996).

Poté, co je mladina uvařená, je přesunutá do otevřených chladících nádob, kde přes noc chladne. Jelikož je nádoba otevřená, umožňuje tak inokulaci okolních mikroorganismů do mladiny (De Roos a De Vuyst, 2018b). Vystavení mladiny mikroflóre okolnímu vzduchu se nazývá *pitching* (Keersmaecker, 1996). Tato část procesu je velice důležitá, a pro pivovar je důležité nechat lokální mikroflóru nezměněnou. Proto se některé Bruselské pivovary namísto rekonstrukce celé střechy od začátku, pod kterou jsou chladící kádě umístěné, rozhodli střechu jenom opravit a nechat původní konstrukci hostící důležité mikroorganismy (Guinard, 1990).

V chladících nádobách pak mladina chladne, pouze přes jednu noc, na 20 °C. Kvůli tomu, tradiční pivovary mohou vařit tento druh piva pouze v určité, chladné zimní měsíce, kde sezóna začíná v říjnu a končí v březnu. V moderních, plně zajištěných, pivovarech, které mají možnost schladit mladinu předtím, než je přesunuta do chladící nádob, se tento druh piva může vařit celoročně (De Roos a De Vuyst, 2018b).

Po noci chlazení je obsah chladící kádě přesunut do dřevěných sudů, většinou z dubu nebo kaštanu, kde probíhá hlavní fermentační proces a proces zrání piva (Guinard, 1990).



Obr. 4 Základní schéma výroby klasických druhů piva a lambického druhu piva;  
přeloženo (De Roos a De Vuyst, 2018b)

### 2.6.1 Využití dřevěných sudů ve fermentačním procesu spontánně kvašených piv

Nejčastěji využívané dřevěné sudy jsou vyrobené z dubového nebo kaštanového dřeva (Keersmaecker, 1996). Sudy nejsou nové, často se stává, že předtím v sobě držely víno, whiskey nebo cidery (De Roos a De Vuyst, 2018b). Před naplněním musí pivovar oškrábat a vyčistit vnitřní část sudu a spálit sírový knot, aby tím odstranil nežádoucí plísně. I tak ve vláknách dřeva zůstávají živé kvasinkové kmeny a spóry, které následně pomohou nastartovat fermentaci (Guinard, 1990). Je to například *Dekkera bruxellensis*, která může vniknout až do 8 mm povrchu, nebo bakterie mléčného kvašení *Pediococcus damnosus* (dále *P. damnosus*). Samozřejmě se vyskytují i jiné bakterie mléčného kvašení (dále jako BMK). Pokud je sud z vinného průmyslu, mohou se na povrchu vyskytovat bakterie z rodu *Lactobacillus* odolné vůči ethanolu jako je například *Lactobacillus fructivorans*, anebo *Lactobacillus hilgardii* (De Roos et al., 2019).

Dřevěné sudy mají důležitou roli při zrání piva, a to především díky umožnění vstupu malých množství kyslíku do fermentované kapaliny (De Roos a De Vuyst, 2018b). Díky pomalému a omezenému kontaktu tento proces iniciuje žádané změny při zrání a rozvinutí

mikroflóry. Voda a ethanol také mohou pomalu „utíkat“ ze sudů ven. V závislosti na vlhkosti ve sklepě, lambik, který takto vzniká, může být více koncentrovaný v alkoholu (Guinard, 1990).

Ve vláknech dřeva také zůstávají po předchozích várkách jiného druhu alkoholu typické sloučeniny jako fenoly a taniny, které se po dobu fermentace uvolní do lambiku (De Roos a De Vuyst, 2018b).

### 3 SKUPINY MIKROORGANIZMŮ VE SPONTÁNNĚ KVAŠENÝCH PIVECH

Proces výroby spontánně kvašených pív byl popsán jako sled čtyř fází, založen na mikrobiologické aktivitě závislé na přítomné mikroflóře (De Roos a De Vuyst, 2018b). V každé fázi se nachází mikroorganismus přispívající klíčovými složkami k chuti a vůni konečného produktu (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020).

Fermentace lambických druhů pív začíná rychlým růstem enterobakteriální a divokou kvasinkovou fází, kde povětšinou se jako divoká kvasinka vyskytuje *Hanseniastora uvarum* (dále *H. uvarum*), dříve nazývaná *Kloeckera apiculata*; tyto kvasinky zcela odemřou po 30 až 40 dnech (Dupour, Verstrepen a Derdelinckx, 2003; De Roos a De Vuyst, 2018b). Druhá, alkoholická, a hlavní fáze obsahující především *S. cerevisiae* a/nebo *S. pastorianus*. Třetí, okyselující, fáze obsahuje *P. damnosus* a/nebo *Lactobacillus brevis* (dále *L. brevis*), společně s *Acetobacter pastorianus* a *Gluconobacter cerevisiae*. Poslední, zrací fáze, kde převládá v mikroflóře především *P. damnosus* a *Brettanomyces bruxellensis* (dále *B. bruxellensis*) (De Roos a De Vuyst, 2018b; Petruzzi et al., 2015).

V prvních dvou fázích probíhá syntéza vyšších alkoholů jako je propanol, amyl alkohol, isobutanol a dalších, a také syntézou etanolu. Enterobakterie produkují velké množství kyseliny octové. Díky syntéze etanolu, a vzniku kyseliny octové, se také produkuje ester etyl acetát, kde jeho produkce pokračuje i v dalších fázích. Jsou zde tvořené i mastné kyseliny a jejich estery – kyseliny kaprinové a kaprylové – a to díky přítomnosti kvasinek *Saccharomyces* a *Kloeckera*.

V následujících fázích probíhá snížení pH kvůli přeměně cukrů na kyselinu mléčnou pomocí pediokoků. Také se zvyšuje koncentrace kyseliny kaprinové a kaprylové, společně s koncentrací kyseliny laurové, a to díky přítomnosti *Brettanomyces* v pozdější fázi fermentace (Guinard, 1990).

Bakterie mléčného a octového kvašení spolu s *Enterobacteriaceae* jsou považovány za bakterie spojené s kažením piva (Dysvik et al., 2020).

#### 3.1 První fáze fermentace u lambických pív

V první fázi, trávající jeden až dva měsíce, dominují enterobakterie a divoké oxidující kvasinky, s přítomností bakterií octového kvašení (De Roos et al., 2020). Samotný proces fermentace začíná tři až sedm dní po ochlazení mladiny (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020). Bakterie, jako *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* a *Hafnia alvei*, se izolují nejčastěji,

společně s kvasinkou *H. uvarum* a *Naumovia dairensis*, stejně jako *Saccharomyces uvarum* či *Saccharomyces bayanus* (tyto dva druhy byly dlouho považovány za identické) (Spitaels et al., 2014a). *Enterobacteriaceae* a *H. uvarum* jsou velice rychle rostoucí mikroorganismy, které způsobují, společně s bakteriemi octového kvašení, pokles pH mladiny z 5,1 na 4,6, vyčerpání monosacharidů a kyslíku, produkci několika organických kyselin a hlavně zvýšení koncentrace etanolu a oxidu uhličitého. Tento pokles je z důvodu produkce kyseliny octové a kyseliny mléčné. (Bongaester et al., 2021; Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020).

### 3.1.1 Enterobakterie

Enterobakterie jsou fakultativně anaerobní, gram negativní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae* (Limeres Posse, Diz Dios a Scully, 2017), které nevytvářejí spory, jsou acidorezistentní a oxidáza negativní (Singh a Anand, 2022). Enterobakterie mají nízké nároky na živiny, metabolizují sacharidy pomocí Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy a provádí smíšenou fermentaci, která vede k produkci kyseliny mléčné, octové, jantarové a mravenčí, a také ethanolu. (De Roos a De Vuyst, 2018b). Do čeledě *Enterobacteriaceae* patří velice známé bakterie jako *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersenia pestis* (Limeres Posse, Diz Dios a Scully, 2017).

Enterobakterie mají dva hlavní druhy fermentace. Smíšená kyselá fermentace, kde vzniká acetát z pyruvátu přes acetyl-koenzym A, a butandiolová fermentace, která produkuje butandiol jako hlavní produkt fermentace (Singh a Anand, 2022).

Některé enterobakterie mohou být spojeny s produkcí látek dodávajících nepříliš žádoucí pachy pivu, jako například diacetyl, dimethyl sulfid, acetaldehyd, aceton nebo kyselina mléčná (De Roos a De Vuyst, 2018b).

Optimální teplota růstu pro *Enterobacteriaceae* je v rozmezí 25 a 37 °C. Z důvodu, že tyto mikroorganismy rostou během počáteční fáze, produkují určité mastné kyseliny s dlouhými řetězci, a tím napomáhají tvorbě jedinečného profilu chuti lambického piva (De Roos a De Vuyst, 2018b). Enterobakterie jsou také chemoautotrofní a kromě fermentačního metabolismu mají i respirační (Singh a Anand, 2022).

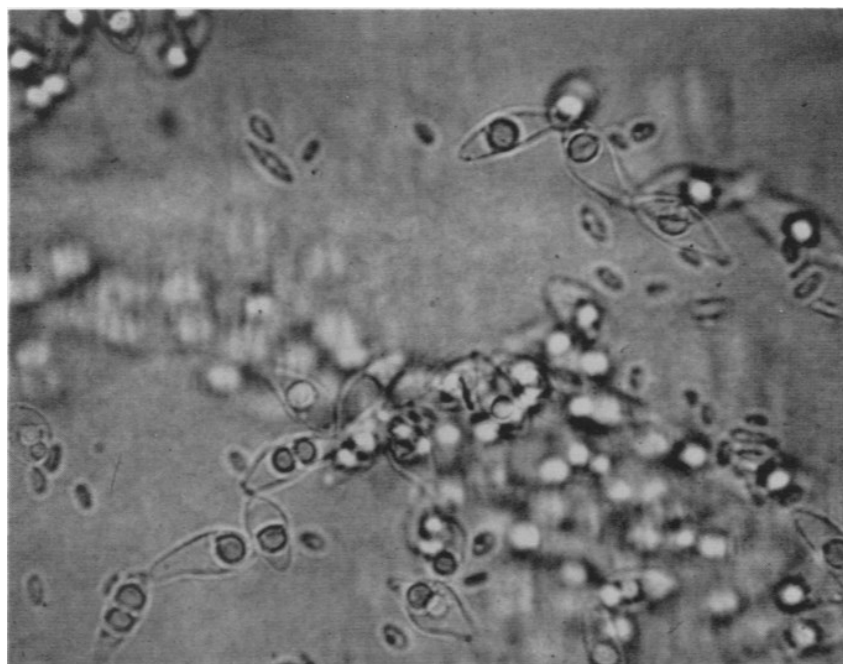
*Enterobacteriaceae* obvykle vymizí po 30 až 40 dnech fermentace (Keersmaecker, 1996). To z důvodu zvyšování ethanolové koncentrace, snižování pH a vypotřebování potřebných monosacharidů (De Roos a De Vuyst, 2018b).

Druhy *Enterobacteriaceae*, které jsou přítomné, jsou variabilní, pravděpodobně v závislosti na pivovaru (Martens, Dawoud a Verachtert, 1991). Proto by nemělo být překvapením, že American Coolship Ale se v rozmanitosti enterobakterií liší od tradičních

lambických piv vyráběných v Belgii. U Belgických, tradičních, druhů piva to povětšinou bývají druhy jako *Enterobacter* spp. (De Roos a De Vuyst, 2018b).

### 3.1.2 Kvasinky

Společně s růstem enterobakterií se v této fázi objevuje i růst nefermentativních kvasinek. Druh kvasinek, které se zde můžeme nejčastěji nalézt jsou neoxidační, crabtree pozitivní *Saccharomyces bayanus* (dále *S. bayanus*) (dříve nazýván *Saccharomyces globosus*) a oxidativní, crabtree negativní *H. uvarum* (Obr. 5) (De Roos a De Vuyst, 2018b). Kromě těchto dvou druhů kvasinek, lze někdy nalézt v této fázi taky jiné druhy kvasinek, jako například *Pichia fermentans*, *Kazachstania bulderi* a *Kazachstania exigua* (Bongaerts et al., 2021). Tyto kvasinky, společně s enterobakteriemi, vymizí po konci této fázi z důvodu vyčerpání monosacharidů, akumulace etanolu a snížení pH (De Roos a De Vuyst, 2018b). *H. uvarum* velice rychle dosáhne své maximální koncentraci v průběhu prvního týdnu fermentace. *H. uvarum* má schopnost fermentace glukózy, ale neumí fermentovat maltózu nebo více složité sacharidy (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020). V některých studiích bylo zjištěno, že ne vždy se *H. uvarum* při fermentaci spontánně kvašených piv objevuje. Proto se došlo k závěru, že *H. uvarum* není potřebná při výrobě spontánně kvašených piv, ale spíše se vyhledává při výrobě vína či ciderů, kde má *H. uvarum* důležitou roli při tvorbě chuti (Spitaels et al., 2015b).



Obr. 5 *Hanseniaspora uvarum* (Rij a Ahearn, 1968)



### 3.1.3 Bakterie octového kvašení

V první fázi fermentace se také nacházejí bakterie octového kvašení (dále jako BOK), nejčastěji je to buďto *Acetobacter* nebo *Gluconobacter*. Tyto bakterie mohou v první fázi růst především díky vysoké koncentraci kyslíku v okolí. Po několika týdnech ale obvykle odumřou, a to z důvodu kvasinek rostoucí v druhé fázi, které produkují oxid uhličitý za pomoci přítomného kyslíku (Bongaerst et al., 2021).

Bakterie z rodu *Acetobacter* jsou všechny bakterie octového kvašení díky své schopnosti oxidace etanolu na kyselinu octovou nebo na oxid uhličitý. Jejich schopnost růst ve fermentovaných potravinách nebo nápojích závisí na dobrých podmínkách pro tyto bakterie. Kvůli svému růstu jsou považovány za nežádoucí bakterie, neboť vedou ke zkažení alkoholových piv, vín nebo ciderů. V tomto případě jsou ale prospěšné, stejně jako při výrobě octa, fermentovaného kakaa nebo kombuchu. (Spitaels et al., 2014b).

V této fázi se nejčastěji vyskytuje *Acetobacter orientalis*, v dalších fázích se mohou nacházet ještě jiné bakterie rodu *Acetobacter* (De Roos a De Vuyst, 2018b).

Bakterie z rodu *Gluconobacter* dokáží oxidovat glukózu na kyselinu glukonovou spíše, než etanol na kyselinu octovou, tím se nejvíce liší od ostatních bakterií octového kvašení. Bakterie z tohoto rodu dokáží růst ve vysoce koncentrovaných cukerných roztocích a nízkých pH. (Tyakht et al., 2021). V první fázi se vyskytuje z rodu *Gluconobacter* pouze *Gluconobacter cerevisiae*, což jsou gram negativní nepohyblivé bakterie tyčinkovitého tvaru, které se objevují buďto samostatně nebo v párech. Vykazují se katalázovou aktivitou (Spitaels et al., 2014c).

## 3.2 Druhá fáze fermentace u lambických piv

Druhá, nebo také hlavní, fáze fermentace začíná po 3 až 4 týdnech od začátku fermentace (Spitaels et al., 2014a) a trvá mezi 1 až 4 měsíci (De Roos, Vandamme a De Vuyst, 2018). Nejčastější rody kvasinek přítomné v druhé fázi fermentace jsou *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* a *S. kudriavzevii*. S tím, že *S. pastorianus* (dříve nazývaná *S. monacensis* (Stewart, 1999)) a *S. kudriavzevii* jsou více přítomné ke konci druhé fáze (Bongaerts et al., 2021). Tyto kvasinky degradují v průběhu prvních měsíců fermentace většinu sacharidů v mladině (De Roos a De Vuyst, 2018b) na etanol a oxid uhličitý (De Roos, Vandamme a De Vuyst, 2018). V této fázi vzniká veškerý ethanol, který bude přítomný v hotovém výrobku (Keersmaecker, 1996).

Kromě výroby etanolu je s touto fází, a s tímto kvasinkovým metabolismem, spojena biosyntéza vyšších alkoholů a specifických esterů. Biosyntéza probíhá buďto katabolicky, přeměnou aminokyselin Ehrlichovou cestou, nebo anabolicky za vzniku vyšších alkoholů (De Roos a De Vuyst, 2018b).

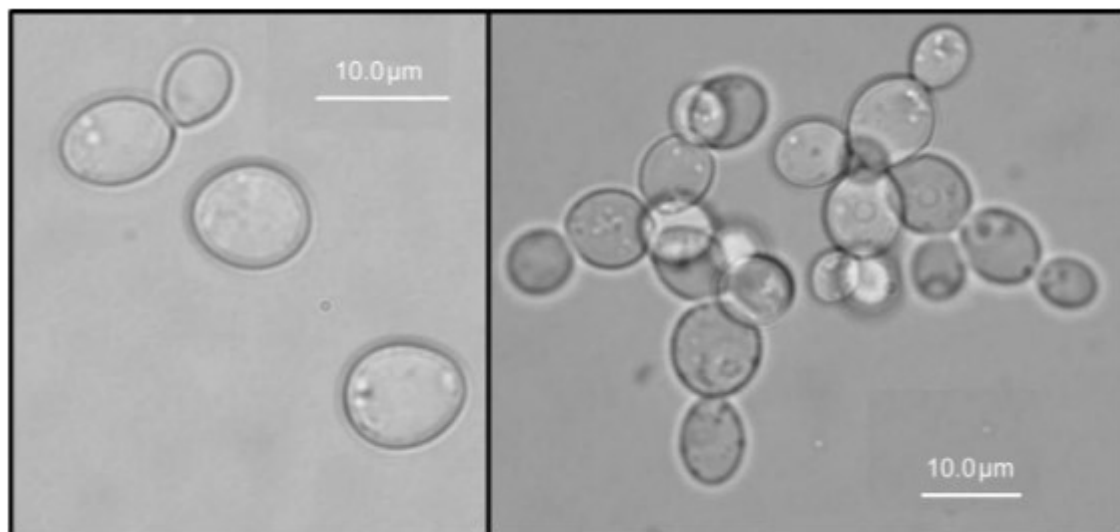
Na kmeni kvasinek přítomných při fermentaci také závisí výsledná chuť a vůně (Stewart, 1999). Dále také některé druhy *Saccharomyces* produkují specifické vzorce mastných kyselin, zejména kyselinu kaprylovou a kyselinu kaprinovou, a také estery, v průběhu prvních měsíců fermentace (De Roos a De Vuyst, 2018b). To přispívá k chuti a vůni piva (Keersmaecker, 1996).

### 3.2.1 Kvasinky

*Saccharomyces* jsou jednobuněčné, fakultativně anaerobní, eukaryotické mikroorganismy, řadí se do skupiny hub. Optimální teplota růstu pro tyto kvasinky je mezi 20 a 35 °C. Jsou pozitivní na Crabtree efekt (De Roos a De Vuyst, 2018b). Schopnost fermentovat cukry na etanol je základní funkcí kvasinek. Crabtree pozitivní kvasinky mohou cukry kvasit i za přítomnosti kyslíku (Pfeiffer & Morley, 2014). Kmen kvasinek *S. cerevisiae* má schopnost pojmout velkou řadu různých cukrů jako je glukóza, fruktóza, mannóza, galaktóza, maltróza a další (Stewart, 1999).

*S. cerevisiae* dominuje ve fermentačním procesu díky vysoké fermentativní kapacitě a schopnosti tolerovat specifické podmínky, jako vysoký osmotický tlak, nízké pH, vysoká koncentrace etanolu, či málo živin. Tyto schopnosti stály za tím, že *S. cerevisiae* a jeho specifické kmeny byly zkulturnovány, a dnes se používají v řízeném fermentačním procesu. Celkem bylo zatím nalezeno 20 různých kmenů *S. cerevisiae* z toho 13 z nich jsou nedomestikované nebo divoké kvasinky (Molinet a Cubillos, 2020).

Ke konci této fáze se začíná objevovat jiný rod kvasinek, a to *S. pastorianus* (Obr.6). To poukazuje na obvykle nízké teploty v průběhu chladných měsíců, *S. cerevisiae* rádo roste při teplotách 37 °C a vyšších, zatímco rod *S. pastorianus* roste při teplotách 34 °C a nižších (Dufour et al., 2013). Zatímco *S. cerevisiae* jsou často klasifikovány jako kvasinky svrchně kvašeného piva, kvasinky *S. pastorianus* se klasifikují jako kvasinky spodně kvašeného piva (Boulton., 2013). Kromě *S. pastorianus* se také objevuje rod *S. kudriavzevii*, tento rod dokáže využít maltooligosacharidy v průběhu růstu a tím získává nad *S. cerevisiae* velikou převahu v dalším průběhu fermentace (Bongaerts et al., 2021).



Obr. 6 *Saccharomyces pastorianus* (Hutzler et al., 2015)

### 3.3 Třetí fáze fermentace u lambických piv

Třetí fáze, neboli okyselovací fáze (Spitaels et al., 2014a), často přesahuje i do fáze předchozí (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020). Začíná 3-4 měsíce po začátku fermentace a je charakterizováno množstvím bakterií octového a mléčného kvašení, které hned ze začátku snižují pH pod hodnotu 3,5 a to díky produkci organických kyselin s kyselinou octovou a s kyselinou mléčnou v největší koncentraci (Bongaerts et al., 2021). Tato fáze je velice dlouhá a dosahuje vrcholu po 6 až 8 měsících (Keersmaecker, 1996), může ale trvat až 10 měsíců (De Roos a De Vuyst, 2018b). Tyto bakterie potřebují větší teplo pro růst, a proto není divu, že okyselovací fáze nastává většinou na začátku léta (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020).

BMK, jako jsou *Lactobacillus* a *Pediococcus*, jsou zodpovědné za více než 70 % kažení piva způsobené mikroorganizmy (Garcia-Garcia et al., 2017). V tomto případě BMK spolu s BOK charakterizují třetí fázi fermentace lambických piv tradičním procesem. To je činí nepostradatelnými, jelikož kyselost je hlavním charakteristickým prvkem tohoto typu piva (De Roos a De Vuyst, 2018b).

Kyselina mléčná je produkována ze sacharidů pomocí Embden-Meyerhof-Parnasovy cesty díky homofermentativním rodům BMK, a pomocí 6-fosfoglukanátové dráhy díky heterofermentativním rodům BMK. Heterofermentativní bakterie také dokáží produkovat kyselinu octovou, v tomto případě je kyselina octová tvořena oxidací etanolu díky BOK. Koncentrace kyseliny octové je nízká kvůli nízkému obsahu kyslíku potřebného k jeho tvorbě. Avšak některé rody BOK jsou schopné přežít i v podmínkách s nízkým obsahem

kyselíku, díky jejich schopnosti rozštěpení maltooligosacharidů a využití kyseliny mléčné jako zdroje uhlíku (Bangaerts et al., 2021). BOK jsou často rozpoznatelné díky produkci octu, vitamínu C a celulózy a v produkci alkoholických nápojů jsou často problematické (Dysvik et al., 2020).

Podíl koncentrace kyseliny mléčné ke kyselině octové je určujícím faktorem pro výslednou chuť a aroma. Kyselina mléčná má za vznik čerstvou lehkou kyselost, zatímco kyselina octová dává za vznik ostrou a silnou kyselost podobou octu (Bangaerts et al., 2021).

### 3.3.1 Bakterie octového kvašení

Na začátku této fáze, v nepřítomnosti BMK během prvních měsíců, byla produkce acetoinu způsobená oxidací kyseliny mléčné bakteriemi kyseliny octové. *Acetobacteraceae* preferují růst na etanolu, a při neustálém odbourávání maltooligosacharidů nastala tvorba glukózy, maltózy a maltotriózy během této první části acidifikační fáze. Tyto vzniklé cukry byly později spotřebovány bakteriemi mléčného kvašení a kvasinkami (De Roos, Vandamme a De Vuyst, 2018).

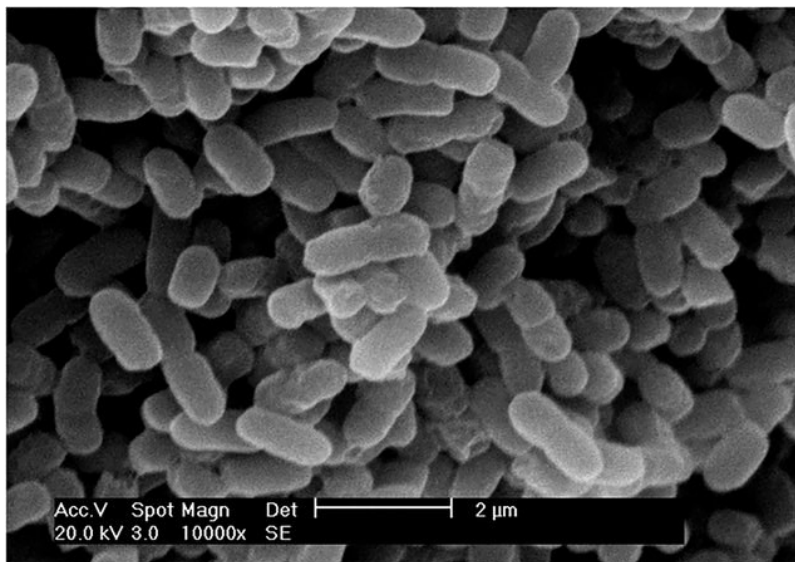
Mezi BOK převládá *Acetobacter pastorianus* (Obr. 7), který obsahuje extra genetický kód, který mu dává větší toleranci ke kyselému a etanolovému prostředí v porovnání s jinými rody bakterií octového kvašení (Bangaerts et al., 2021). Vysoká produkce kyseliny octové pomocí BOK zkrze oxidaci ethanolu vede k vytvoření ethylesteru kyseliny octové (De Roos, Vandamme a De Vuyst, 2018). Navíc byly objeveny dvě bakterie kyseliny octové, které jsou charakteristické pro kyselé piva, a to *Acetobacter lambici* (dále *A. lambici*) a *Gluconobacter cerevisiae* (dále *G. cerevisiae*). Nedávné studie potvrdili přítomnost *Acetobacter orientalis* na začátku fermentace a *Acetobacter pastorianus* při zrání (De Roos a De Vuyst, 2018a).

Buňky *A. lambici* jsou gram negativní pohyblivé tyčinky nejčastěji se vyskytující samostatně nebo v párech. Jsou kataláza pozitivní, ale oxidáza negativní (Spitaels et al., 2014b). Je velice možné, že *A. lambici* je adaptována pro proces produkce lambického typu piva (Bangaerts et al., 2021).

*G. cerevisiae* jsou gram negativní nepohyblivé buňky tyčinkovitého tvaru, o něco větší než buňky *A. lambici*. Buňky se nejčastěji vyskytují samostatně nebo v párech (Spitaels et al., 2014c).

Příliš velký růst BOK může vést k zvýšenému okyselení, což vytvoří nežádoucí chuť ve výsledném profilu lambického piva (De Roos a De Vuyst, 2018b). BOK jsou aerobní, gram negativní a kataláza pozitivní bakterie (Van Oevelen et al., 1977), které jsou známy hlavně

kvůli jejich využití v produkci octu, vitamínu C, celulózy a kyseliny glukonové. Optimální teplota růstu je při 25 – 30 °C (De Roos a De Vuyst, 2018b).



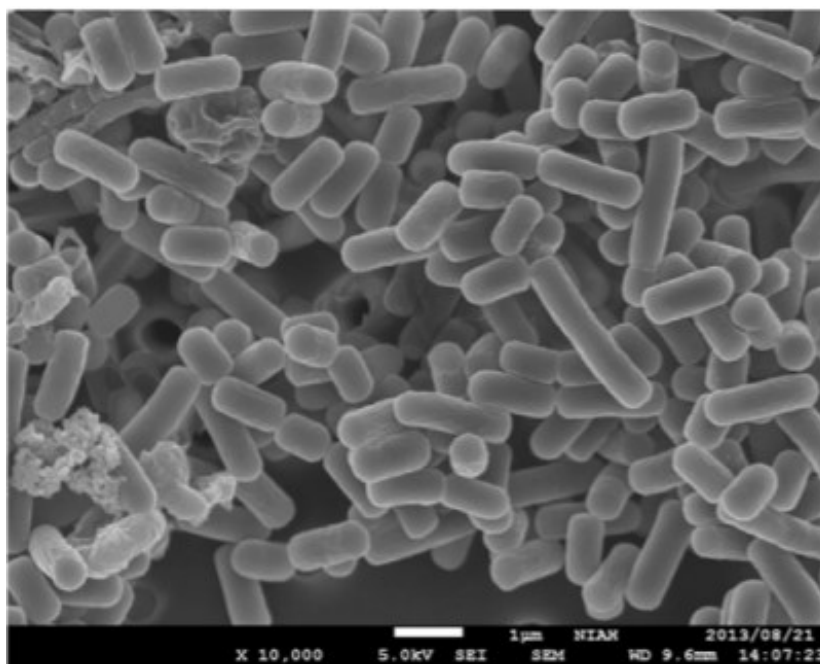
Obr. 7 *Acetobacter pastorianus* (Xia et al., 2016)

### 3.3.2 Bakterie mléčného kvašení

BMK jsou striktně fermentativní, fakultativně anaerobní, grampozitivní bakterie. Jejich optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 30 °C a maximálně 45 °C (De Roos a De Vuyst, 2018b). Většina BMK v lambicích je tvořena rodem *Pediococcus*, což jsou gram pozitivní, nepohyblivé koky vyskytující se v párech nebo v tetrádách (Boulton, 2013). Nejčastěji je to *P. damnosus* (v minulosti identifikován jako *Pediococcus cerevisiae*), homofermentativní BMK druh, který přeměňuje cukry na kyselinu mléčnou (De Roos a De Vuyst, 2018b). Jiné kmeny bakterií *Pediococcus* mají tendenci vytvářet sliz (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020), naneštěstí, ten nakonec vymizí. Bohužel jeho mírný opar může přetrvávat a ten nemůže být odstraněn ani filtrací (Keersmaecker, 1996). *Pediococcus cerevisiae* byl v minulosti hlášen jako klíčový organizmus pro spontánní fermentaci, tento druhový název ale nemá v bakteriální nomenklatuře žádné postavení, označení „*cerevisiae*“ bylo použito nejen pro *Pediococcus damnosus*, ale také pro druh *Pediococcus pentasaceus* (Spitaels et al., 2014a).

Další, velice často se vyskytující BMK, je *Lactobacillus brevis* (Obr. 8). *L. brevis* je jedním z nejvíce odolným kmenem vůči hořkým látkám chmele, díky jeho rezistentním genům (Ciosek, Rusiecka a Poreda, 2020). Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou gram pozitivní, nepohyblivé tyčinky, které jsou tolerantní k nízkému pH (Boulton, 2013). U bakterie *L.*

*brevis* se prokázalo, že jeden z genetických faktorů, zajišťující rezistenci vůči chmelovým kyselinám, je kódován plazmidem; relativně nestabilní jednotkou deoxyribonukleové aminokyseliny (dále DNA). Tento plazmid nese otevřený čtecí rámec označený jako *horA*, ten kóduje membránový protein *HorA*, který uděluje rezistenci na chmel u *L. brevis* (Suzuki et al., 2006), zároveň tento gen byl také izolován u jiných bakteriích, které jsou schopné kažení piva (Garcia-Garcia et al., 2017). Tento gen je schopen vytlačit hořké chmelové kyseliny z bakteriálních buněk. Naproti tomu produkt genu *horC* poskytuje odolnost vůči chmelu tím, že působí jako multidrogový transportér závislý na protonové hybné síle (Ciosek, Rusiecka a Poreda, 2020). Kmeny *Lactobacillus* jsou buďto homofermentativní nebo heterofermentativní. Homofermentativní kmeny produkují kyselinu mléčnou z pyruvátu, který vzniká při glykolýze, heterofermentativní kmeny naopak produkují směs produktů obsahující laktát glycerol acetát a etanol pomocí fosfoketolázové dráhy (Bouton, 2013).



Obr. 8 *Lactobacillus brevis* (Kimoto-Nira et al., 2015)

Většina BMK způsobuje znehodnocení piva (Peyer et al., 2018), a to z důvodu toho, že tento druh bakterií je dobře přizpůsoben k růstu v různých druzích piva. Způsobují tvorbu kyseliny mléčné, která vytváří nežádoucí kyselou chuť (De Roos a De Vuyst, 2018b). Bylo zjištěno, že 60-70 % všech mikrobiologických incidentů je způsobeno právě touto skupinou mikroorganismů (Suzuki et al., 2006). V tomto případě jsou ale BMK velice žádoucí, a *P. damnosus* je jeden z hlavních izolovaných druhů mikroorganismů ve spontánně kvašených

pivech. Okyselení díky *Lactobacillus* spp. nebo *Pediococcus* spp. má i několik výhod, především stabilitu chutě, nižší viskozitu mladiny, rychlé konečné prokvašení nebo jemnější hořkost chmele. Určité výhody vznikají i díky tomu, že tyto bakterie také mohou využívat sacharidy, které nejsou využívány klasickými kvasinkami, jako je maltotrióza nebo celobióza, což vede k nadměrnému prokvašení piva (Piraine, Leite a Bochman, 2021).

I když v lambickém pivě se nejčastěji vyskytuje v této fázi *Pediococcus* spp., u Amerického druhu spontánně kvašeného piva se vyskytuje několik laktobacilů stejně jako *Leuconostoc*, *Lactococcus* a další (Bokulich et al., 2012).

### 3.4 Čtvrtá fáze fermentace u lambických piv

Tato čtvrtá, a poslední, fáze začíná po 8-10 měsících od první fáze fermentace, kdy rapidně začne ubývat množství bakterií mléčného kvašení (Keersmaecker, 1996; Spitaels et al., 2014a) a začnou přibývat kvasinky rodu *Brettanomyces* (Witrick, Pitts a O'Keefe, 2020) a trvá dalších 16 měsíců, kdy vznikající kvasinky tvoří chuť a aroma výsledného produktu (Guinard, 1990) a to díky produkci volných fenolů a dalších charakteristických sloučenin tvořící aroma jako organické kyseliny (Gibson et al., 2017). Příležitostně jsou kvasinky *B. bruxellensis* doprovázeny i kvasinkami *Candida* ssp., *Pichia* spp., a dalšími (Bokulich et al., 2012).

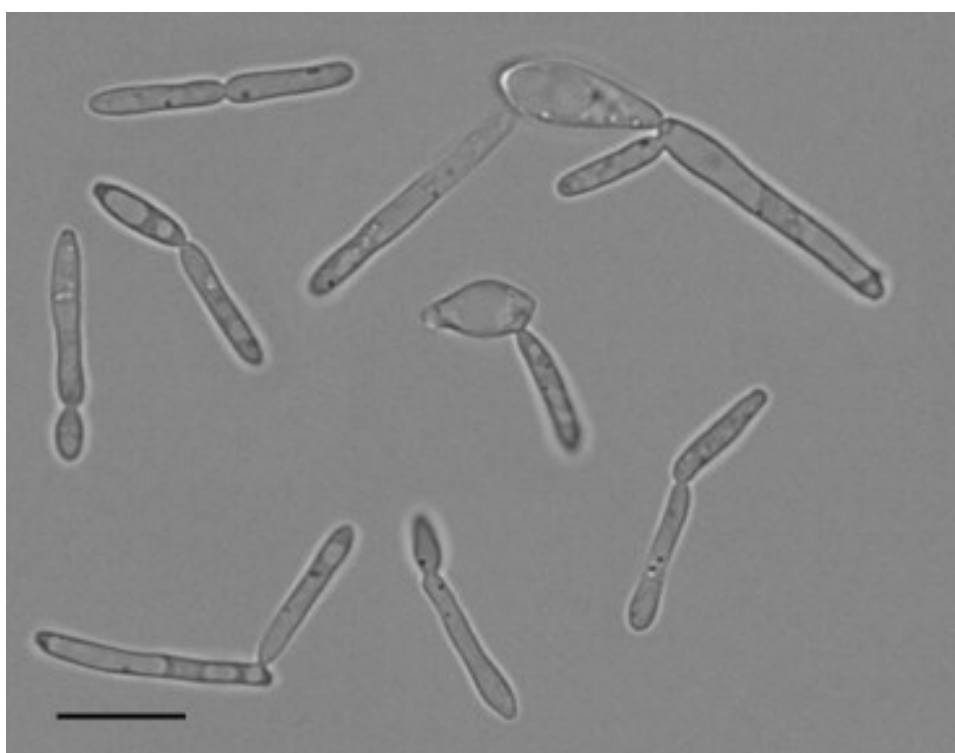
#### 3.4.1 Kvasinky

*B. bruxellensis* (Obr. 9) hraje zásadní a prospěšnou roli ve vzniku aroma a chuti lambického piva a Amerického chladného piva (Steensels et al., 2015). Kromě *B. bruxellensis* se objevují i kvasinky *Brettanomyces lambicus* (dále jako *B. lambicus*). Tento druh kvasinek je specifický pro lambická piva (Guinard, 1990). Později byly kvasinky *B. bruxellensis* a *B. lambicus* rozpoznány za synonyma stejného druhu (Spitaels et al., 2014a). Další zdroj zmiňuje i přítomnost *Brettanomyces anomala*, jakožto kvasinku v této fázi (Gibson et al., 2017).

Kvasinky rodu *Brettanomyces* začínají v pivě růst většinou po 4-8 měsíci a tím postupně přečíslí kvasinky, které se hlavně vyskytují v druhé fázi a to kvasinky *S. cerevisiae* (Steensels et al., 2015).

*Brettanomyces* jsou fakultativně anaerobní kvasinky, ascomycota, které lze izolovat z různých zdrojů včetně ovoce, piva, vína, čaje, nebo dřevěných sudů (Di Canito et al., 2021). Díky jejich odolnosti vůči cykloheximidu jsou lehce rozlišitelné od ostatních druhů kvasinek. Kvasinka *Dekkera*, teleomorfní (sexuální) forma anamorfního (asexuálního) rodu

*Brettanomyces*, je hlavně spojována s kažením vína (Basařová, 2010; Menoncin a Bonatto, 2019). V této době jsou variace *Dekkara* a *Brettanomyces* používány jako synonyma. Aroma v lambických pivech je především postaveno na přítomnosti velkého množství esterů, které vznikají díky enzymu produkovaného kvasinkou *Brettanomyces*, který dokáže podporovat reakci transformující kyseliny a alkohol na estery. Tato reakce se nazývá hydrolýza. Nejvýznamější estery, které vznikají, jsou etyl laktát a etyl acetát, vedlejší produkty (Keersmaecker, 2016). Estery produkované právě kvasinkami *Brettanomyces* vedou k ovocným chutím v lambickém pivě (Serra Colomer et al., 2020).



Obr. 9 *Brettanomyces/Dekkara bruxellensis* (Smith, 2011)

Kvasinky *Brettanomyces* také mají velice zajímavou schopnost odhalovat skryté chutě pomocí produkce  $\beta$ -glukosidázy. Primární funkcí tohoto enzymu je hydrolýza celobiózy, což pomáhá těmto kvasinkám přežít měsíce v dubových sudech při fermentaci. Tyto enzymy také uvolňují glykosidicky vázané chuťové sloučeniny, čímž dodává vínu a pivu komplexnost chuťového profilu (Gibson et al., 2017).

Další charakteristický prvek této kvasinky je, že za přítomnosti vzduchu tvoří na povrchu piva film, a díky tomu zabraňuje oxidaci tekutiny. Zabráněním oxidaci se zabraňuje dalšímu růstu BOK (Keersmaecker, 2016). K tomuto pomáhají ale nejen kvasinky *Brettanomyces*, ale i další kvasinky vyskytující se v této fázi, jako *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* a



*Cryptococcus*. Tyto další kvasinky také tvoří několik esterů a volných sloučenin, které napomáhají k vytvoření ovocného charakteru lambických pív. *Hansenula* a *Pichia* produkují velké množství etylacetátu pomocí aerobní fermentace. Všechny tyto kvasinky jsou k nalezení na hladině, a to díky svému oxidativnímu charakteru a pseudomyceliu, který jim dává schopnost plout (Guinard, 1990).

## 4 METODY IZOLACE MIKROORGANIZMŮ

Růst mikroorganismů za definovaných podmínek je znám také jako kultura. Kultury vždy obsahují pouze jeden druh mikroorganismů. Pokud tomu tak není a nachází se v kultuře více než jeden druh mikroorganismů, jedná se o smíšenou kulturu. Oddělení určitého druhu mikrobů ze vzorku se smíšenou populací mikroorganismů se nazývá izolace (Pathak, Tikkoo a Goyal, 2016).

### 4.1 Kultivační média

Existují dva hlavní typy kultivačních medií, a to tuhé a tekuté. Výběr mezi tuhým či tekutým médiem poté záleží na jeho využití. Tekutá média jsou často využívání k zaočkování a k rozmnožení mikroorganismů, ale nemusí tomu tak vždycky být. Pevná média se poté většinou využívají k charakterizaci mikrobů (Briggs et al., 2004).

Tuhá média, neboli také živné půdy, se dají dále rozdělit podle účelu využití na základní, obohacené, selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické a transportní půdy (Stolp a Starr, 1981).

Základní půdy jsou ty, které jsou vytvořené na podporu růstu velkého počtu rozdílných druhů mikroorganismů. Aby toho byly schopné, musí obsahovat živiny, které lze využít velkým množstvím mikrobů (Briggs et al., 2004).

Selektivní půdy jsou následně určené k upřednostňování růstu jen určitým skupinám mikroorganismů. Této selektivity je dosaženo díky přítomnosti specifických componentů v agaru. Diagnostické půdy obsahují činidla, která dokáží pomoci v rozlišení různých druhů mikroorganismů. Pokud je do diagnostické půdy přidána určitá složka, lze z ní vytvořit selektivně diagnostickou půdu, která povoluje inhibovat růst některých druhů mikroorganismů, a tím ulehčuje práci identifikace (Stolp a Starr, 1981).

### 4.2 Inokulace

Existují tři hlavní metody izolace na čistých půdách: roztěrem, přelivem a křížovým roztěrem. Izolace roztěrem využívá zředěnou bakteriální substanci o objemu 0,1 ml, která se ihned po nanesení na agar rovnoměrně rozetře po celé ploše pomocí sterilního nástroje. Substance se díky suchého agaru rychle vstřebává, což zabraňuje dalšímu bakteriálnímu růstu. Po kultivaci rostou buňky pouze na povrchu agaru (Stolp a Starr, 1981).

Metoda přelivem je obdobná. V tomto případě je nejprve do prázdné Petriho misky nanášena bakteriální substance. Následně je na takto nanášenou substanci nalit chladný, ale

stále tekutý, agar. Po kultivaci rostou buňky jak na povrchu, tak také v agaru (Sanders, 2012).

Křížový roztěr využívá sterilizované očko, které je namočené do bakteriální suspenze, která je následně nanesena na agar. Existuje více druhů roztěru, ale hlavním cílem této metody je vytvoření pruhů v jednom směru, sterilizace očka, a tvorba dalších pruhů v jiném směru využívající jako inokulum pruhy první (Stolp a Starr, 1981; Sanders, 2012).

### 4.3 Identifikace

Metody identifikace se dělí na dva typy využívaných metod. A to fenotypové a genotypové metody. Fenotypová identifikace zahrnuje pod sebe řadu metod, a to včetně pozorování růstu, a morfologie kolonií na různých živných půdách (Cloud et al., 2010). Při fenotypových metodách se ale musí vzít na paměť, že mikrobiální fenotyp bakterií, jako je velikost a tvar buněk, sporulace, biochemická aktivita a senzitivita k různým antimikrobním látkám, se často může lišit na médiu a podmínkách růstu, které byly využity. Fenotypové metody také zahrnují reakce na různé chemikálie, kde určité reakce se opírají o subjektivní určení. Proto u těchto typů identifikace je velikou nevýhodou právě ztráta možnosti na dokonalou konzistentní odpověď (Sandle, 2016).

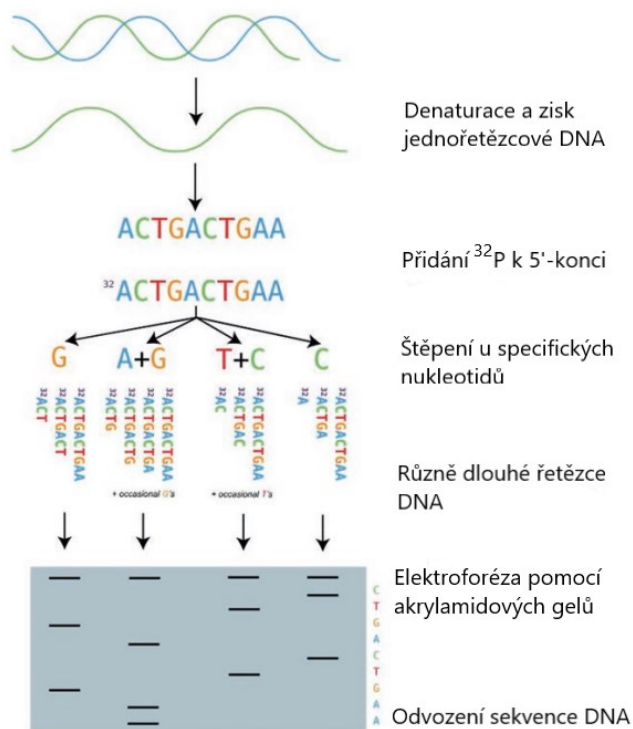
Genotypové metody se dají rozdělit na dvě další kategorie, a to na techniky založené na vzorech, „otiscích“, a na techniky založené na sekvencích. Techniky založené na vzorech typicky využívají metodu k produkci fragmentů z chromozomální DNA organismu, po oddělení fragmentů podle velikosti je následně vytvořen profil, který je jedinečný pro každý organismus či jeho velmi blízké příbuzné, obvykle na úrovni kmene nebo druhu. U technik založené na sekvencích se spoléhá na určení sekvence specifického úseku DNA spojeného se specifickým genem. Ten se porovnává s testovací sekvencí a stupeň podrobnosti mezi těmito dvěma sekvencemi následně pracuje jako měřítko toho, jak blízko jsou si tyto dva organismy navzájem příbuzné (Emerson et al., 2008).

#### 4.3.1 Techniky založené na sekvenování DNA

První dvě nejznámější metody pro sekvenování DNA, také nazývané jako „*First generation sequencing*“ (První generace sekvenování), jsou **Maxamova-Gilbertova metoda sekvenování** a **Sangerova metoda sekvenování** (Gužvić, 2013). Další metody sekvenování DNA se nazývají „*Next Generation sequencing*“ (Sekvenování nové generace; do této kategorie patří druhá a třetí generace sekvenování DNA). Do této kategorie můžeme začlenit platformy jako je **Pyrosekvenace** (známé také jako 454/Roche), **Illumina** či **SOLiD**

(Kenneth Nelson et al., 2011). V těchto metodách je nahrazována enzymatická syntéza přístroji, které tento proces zrychlují (Trankachan a Thomas, 2018).

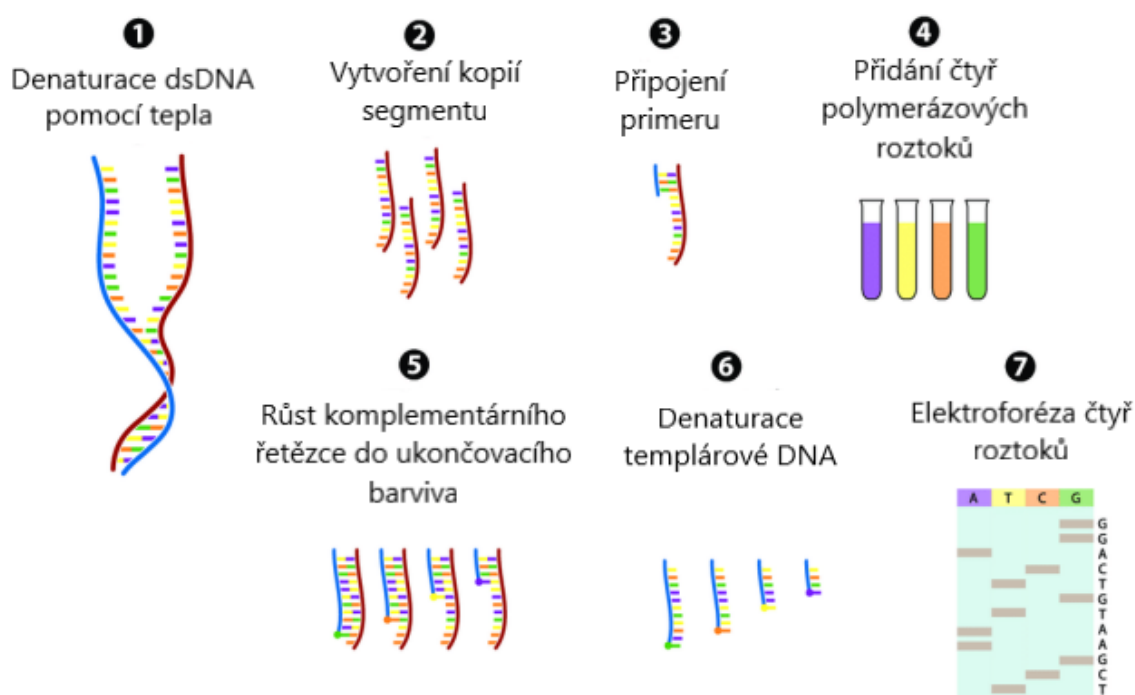
V **Maxamově-Gilbertově metodě** jsou fragmenty DNA podrobeny náhodnému štěpení na určitých nukleotidových pozicích pomocí chemických reakcí. Tyto reakce vytvoří sady fragmentů ze dvou chemických štepných reakcí. Jedna štěpí molekuly DNA na deoxyguanin a deoxyadenin, a druhá na deoxycytosin a deoxythymin. Tyto reakce mohou být modifikované, aby vždy štěpily DNA pouze na deoxyguanin nebo pouze na deoxycytosin. Produkty těchto štepných reakcí jsou poté separovány přes denaturační polyakrylamidový gel (Mitsui, Ishuira a Tsuji, 2015). Tato metoda je založena na hydrazinu, dimetylsulfátu a kyseliny mravenčí, a jejich schopnostech modifikovat báze v molekule DNA. Nevýhodou této metody je zdlouhavá příprava DNA před samotným sekvenováním (Kenneth Nelson et al., 2011). Maxamova-Gilbertova metoda je nejvýhodnější pro sekvence heterogenní DNA (Trankachan a Thomas, 2018). V následujícím obrázku (Obr. 10) je zkráceně popsán postup sekvenace.



Obr. 10 Maxamova-Gilbertova sekvenace; přeloženo (Shetty, Amirtharaj a Shaik, 2019)

**Sangerova metoda** (Obr. 11) se také někdy nazývá metoda terminátoru dideoxynukleotidového řetězce, jelikož využívá DNA polymerázu a dideoxynukleotidy (dále jako ddNTP) k fragmentaci řetězců pomocí enzymatické syntézy (Mitsui, Ishuira a Tsuji, 2015; Trankachan a Thomas, 2018). Využitím DNA polymerázy se syntetizuje

komplementární kopie jednořetězcové DNA použité jako templát (Kenneth Nelson et al., 2011). DNA polymeráza má schopnost začlenit dideoxynukleotid monofosfát (dále jako ddNMP) na 3'-konec rostoucího primerového řetězce, a tímto krokem je prodlužování daného řetězce ukončeno, jelikož nově syntetizovaný řetězec nyní nemá hydroxylovou skupinu na 3'-konci (Shendure et al., 2011). Tato reakce se provádí ve čtyřech zkumavkách, kdy každá z nich obsahuje jiné množství jednoho ze čtyř ddNTP. Po ukončení reakce mají všechny fragmenty stejný 5'-konec, ale liší se zbytkem na 3'-konci. Ten je určen specifickým ddNTP využitým v reakci. Sangerova metoda byla postupem času automatizovaná. (Mitsui, Ishiura a Tsuji, 2015). V následujícím obrázku je v sedmi krocích popsán princip Sangerovy sekvenace.



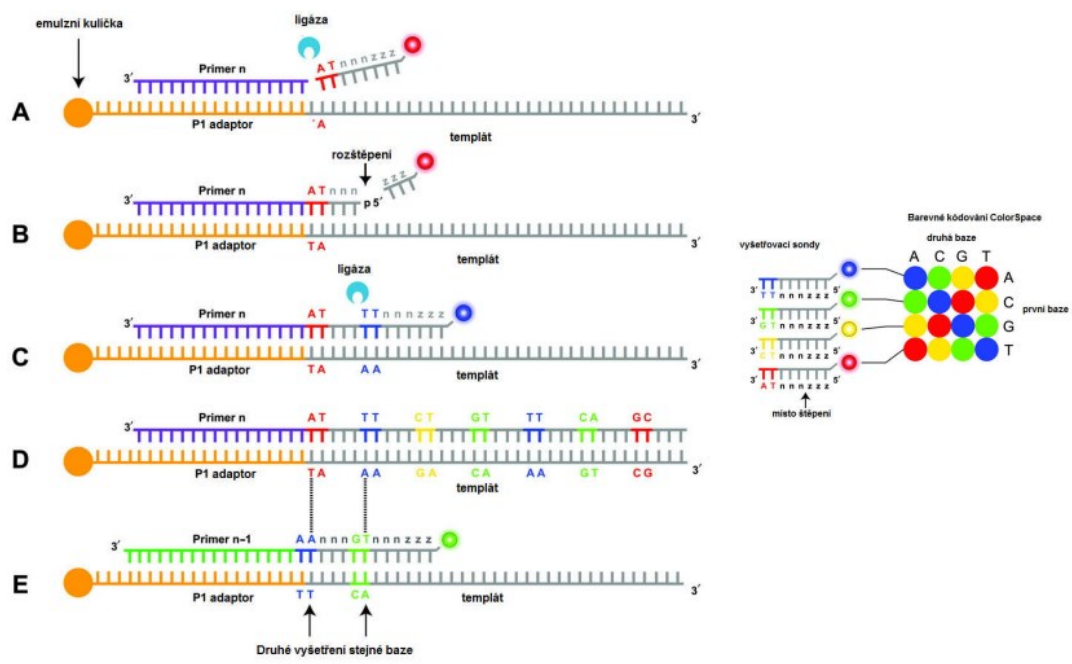
Obr. 11 Sangerova sekvenace; přeloženo (Gauthier, 2007)

**Pyrosekvenace** je založena na detekci světelných signálů po začlenění nukleotidů DNA polymerázou. Množství tohoto světla je úměrné k počtu ATP molekul, které je úměrné ke začleněným nukleotidům (Gužvić, 2013). Světelné signály vznikají díky uvolnění pyrofosfátu při dosednutí nukleotidu na řetězec (Shendure et al., 2011). Na začátku se nejříve molekuly DNA přichytí na „kuličku“, kde se molekuly namnoží dokud celá kulička není pokryta identickou molekulou DNA. Následně se kuličky promyjí přes reakční destičku, kde skončí každá kulička v jamce. Přes tuto reakční destičku se dále promyjí menší enzymy

vázané na kuličky a deoxynukleotidy, a uvolněné pyrofosfáty se změní pomocí senzoru (Heather a Chain, 2016).

**Illumina (Solexa)** využívá sekvenace pomocí syntézy, kdy sekvenování probíhá pomocí detekce fluorescenčních záblesků po začlenění nukleotidu. Každý nukleotid přitom nese jinou fluorescenční barvu (Gužvić, 2013). Syntéza probíhá díky vzniku jednořetězcového můstku, ze kterého následně pomocí polymerázy vzniká dvouřetězcový můstek. Tento proces se nazývá *Bridge amplification* (Shendure et al., 2011). Poté dochází k denaturaci a reverzní řetězce jsou chemicky odštěpeny. Sekvenovací primer nakonec přiřazuje ke zbylému řetězci daný nukleotid (Gužvić, 2013).

**SOLiD**, neboli sekvenace pomocí oligonukleotidové ligace a detekce (Obr. 12), jak lze z názvu poznat, využívá pro sekvenaci DNA ligázu (Heather a Chain, 2016). Příprava vzorku je podobná tomu při pyrosekvenaci (Gužvić, 2013). A to díky tomu, že i v tomto systému se využívají takzvané „kuličky“ a emulzní PCR (*polymerázová řetězcová reakce*) pro izolaci části DNA. Rozdílná je ale velikost těchto kuliček, v SOLiD systému jsou o dost menší, a jsou umístěny v pevné fázi průtokové cely, kde je dosaženo vyšší hustoty (Cai a Buxbaum, 2013; Shendure et al., 2011). Při sekvenaci pomocí ligace se do průtokové cely, která obsahuje kuličky s namnoženou templátovou DNA, pumpuje směs fluorescenčně označených dinukleotidových sond. Jakmile se správná sonda pomocí ligázy naváže k primeru templátové DNA, uvolní se fluorescenční barva, která je detekována senzorem (Mardis, 2008). Tento krok se opakuje tak dlouho, dokud není sondami pokryt celý sekvenovaný řetězec. Průtoková cely se následně promyje a spustí se další sekvenací cyklus, kde je primer o jednu bázi kratší. A celý proces se opakuje celkem pětkrát. Poté jde pomocí pořadí sekvenovaných fluorescenčních barev odvodit, jaký nukleotid je obsažen v daném místě (Gužvić, 2013; Cai a Buxbaum, 2013). V následujícím obrázku můžete názorně vidět, jak sekvenace pomocí ligázy vypadá.



Obr. 12 SOLiD sekvenace; přeloženo (Voelkerding, Dames a Durtschi, 2009)

## 5 DOSTUPNÝ SORTIMENT SPONTÁNNĚ KVAŠENÝCH PIV V RÁMCI EU

### 5.1 Belgické pivovary

**Boon Brewery** je od roku 1972 životním dílem Franka Boona a jeho rodiny. Jejich hlavním typem spontánně kvašeného piva je Gueuze, Kriek a Faro. Pivovar sídlí v Lembeeku, které bylo považováno za centrem produkce lambického piva. V minulém roce bylo jejich pivo, *Oude Geuze VAT 31* (Obr. 13), vyhlášeno jako nejlepší Gueuze na světě ve World Beer Awards 2021 (Brewery Boon, 2021).



*Obr. 13 Oude Geuze Boon VAT 31 (Brewery Boon, 2021)*

**Gueuzerie Tilquin** je mladý pivovar založený Pierrem Tilquinem v roce 2009 v Bierghesu. V tomto pivovaru se vaří pouze piva pomocí spontánní fermentace, které zrají v dubových sudech. V této době vaří tři druhy piva (Obr. 14), které se vyvážejí nejvíce do Francie a Španělska (Gueuzerie Tilquin, 2013).





Obr. 14 Etikety piv z Gueuzerie Tilquin (Gueuzerie Tilquin, 2013)

Pivovar **Brouwerij Liefmans** byl založen sládkem Jacobusem Liefmansem roku 1750 v Oudenaarde. Pivovar se začal dostávat na mapu až po roce 1900, a to hlavně Rosy Merckxové, která v pivovaru po 46 let fungovala jako vrchní sládek. Ikonickým pivem tohoto pivovaru je jejich třesňové pivo *Goudenband* (Obr. 15), které vzniklo právě díky Rosy Merckxové (Brouwerij Liefmans, 2022).



Obr. 15 Liefmans Goudenband pivo (Brouwerij Liefmans, 2022)

Belgický rodinný pivovar **Lindemans** vaří lambické pivo již od roku 1822 ve vesnici kousek od Bruselu s názvem Vlezenbeek. V pivovaru se od založení vystříдалo již 6 generací z této rodiny. Pivovar Lindemans po 200 let vaří 13 druhů lambického piva, kdy každé z nich bylo alespoň jednou oceněné za svoji chuť. Pro své výročí, uplynutí 200 let od založení, uvařil tento pivovar speciální lambické pivo *Cuvée Francisca* (Obr. 16), pojmenované po Francisce Vandersmissenové, manželce zakladatele pivovaru Joose Lindemans (Lindemans, 2022).



*Obr. 16 Oude Gueuze Anniversary Blend 2020 „Cuvée Francisca“ (Lindemans, 2022)*

**Kasteel Brouwerij Vanhonsbrouck** je belgický pivovar založený roku 1811 Amandusem Vanhonsbrouckem ve Werkenu a nyní se pyšní a označuje, jako jeden z nejmodernějších pivovarů v Evropě. Tento pivovar začal nejprve s výrobou pouze spodně kvašeného piva, v roce 1957 ale přešel na výrobu piva typu Gueuze, Kriek a později také na výrobu dalších ovocných piv. Jejich prvním speciálním pivem bylo *Bacchus* (Obr. 17), které se začalo vařit v roce 1955. Bacchus je Vlámský červenohnědý Ale. Později do tohoto piva bylo přidáno ovoce, a tak vzniklo *Bacchus Cherry* a *Bacchus Raspberry* (Kasteel Brouwerij Vanhonsbrouck, 2022).



*Obr. 17 Bacchus pivo (Kasteel Brouwerij Vanhonsbrouck, 2022)*

## 5.2 České pivovary

**Wild Creatures** je český minipivovar založený roku 2016 Jitkou Ilčíkovou a Ladislavem Vrtišem, který již dříve založil Plzeňský pivovar Raven, v Dolních Dunajovicích. (Wild Creatures, 2022). Jitka Ilčíková v pivovaru funguje jako vrchní sládek a právě její nadšení do spontánně kvašených piv dalo za otevření tohoto pivovaru (Pivo Bier & Ale, 2022). V této době mají na prodej několik druhů ovocných, spontánně kvašených piv. Jejich nejnovějším pivem je *Midwinter Dream* (Obr. 18), směs tři roky starého spontánně kvašeného piva, malin a višně. Extrakt původní mladiny v tomto pivu je 14 %, objemové procento alkoholu je poté 6,6 %. Pořídit se dá přes eshop pivovaru Raven (*Midwinter Dream*, 2022).



*Obr. 18 Midwinter Dream pivo (Wild Creatures, 2022)*

Pivovar **Lobeč** má dlouhou historii, první zmínka se objevila v roce 1586. Pivovar byl několikrát prodán a pivo se v něm vařilo až do roku 1943, o 5 let později, z důvodu nacionalizace, byl pivovar uzavřen a využíván státem. Na přelomu století byla budova pivovaru na rozpadnutí. V roce 2009 se začala původní budova pivovaru opravovat, a stát pivovar označil za kulturní památku. Od roku 2015 se v něm znovu vaří pivo. Pivovar má velkou nabídku svých produktů, mezi nimi i jedno spontánně kvašené pivo (Obr. 19) z roku 2019 a 2020. Pivo je archivní a vyzrálé pivo bude časem tmavnout, jeho extrakt původní mladiny je 12 %, zatímco jeho objemové procento alkoholu je 4,8 %. Wild 2020 bylo dále ochuceno bobulemi lesního ovoce z okolí Kokořínska, a dalo tak vzniku pivu **Wild Berry 2019 a 2020**. Tomuto pivu lesní ovoce nedodává pouze chuť, ale i jedinečnou narůžovělou barvu (Pivovar Lobeč, 2022).



*Obr. 19 Wild 2019 pivo (Pivovar Lobeč, 2022)*



*Obr. 20 Wild Berry 2019 pivo (Pivovar Lobeč, 2022)*

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši zabývající se mikroflórou spontánně kvašených piv. Pozornost byla věnována surovinám a procesu výroby piva s důrazem na rozdíly mezi tradičními druhy piv a spontánně kvašenými pivy. V práci také byly popsány metody izolace mikroorganismů a dostupný sortiment spontánně kvašených piv na českém a evropském trhu.

Na základě literární rešerše této bakalářské práce lze formulovat následující závěry:

- Rozdíl mezi pivem vyráběným řízenou a spontánní fermentací spočívá v tom, že proces fermentace není u spontánně kvašených piv zahájen přidáním inokula kvasinek nebo bakterií jako startovacích kultur, ale fermentace spočívá v činnosti přirozeně přítomné mikroflóry, která je se vyskytuje v okolí, v průběhu nočního chlazení.
- V rámci fermentace spontánně kvašených piv můžeme rozeznat čtyři odlišné fáze, ve kterých se projevují specifické skupiny mikroorganismů (1. fáze enterobakterie a kvasinky, 2. fáze kvasinky, 3. fáze bakterie octového a mléčného kvašení, 4. fázi dominuje kvasinka *Brettanomyces bruxellensis*, která je brána za mikroorganismus kazící běžná piva)
- Produkce spontánně kvašených piv se účastní široké spektrum mikroorganismů. Různé výrobky i jejich šarže se mohou ve složení mikroorganismů lišit. Pokud budeme chtít znát konkrétní druhy v rámci zúčastněné mikroflóry, je nutné provést izolaci a identifikaci, ta se provádí nejčastěji pomocí sekvenace.
- V České republice nejsou spontánně kvašená piva tak populární, jako např. v Belgii. Nicméně i u nás, v zemi ležáků, se lze potkat s produkcí spontánně kvašených piv.

Tato práce může sloužit jako review pro studie, které se budou zabývat nejen mikroflórou spontánně kvašených piv (izolace a identifikace jednotlivých mikroorganismů ve výrobcích konkrétních piv), ale i praktickou stránkou jejich výroby.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BASAŘOVÁ, Gabriela, 2010. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-734-7.

BOKULICH, Nicholas A. et al., 2012. Brewhouse-Resident Microbiota Are Responsible for Multi-Stage Fermentation of American Coolship Ale. *PLoS ONE* [online]. 7(4) [cit. 2022-02-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035507

BOKULICH, Nicholas A. a Charles W. BAMFORTH, 2013. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 77(2), 157-172 [cit. 2022-02-18]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00060-12

BONGAERTS, Dries et al., 2021. Technological and Environmental Features Determine the Uniqueness of the Lambic Beer Microbiota and Production Process. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 87(18) [cit. 2022-02-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00612-21

BOULTON, Chris, 2013. *Encyclopaedia of brewing*. Hoboken: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-6744-4

BREWER, Mark, 2015. *Brewology: An Illustrated Dictionary for Beer Lovers*. Amerika: Skyhorse. ISBN 9781632206596.

*Brewery Boon* [online], 2021. Belgie: Boon [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <https://boon.be/en>

BRIGGS, Dennis E. et al., 2004. *Brewing: Science and practice*. United Kingdom: Woodhead Publishing Limited and CRC Press. ISBN 9781855734906.

*Brouwerij Liefmans* [online], 2022. Belgie: Liefmans [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <https://www.liefmans.com/en/brewery>

CAI, Guiqing a Joseph D. BUXBAUM, 2013. Next-Generation Sequencing For Gene and Pathway Discovery and Analysis in Autism Spectrum Disorders. *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders* [online]. Elsevier, s. 169-177 [cit. 2022-04-25]. ISBN 9780123919243. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-391924-3.00011-9

CHLÁDEK, Ladislav, 2007. *Pivovarnictví*. Praha: Grada. Řemesla, tradice, technika. ISBN 9788024716169.

CIOSEK, Aneta, Iga RUSIECKA a Aleksander POREDA, 2020. Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **126**(1), 53-58 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.590

CLOUD, Joann L. et al., 2010. Comparison of Traditional Phenotypic Identification Methods with Partial 5' 16S rRNA Gene Sequencing for Species-Level Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **48**(4), 1442-1444 [cit. 2022-03-24]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00169-10

CUVAS-LIMON, R. B. et al., 2021. Spontaneously fermented traditional beverages as a source of bioactive compounds: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **61**(18), 2984-3006 [cit. 2022-05-04]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1791050

ČESKO, vyhláška č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí – znění od 1. 12. 2018. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2022 [cit. 14. 5. 2022]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248#f6278471>

DAENEN, Luk et al., 2008. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research* [online]. **8**(7), 1103-1114 [cit. 2022-05-10]. ISSN 15671356. Dostupné z: doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00421.x

DE ROOS, Jonas a Luc DE VUYST, 2018a. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **49**, 115-119 [cit. 2022-02-18]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.08.007

DE ROOS, Jonas a Luc DE VUYST, 2018b. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food*

*and Agriculture* [online]. **99**(1), 25-38 [cit. 2022-02-18]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.9291

DE ROOS, Jonas, Peter VANDAMME a Luc DE VUYST, 2018. Wort Substrate Consumption and Metabolite Production During Lambic Beer Fermentation and Maturation Explain the Successive Growth of Specific Bacterial and Yeast Species. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2022-02-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02763

DE ROOS, Jonas et al., 2019. The Interior Surfaces of Wooden Barrels Are an Additional Microbial Inoculation Source for Lambic Beer Production. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **85**(1) [cit. 2022-02-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02226-18

DE ROOS, Jonas et al., 2020. Temporal Shotgun Metagenomics Revealed the Potential Metabolic Capabilities of Specific Microorganisms During Lambic Beer Production. *Frontiers in Microbiology* [online]. **11** [cit. 2022-02-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.01692

DI CANITO, Alessandra et al., 2021. Molecular Tools to Exploit the Biotechnological Potential of *Brettanomyces bruxellensis*: A Review. *Applied Sciences* [online]. **11**(16) [cit. 2022-02-18]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11167302

DUPOUR, Jean-Pierre, Kevin VERSTREPEN a Guy DERDELINCKX, 2003. Brewing yeasts. *Yeasts in Food* [online]. Elsevier, s. 347-388 [cit. 2022-02-18]. ISBN 9781855737068. Dostupné z: doi:10.1533/9781845698485.347

DYSVIK, Anna et al., 2020. Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **86**(14) [cit. 2022-02-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00566-20

EMERSON, David et al., 2008. Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience* [online]. 58(10), 925-936 [cit. 2022-03-24]. ISSN 1525-3244. Dostupné z: doi:10.1641/B581006



EUROZPRÁVY.CZ, ČTK, 2019. Atypický pivní nápoj? To si nikdo nekoupí, kritizuje svaz novou vyhlášku. *Euro Zprávy* [online]. [cit. 2022-05-14]. Dostupné z: <https://eurozpravy.cz/ekonomika/ceska-republika/260953-atypicky-pivni-napoj-to-si-nikdo-nekoupi-kritizuje-svaz-novou-vyhlasku/>

GARCIA-GARCIA, Jorge Hugo et al., 2017. *Pediococcus damnosus* strains isolated from a brewery environment carry the horA gene. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **123**(1), 77-80 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.397

GAUTHIER, Michael G., 2007. *Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach*. Canada. Disertace. University of Ottawa.

GIBSON, B. et al., 2017. New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research* [online]. **17**(4) [cit. 2022-02-20]. ISSN 1567-1364. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/fox038

*Gueuzerie Tilquin* [online], 2013. Belgie: Tilquin [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <https://www.gueuzerietilquin.be/en/>

GUINARD, Jean-Xavier, 1990. *Classic Beer Styles: Lambic*. USA: Brewers Publications. ISBN 978-0937381229.

GUŽVIĆ, Miodrag, 2013. *The History of DNA Sequencing / ISTORIJA SEKVENCIRANJA DNK*. *Journal of Medical Biochemistry* [online]. **32**(4), 301-312 [cit. 2022-04-21]. ISSN 1452-8266. Dostupné z: doi:10.2478/jomb-2014-0004

HEATHER, James M. a Benjamin CHAIN, 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* [online]. **107**(1), 1-8 [cit. 2022-04-21]. ISSN 08887543. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003

HUTZLER, M. et al., 2015. Yeast identification and characterization. *Brewing Microbiology* [online]. Elsevier, s. 65-104 [cit. 2022-03-26]. ISBN 9781782423317. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-331-7.00005-8

*Kasteel Brouwerij Vanhosebrouck* [online], 2022. Belgie: Vanhosebrouck [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <https://www.vanhosebrouck.be/en/>

KEERSMAECKER, Jacques De, 1996. The Mystery of Lambic Beer. *Scientific American* [online]. **275**(2), 74-80 [cit. 2022-02-18]. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0896-74

KENNETH NELSON, F. et al., 2011. Introduction and Historical Overview of DNA Sequencing. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. **96**(1) [cit. 2022-04-21]. ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0700s96

KIMOTO-NIRA, Hiromi et al., 2015. Growth characteristics of *Lactobacillus brevis* KB290 in the presence of bile. *Anaerobe* [online]. **35**, 96-101 [cit. 2022-03-26]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2015.08.001

LIMERES POSSE, Jacobo, Pedro DIZ DIOS a Crispian SCULLY, 2017. Systemic Bacteria Transmissible by Kissing. *Saliva Protection and Transmissible Diseases* [online]. Elsevier, s. 29-51 [cit. 2022-02-18]. ISBN 9780128136812. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813681-2.00003-2

*Lindemans* [online], 2022. Belgie: Lindemans [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <https://www.lindemans.be/brewery>

MARDIS, Elaine R., 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. **9**(1), 387-402 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1527-8204. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359

MARTENS, H., E. DAWOUD a H. VERACHTERT, 1991. Wort enterobacteria and other microbial populations involved during the first month of lambic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **97**(6), 435-439 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1991.tb01082.x

MENONCIN, Marcelo a Diego BONATTO, 2019. Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **125**(4), 402-411 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.580

MENZ, Garry et al., 2010. Isolation, Identification, and Characterisation of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria from Microbrewed Beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **116**(1), 14-22 [cit. 2022-03-12]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2010.tb00393.x

Midwinter Dream, 2022. *Raven E-shop* [online]. Plzeň: Raven [cit. 2022-05-14]. Dostupné z: <https://shop.pivovar-raven.cz/midwinter-dream--2018/>

MITSUI, Jun, Hiroyuki ISHIURA a Shoji TSUJI, 2015. DNA Sequencing and Other Methods of Exonic and Genomic Analyses. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease* [online]. Elsevier, s. 77-85 [cit. 2022-04-21]. ISBN 9780124105294. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-410529-4.00006-1

MOLINET, Jennifer a Francisco A. CUBILLOS, 2020. Wild Yeast for the Future: Exploring the Use of Wild Strains for Wine and Beer Fermentation. *Frontiers in Genetics* [online]. **11** [cit. 2022-02-18]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2020.589350

MOSHER, Michael a Kenneth TRANTHAM, 2017. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach* [online]. Cham: Springer International Publishing [cit. 2022-02-18]. ISBN 978-3-319-46393-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-46394-0

NOVÁK VEČERNÍČEK, Jaroslav, 2015 *Dějiny piva: od zrození až po konec středověku*. 2. vydání. V Brně: CPress. ISBN 9788026408796.

OLŠOVSKÁ, Jana et al., 2016. *Humulus lupulus l.* (hops) - A valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. *Military Medical Science Letters* [online]. **85**(1), 19-30 [cit. 2022-03-25]. ISSN 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2016.004

PATHAK, D.V., Abha TIKKOO a Sheh GOYAL, 2016. *Introductory Microbiology* [online]. New Delhi: Daya Publishing House [cit. 2022-03-17]. ISBN 9789351243267. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1074603&lang=cs&site=eds-live>

PETRUZZI, Leonardo et al., 2015. Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International* [online]. **32**(4), 341-363 [cit. 2022-05-04]. ISSN 8755-9129. Dostupné z: doi:10.1080/87559129.2015.1075211

PEYER, Lorenzo C. et al., 2018. Sour Brewing: Impact of *Lactobacillus Amylovorus* FST2.11 on Technological and Quality Attributes of Acid Beers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. **75**(3), 207-216 [cit. 2022-02-18]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2017-3861-01

PFEIFFER, Thomas a Annabel MORLEY, 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. **1** [cit. 2022-02-18]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2014.00017

PIRAINE, Renan Eugênio Araujo, Fábio Pereira Leivas LEITE a Matthew L. BOCHMAN, 2021. Mixed-Culture Metagenomics of the Microbes Making Sour Beer. *Fermentation* [online]. **7**(3) [cit. 2022-02-18]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation7030174

*Pivo Bier & Ale*, 2022. Česká republika: ROW, **XI**(95). ISSN 1804-7165.

*Pivovar Lobeč* [online], 2015. Česká republika: Lobeč [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.lobec.cz/o-nas>

PRIEST, F.G a I. CAMPBELL, 1996. *Brewing Microbiology*. 2nd ed. London: Chapman and Hall. ISBN 0-412-59150-2.

RAY, Bibek, 2004. *Fundamental food microbiology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-1610-3.

RIJ, N. J. W. Kreger-van a Donald G. AHEARN, 1968. Shape and Structure of the Ascospores of *Hanseniaspora uvarum*. *Mycologia* [online]. **60**(3) [cit. 2022-03-26]. ISSN 00275514. Dostupné z: doi:10.2307/3757427

RÖGENER, Frank, 2021. Filtration technology for beer and beer yeast treatment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. **941**(1) [cit. 2022-04-21]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/941/1/012016

SANDERS, Erin R., 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (63) [cit. 2022-05-04]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3064

SANDLE, Tim, 2016. Microbial identification. *Pharmaceutical Microbiology* [online]. Elsevier, s. 103-113 [cit. 2022-03-24]. ISBN 9780081000229. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100022-9.00009-8

SERRA COLOMER, Marc et al., 2020. Biotransformation of hop derived compounds by *Brettanomyces* yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **126**(3), 280-288 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.610

SHENDURE, Jay A. et al., 2011. Overview of DNA Sequencing Strategies. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. **96**(1) [cit. 2022-04-21]. ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0701s96

SHETTY, Preetha J., Francis AMIRTHARAJ a Noor Ahmad SHAIK, 2019. Introduction to Nucleic Acid Sequencing. SHAIK, Noor Ahmad et al., ed. *Essentials of Bioinformatics, Volume I* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 97-126 [cit. 2022-04-25]. ISBN 978-3-030-02633-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-02634-9\_6

SINGH, Neha a Sanjeev ANAND, 2022. Enterobacteriaceae. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, s. 482-489 [cit. 2022-02-18]. ISBN 9780128187678. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22978-8

SLABÝ, Martin, Karel ŠTĚRBA a Jana OLŠOVSKÁ, 2018. Filtration of Beer - A Review. *Kvasny Prumysl* [online]. **64**(4), 173-184 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp201823

SMITH, Maudy Th., 2011. Dekkera van der Walt (1964). *The Yeasts* [online]. Elsevier, s. 373-377 [cit. 2022-03-26]. ISBN 9780444521491. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00025-2

SPITAEELS, Freek et al., 2014a. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *PLoS ONE* [online]. **9**(4) [cit. 2022-02-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0095384

SPITAEELS, Freek et al., 2014b. Acetobacter lambici sp. nov., isolated from fermenting lambic beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **64**(Pt\_4), 1083-1089 [cit. 2022-02-18]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.057315-0

SPITAEELS, Freek et al., 2014c. Gluconobacter cerevisiae sp. nov., isolated from the brewery environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **64**(Pt\_4), 1134-1141 [cit. 2022-02-18]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.059311-0

SPITAEELS, Freek et al., 2015a. Microbiota and metabolites of aged bottled gueuze beers converge to the same composition. *Food Microbiology* [online]. **47**, 1-11 [cit. 2022-02-18]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2014.10.004

SPITAEELS, Freek et al., 2015b. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiology* [online]. **49**, 23-32 [cit. 2022-02-18]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2015.01.008

STEENSELS, Jan et al., 2015. Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **206**, 24-38 [cit. 2022-02-18]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005

STOLP, Heinz a Mortimer P. STARR, 1981. Principles of Isolation, Cultivation, and Conservation of Bacteria. STARR, Mortimer P. et al., ed. *The Prokaryotes* [online]. Berlin,

Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 135-175 [cit. 2022-03-17]. ISBN 978-3-662-13189-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-13187-9\_5

SUZUKI, Koji et al., 2006. A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **112**(2), 173-191 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x

THANKACHAN, Aswathy a Mr Bino THOMAS, 2018. A Study of Next Generation Sequencing Data, Workflow, Application and Platform Comparison. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering* [online]. **396** [cit. 2022-04-21]. ISSN 1757-899X. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/396/1/012031

TOFALO, R. a G. SUZZI, 2016. Yeasts. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, s. 593-599 [cit. 2022-03-25]. ISBN 9780123849533. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00762-5

VAN OEVELEN, D. , F. DE L'ESCAILLE a H. VERACHTERT, 1976. Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueze. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **82**(6), 322-326 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1975.tb06953.x

VAN OEVELEN, D. et al., 1977. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueze. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **83**(6), 356-360 [cit. 2022-02-18]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x

VOELKERDING, Karl V, Shale A DAMES a Jacob D DURTSCHI, 2009. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry* [online]. **55**(4), 641-658 [cit. 2022-04-25]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2008.112789

*Wild Creatures* [online], 2022. Česká republika: Ilčíková [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <http://www.wildcreatures.cz/o-nas>

WITRICK, Katherine, Eric R. PITTS a Sean F. O'KEEFE, 2020. Analysis of Lambic Beer Volatiles during Aging Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GCMS) and Gas

Chromatography–Olfactometry (GCO). *Beverages* [online]. **6**(2) [cit. 2022-02-18]. ISSN 2306-5710. Dostupné z: doi:10.3390/beverages6020031

WUNDERLICH, Sascha a Werner BACK, 2009. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. *Beer in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, s. 3-16 [cit. 2022-03-25]. ISBN 9780123738912. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-373891-2.00001-8

XIA, Kai et al., 2016. Comparative Genomics of *Acetobacterpastorianus* Ab3, an Acetic Acid Producing Strain Isolated from Chinese Traditional Rice Vinegar Meiguichu. *PLoS ONE* [online]. **11**(9) [cit. 2022-03-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0162172

ZÝBRT, Věnek, 2005. *Velká kniha piva: vše o pivu*. Olomouc: Rubico. ISBN 80-7346-054-8.



## **SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BMK	bakterie mléčného kvašení
BOK	bakterie octového kvašení
ddNMP	dideoxynukleotid monofosfát
ddNTP	dideoxynukleotid
DNA	deoxyribonukleová aminokyselina
PCR	polymerázová řetězcová reakce

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Schématický popis chmelové šišťice; přeloženo (Olšovská et al., 2016)</i> .....	16
<i>Obr. 2 Schéma buňky kvasinky; přeloženo (Tofalo a Suzzi, 2016)</i> .....	18
<i>Obr. 3 Schéma výroby řízeným způsobem fermentace; přeloženo (Wunderlich a Back, 2009)</i> .....	19
<i>Obr. 4 Základní schéma výroby klasických druhů piva a lambického druhu piva; přeloženo (De Roos a De Vuyst, 2018b)</i> .....	28
<i>Obr. 5 Hanseniaspora uvarum (Rij a Ahearn, 1968)</i> .....	32
<i>Obr. 6 Saccharomyces pastorianus (Hutzler et al., 2015)</i> .....	35
<i>Obr. 7 Acetobacter pastorianus (Xia et al., 2016)</i> .....	37
<i>Obr. 8 Lactobacillus brevis (Kimoto-Nira et al., 2015)</i> .....	38
<i>Obr. 9 Brettanomyces/Dekkara bruxellensis (Smith, 2011)</i> .....	40
<i>Obr. 10 Maxamova-Gilbertova sekvenace; přeloženo (Shetty, Amirtharaj a Shaik, 2019)</i>	44
<i>Obr. 11 Sagerova sekvenace; přeloženo (Gauthier, 2007)</i> .....	45
<i>Obr. 12 SOLiD sekvenace; přeloženo (Voelkerding, Dames a Durtschi, 2009)</i> .....	47
<i>Obr. 13 Oude Geuze Boon VAT 31 (Brewery Boon, 2021)</i> .....	48
<i>Obr. 14 Etikety piv z Gueuzerie Tilquin (Gueuzerie Tilquin, 2013)</i> .....	49
<i>Obr. 15 Liefmans Goudenband pivo (Brouwerij Liefmans, 2022)</i> .....	49
<i>Obr. 16 Oude Gueuze Anniversary Blend 2020 „Cuvée Francisca“ (Lindemans, 2022)</i> ...	50
<i>Obr. 17 Bacchus pivo (Kasteel Brouwerij Vanhonsebrouck, 2022)</i> .....	50
<i>Obr. 18 Midwinter Dream pivo (Wild Creatures, 2022)</i> .....	51
<i>Obr. 19 Wild 2019 pivo (Pivovar Lobeč, 2022)</i> .....	52
<i>Obr. 20 Wild Berry 2019 pivo (Pivovar Lobeč, 2022)</i> .....	52