

Charakteristika kmenů izolovaných z keřirových zrn a jejich využití pro výrobu fermentovaných pivních nápojů z netradičních obilovin

Characterization of the Strains Isolated from Kefir Grains and their Use for the Production of Beer-based Fermented Beverages from Nontraditional Cereals

Alexandr MIKYŠKA, Dagmar MATOULKOVÁ, Martin SLABÝ, Petra KUBIZNIAKOVÁ, Ivo HARTMAN
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 /
Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, CZ 120 44, Prague 2, Czech Republic
e-mail:mikyška@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Mikyška, A. – Matoulková, D. – Slabý, M. – Kubizniaková, P. – Hartman, I.: Charakteristika kmenů izolovaných z keřirových zrn a jejich využití pro výrobu fermentovaných pivních nápojů z netradičních obilovin. Kvasny Prum. 61, 2015, č. 10–11, s. 311–319

V příspěvku jsou prezentovány výsledky pilotních pivovarských experimentů zaměřených na produkci nových piv a pivo podobných nápojů. Mladiny ze sladované pšenice ozimé (odrůda Citrus s vysokým obsahem karotenoidů), ovsa, ječmene a kombinace sladů byly fermentovány kmeny kvasinek RIBM 163 a RIBM 164 (*Saccharomyces cerevisiae*) anebo bakterií mléčného kvašení RIBM 2-107 a RIBM 2-108 (*Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*) izolovanými z keřirových zrn. Každý z těchto kmenů je charakteristický specifickým spektrem sensoricky aktivních metabolitů. Ze sladované pšenice Citrus mohou být vyrobeny různé nápoje s velmi slibnými sensorickými vlastnostmi. Smíšenou kvasničinou a bakteriální kulturou (RIBM 2-107 + RIBM 163) byly vyrobeny nechmelené nízkoalkoholické nápoje s osvěžující citrusovou vůní a nakyslou chutí. Ze 100 % sladů Citrus anebo směsi s ječným sladem byla vyrobena piva anebo nízkoalkoholická piva s lehkou a osvěžující vůní a chutí. Kvašené nápoje z ovesného sladů mají rovněž zajímavé chuťové vlastnosti. Pivo či nízkoalkoholické pivo ze směsi ovsa a ječného sladů, fermentované kvasničným kmenem RIBM 164 se vyznačuje příjemným ovocným aroma s příjemnými silnými obilnými tóny (oves).

Mikyška, A. – Matoulková, D. – Slabý, M. – Kubizniaková, P. – Hartman, I.: Characterization of the strains isolated from kefir grains and their use for the production of beer-based fermented beverages from nontraditional cereals. Kvasny Prum. 61, 2015, No. 10–11, pp. 311–319

In this contribution, the results of the pilot brewing experiments aimed to new beers and beer-like beverages production are presented. Wort of malted winter wheat (Citrus variety with a high content of carotenoids), oats, barley and combinations thereof were fermented by yeast strains RIBM163 and RIBM 164 (*Saccharomyces cerevisiae*) and/or lactic acid bacteria RIBM2-107 and RIBM 2-108 (*Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*) isolated from kefir grains. Each of these strains is characterized by a specific spectrum of sensory active metabolites. Using Citrus malt, number of beverages with very promising sensory properties can be produced. Non-hopped low alcohol beverages with a fresh citrus aroma and acidic flavor could be made by mixed yeast and bacterial culture (RIBM 2-107+RIBM163) fermentation. Beer/low alcohol beer with a light and refreshing aromas and flavors could be produced from Citrus malt and/or mixture with barley malt. Fermented malt beverages from oats also have interesting taste characteristics. Beer/ low alcohol beer from a mixture of oats and barley malt fermented by yeast strain RIBM164 is characterized by a pleasant fruity aroma with pleasant strong grainy notes (oats).

Mikyška, A. – Matoulková, D. – Slabý, M. – Kubizniaková, P. – Hartman, I.: Die Charakteristik von den aus Kefirkörnern isolierten Stämmen und ihre Anwendung für die Herstellung der vergorenen Bier- und bierähnlichen Getränken. Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 10-11, S. 311–319

Im Artikel werden die Ergebnisse aus den Pilotbrauexperimenten, die auf die Herstellung der neuen Type des Bieres und der bierähnlichen Getränken gezielt wurden, beschrieben. Aus dem Winterweizenmalz (Sorte Citrus mit einem hohem Gehalt an Karotinoide) und aus dem Hafer, Gerste, und Malzkombination hergestellte Würzen wurden unter Anwendung von Hefestämmen RIBM 163 (Nr. der Hefesammlung des Forschungsinstitutes für Brauereien und Mälzereien in Prag) und RIBM 164 (*Saccharomyces cerevisiae*) oder mittels aus den Kefirkörnern isolierten Milchsäurebakterien RIBM 2-107 und RIBM 2-108 (*Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*) vergoren. Jeder aus den Stämmen ist durch sein Spektrum von sensorisch aktiven Metaboliten spezifisch. Aus dem gemälzten Weizen Sorte Citrus können verschiedene Getränke mit sehr viel versprechenden sensorischen Eigenschaften hergestellt werden. Unter Anwendung einer gemischten Hefe - Bakterienkultur (RIBM 2-107 + RIBM 163) wurden hopfenfreie alkoholarme Getränke mit einem erfrischenden Zitrusduft und säuerlichen Geruch hergestellt. Aus dem 100% Malz Citrus oder aus der Mischung mit Gerstenmalz wurden Bier und alkoholarme Biere mit einem leichten und erfrischenden Aroma und Geschmack hergestellt. Die aus dem Hafermalz vergorenen Getränke wiesen auch eine interessante Geschmackseigenschaften auf. Das aus der Mischung Hafer und Gerstenmalz hergestellte Bier oder alkoholarmes Bier, vergorene durch den Hefestamm RIBM 164, wiesen ein angenehmes Fruchtaroma mit schönen Tönen von Getreide (Hafer) auf.

Klíčová slova: keřirová zrna, oves, pohanka, pšenice, pivo, pivní nápoje

Keywords: kefir grains, oats, buckwheat, wheat, beer, beer-like beverages

1 ÚVOD

Pivo a pivní nápoje se v Evropě a Americe běžně vyrábějí kvašením obilných substrátů anebo směsí obilných a ovocných substrátů fermentací kvasinkami druhů *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* a *Saccharomyces bayanus*. Volbou správných surovin, produkčních kmenů a pivovarské technologie jsou pak dosaženy požadované vlastnosti nápoje. V souvislosti s trendem snižování alkoholu jsou hledány kmeny kvasinek, nebo dokonce bakterií s jeho nízkou produkcí. V pivovarství pak netradiční obiloviny nabízejí další možnosti obohacení chuti fermentovaných nápojů a obsahu zdravotně prospěšných látek.

1 INTRODUCTION

Beer and beer-like beverages are commonly produced by a fermentation of cereal substrates and/or by a mixture of cereal and fruit substrates through the yeast species *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* and *Saccharomyces bayanus* in Europe and America. With the choice of the right raw materials, production strains and brewing technology, the desired properties of the beverages are then achieved. In connection with the trend of reducing the content of alcohol, yeast, or even bacterial strains with its low production are searched. In brewing, a non-traditional cereal then offers further possibilities for enriching the flavor of fermented beverages and content of health beneficial substances are used.

Netradiční obiloviny jsou z pivovarského hlediska zajímavé z několika důvodů. Ty, které neobsahují lepek, jsou využívány pro výrobu piva a piva podobných nápojů pro celiaky (Škach et al., 2013; Deželak et al., 2014). V recepturách těchto nápojů jsou aplikovány pohanka a quinoa. Oves má v pivovarské výrobě potenciál jak nesladovaný, použitý jako surogát (Schitzenbaumer et al., 2012), tak ve formě ovesných sladů (Hubner et al., 2009; Hanke et al., 2005). V zemích tropického pásma probíhá výzkum sladovnických a pivovarských vlastností čiroku a aplikace nesladovaného/sladovaného čiroku ve výrobě piva (Adetunji et al., 2013; Agu et al., 2011).

Pšenice obecná (*Triticum aestivum* L.) je využívána jako surovina pro výrobu sladu a piva po dlouhou dobu. Arabinoxylany (pentosany) tvořící součást dietní vlákniny se vyskytují v pšenici a tím také v pšeničném sladu a pivu. Dietní vláknina je dávana do souvislosti s prevencí rakoviny tlustého střeva, jejíž výskyt se ve vyspělých zemích zvyšuje (Krahl et al., 2011). Pšenice s purpurovým perikarpem mají vysoký obsah anthokyanů zastoupených především ve formě kyanidin 3-glukosidu a peonidin 3-glukosidu (Knievel et al., 2009), pšenice s modrým aleuronem pak obsahují hlavně delphinidin 3-glukosid a delphinidin 3-rutinosid (Abdel-Aal et al., 2008). Odrůdy pšenice se žlutým endospermem obsahují více karotenoidů ze skupiny tetraterpenoidů, především lutein a zeaxanthin (Hentschel et al., 2002).

Oves setý (*Avena sativa* L.) je plodina s prospěšnými výživovými vlastnostmi. Je ověřeno příznivé fyziologické působení ovesných diet na organismus i jako prevence civilizačních onemocnění (Moudrý, 2011). Roste také zájem o využití nesladovaného ovesa nebo ovesného sladu v pivovarství. Je to dáno jednak tím, že oves bývá tolerován většinou lidí trpících celiakií a také tím, že ovesné pivo má odlišný charakter a může oslovit nové zákazníky (Klose et al., 2011, Kordialik-Bogacka et al., 2014).

Pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench) pochází z Číny a je rozšířena jako minoritní plodina po celém světě. Řadí se do skupiny pseudocereálií, což jsou plodiny, které nepatří do čeledi lipnicovitých, ale mají obdobné využití jako obiloviny (Janovská a Káš, 2012). V současné době je na trhu celá řada pohankových výrobků (kroupy, lámanka, krupice, mouka, těstoviny, vločky, čaj, pečivo, cukrářské výrobky a řada polotovarů), které jsou vhodné kromě běžných konzumentů i pro pacienty s bezlepkovou dietou (Pexová Kalinová, 2011). Kromě pohankových výrobků, je využíván také pohankový slad pro výrobu sladových nápojů (Prokeš et al., 2008), piva se sníženým obsahem glutenu (Škach et al., 2013) nebo jako součást bezlepkových výrobků (Ouhrabková et al., 2012). Pohankový slad má vysokou antioxidační aktivitu, která souvisí s obsahem polyfenolů (Gabrovská et al., 2011).

Keřirová zrna, která se používají jako spouštěče pro výrobu keřiru, jsou jedinečným společenstvím různých mikroorganismů – kombinací především bakterií mléčného kvašení, kvasinek a vláknitých hub a také bakterií octového kvašení, žijícího společně v přírodním polysacharidu (nazvaném „keřiran“) a proteinové matici. Tato symbiotická matrice tvoří elastická, slizká, bílá až světle žlutá „obilná zrna“, která se vzhledem podobají květáku. Velikost keřirových zrn je v rozmezí 1 až 3 cm v průměru (Farnworth, 2005).

Komplexní a velmi variabilní mikrobiální komunita keřirových zrn může být silně ovlivněna zeměpisným původem zrn, klimatickými podmínkami, druhem mléka používaného pro subkultivace zrn (pro opakované použití ve výrobě keřiru) (Altay et al., 2013.; Leite et al., 2013) a metodou subkultivace (například teplota, zákvasná dávka, míchání atd.). Nicméně některé druhy převládají, např. je vždy přítomen *Lactobacillus*, zatímco bakterie octového kvašení se vyskytují jen příležitostně (Garofalo et al., 2015). Hlavní bakteriální rody přítomné v keřirových zrnech zahrnují *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Acetobacter*. Hlavními rody kvasinek jsou *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Kazachstania*, *Lachancea* a *Yarrowia* (Garofalo et al., 2015; Jianzhong et al., 2009; Leite et al., 2012).

Keřir, klasifikovaný jako funkční potravina, je proměnlivý nápoj s výraznou viskozitou, chuťovými, fyzikálně-chemickými, reologickými, a nutričními vlastnostmi. Keřir je získán mléčným a alkoholovým kvašením mléka (s laktosou jako hlavním cukrem), při kterém vzniká směs kyselin mléčné a octové, různé množství ethanolu, oxidu uhličitého, acetaldehydu, acetoinu, diacetylu, atd. (Kabak a Dobson, 2011). Vzhledem k asociativnímu růstu různých mikroorganismů v průběhu mléčného kvašení se tvoří i další organické sloučeniny, jako vitamíny, bioaktivní peptidy, exopolysacharidy a bakteriociny, o nichž se předpokládá, že mají probiotické účinky na lidské zdraví (Garofalo et al., 2015).

Cílem naší práce bylo experimentální ověření potenciálu kmenů kvasinek a mléčných bakterií izolovaných z keřirových zrn v kombi-

Nontraditional cereals are, from a brewing point of view, interesting for several reasons. Those that do not contain gluten are used for the production of beer and beer-like beverages for people suffering from celiac disease (Škach et al., 2013; Deželak et al., 2014). Buckwheat and quinoa are applied in the recipes of these beverages. Oats could have a potential in brewing industry both un-malted, used as an adjunct (Schitzenbaumer et al., 2012) and in the form of oat malts (Hubner et al., 2009; Hanke et al., 2005). In the countries of the tropical zone, research on malting and brewing properties of sorghum and applications of unmalted / malted sorghum in the production of beer is being made (Adetunji et al., 2013; Agu et al., 2011).

Wheat (*Triticum aestivum* L.) have been used as a raw material for production of malt and beer for a long time. Arabinoxylans (pentosans), forming part of the dietary fiber, found in wheat and thus also in the wheat malt and beer. Dietary fiber has been associated with the prevention of colon cancer, whose incidence is increasing in developed countries (Krahl et al., 2011). Wheat with purple pericarp have a high content of anthocyanins represented primarily as cyanidin 3-glucoside and peonidin-3 glucoside (Knievel et al., 2009), wheat with blue aleurone then mainly contain delphinidin 3-glucoside and delphinidin 3-rutinoside (Abdel-Aal et al., 2008). Wheat cultivars with yellow endosperm contain more carotenoids from tetraterpenoidů, especially lutein and zeaxanthin (Hentschel et al., 2002).

Oats (*Avena sativa* L.) is a crop with beneficial nutritional properties. Beneficial physiological effects of oat diets on the body, as well as on the prevention of lifestyle diseases, is proved (Moudrý, 2011). In brewing industry, there is growing interest in the use of unmalted oats or oat malt. This is both due to the fact that oats is tolerated by most people suffering from celiac disease and that oat beer has a different character and can reach out to new customers (Klose et al., 2011; Kordialik-Bogacka et al., 2014).

Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) originating from China is extended as a minor crop worldwide. It belongs to group pseudocereals, which are crops that do not belong to the family of graminaceous, but have similar uses as cereals (Janovská and Káš, 2012). Currently, numerous buckwheat products (hail, semolina, flour, pasta, flakes, tea, pastry, cakes and many semifinished products), which are suitable in addition to ordinary consumers and patients on gluten free diet, is on the market (Pexová Kalinová, 2011). Besides buckwheat products, buckwheat malt is also used for the production of malt beverages (Prokeš et al., 2008), beers with reduced gluten content (Škach et al., 2013) or as part of gluten-free products (Ouhrabková et al., 2012). Buckwheat malt has a high antioxidant activity which relates to the content of polyphenols (Gabrovská et al., 2011).

Keřir grains, used as starters for keřir production, are unique associations of various microorganisms – combination of mainly lactic acid bacteria, yeasts and filamentous fungi and also acetic acid bacteria, cohabiting in a natural polysaccharide (called “keřiran”) and protein matrix. This symbiotic matrix forms elastic, slimy and white to light yellow “grains” that resemble cauliflowers. The size of keřir grains is ranging from 1 to 3 cm in diameter (Farnworth, 2005). A complex and extremely variable microbial community of keřir grains can be strongly influenced by the geographical origin of the grains, the climatic conditions, type of milk used for sub-culturing of grains (for repeated use in keřir production) and by the sub-culturing method (e.g. temperature, pitching rate, agitation etc.) (Altay et al., 2013; Leite et al., 2013). Nevertheless, some species predominate, e.g. *Lactobacillus* species are always present, while acetic acid bacteria occur only occasionally (Garofalo et al., 2015). The main bacterial genera present in keřir grains include *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Acetobacter*. The main yeast genera are *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Kazachstania*, *Lachancea* and *Yarrowia* (Garofalo et al., 2015; Jianzhong et al., 2009; Leite et al., 2012).

Keřir, classified as a functional food, is a variable beverage with distinctive viscosity, flavour and physicochemical, rheological, and nutritional properties. It is obtained through a lactic/aleoholic fermentation of milk (with lactose as a main sugar) giving a rise to a mixture of lactic and acetic acid, various amounts of ethanol, carbon dioxide, acetaldehyde, acetoin, diacetyl, etc. (Kabak and Dobson, 2011). Because of associative growth of the variety of microorganisms during milk fermentation other organic compounds are also formed, like vitamins, bioactive peptides, exopolysaccharides, bacteriocins, which are presumed to have a probiotic effect on human health (Garofalo et al., 2015).

The aim of our study was an experimental verification of the potential of yeasts and lactic bacteria strains isolated from keřir grains

naci se slady z netradičních obilovin pro výrobu piv a pivu podobných fermentovaných nápojů.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Mikrobiální kultury izolované z keřirových zrn

Kmeny kvasinek a bakterií byly izolovány z keřirových zrn postupem popsaným Witthuhnem et al. (2004). Izolované kmeny byly poté charakterizovány biochemickými testy a druhově specifickou PCR. Bakteriální kmeny byly identifikovány a charakterizovány pomocí biochemického testu API 50CH (BioMérieux); identifikace byla ověřena pomocí PCR podle Warda a Timminse (1999). Pro identifikaci kvasinek byl použit biochemický test ID32C (bioMérieux). Přesnost biochemických testů byla ověřena pomocí PCR postupem podle Josepa et al. (2000).

Na základě předběžných laboratorních fermentačních testů byly vybrány pro pivovarské zkoušky dva kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM 163 a RIBM 164) a *Lactobacillus* sp. (RIBM 2-107 a RIBM 2-108). Kmeny byly zařazeny do mezinárodní kodifikované sbírky mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (kódový název RIBM 655).

Charakteristika kmenů:

RIBM 163 and RIBM 164 (obr. 1, 1a): Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které fermentují glukosu, sacharosu, maltosu a rafinosu a které nejsou schopny fermentovat galaktosu, laktosu, trehalosu a melibiosu. Buňky jsou elipsoidní a kulovité o velikosti 6

in combination with malted non-traditional for the beer and beer-like fermented beverages production.

2 MATERIAL AND METHODS

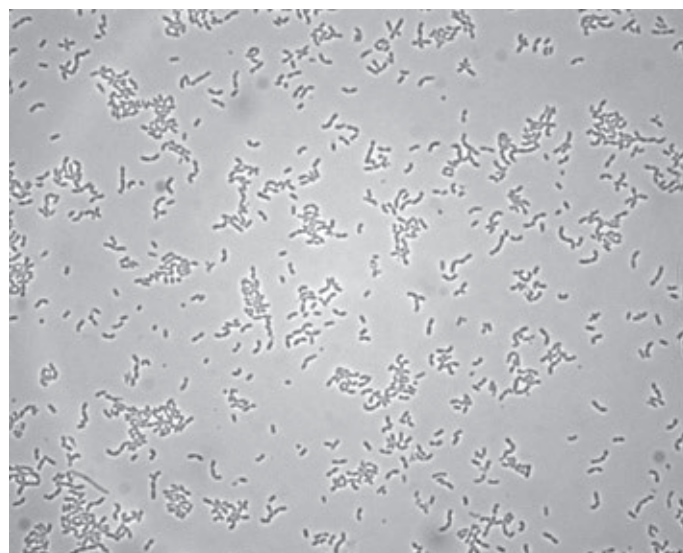
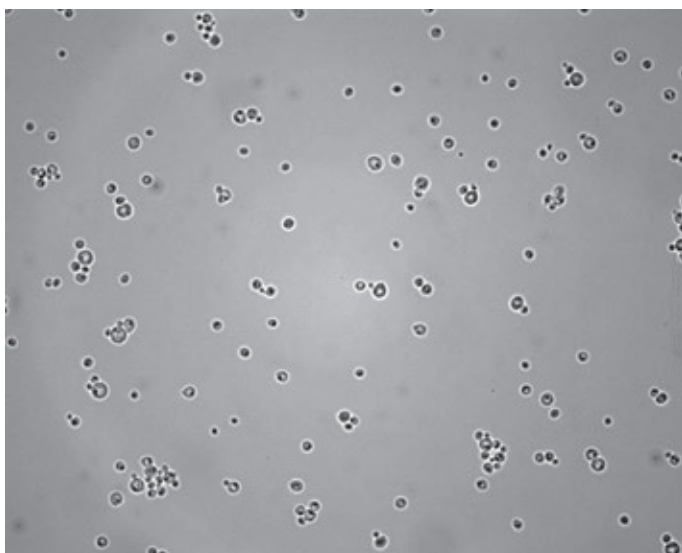
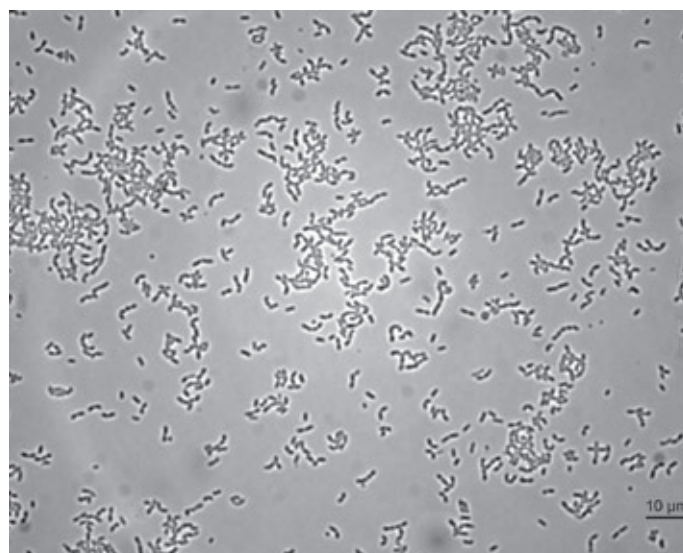
2.1 Microbial cultures isolated from kefir grains

Strains of yeast and bacteria were isolated from kefir grains as described by Witthuhn et al. (2004). Isolated strains were then characterized by biochemical tests and species-specific PCR. Bacterial strains were identified and characterized using biochemical test API 50CH (bioMérieux); the identification was verified with PCR according to Ward and Timmins (1999). Biochemical test ID32C (bioMérieux) was used for identification of yeasts. The accuracy of biochemical tests was verified using PCR according to Josepa et al. (2000).

Based on preliminary laboratory fermentations tests, two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM 163 and RIBM 164) and *Lactobacillus* sp. (RIBM 2-107 and RIBM 2-108) were selected for brewing trials. Strains were included in the internationally codified Collection of Microorganisms of the Research Institute of Brewing and Malting in Prague (codename RIBM 655).

Characterization:

RIBM 163 and RIBM 164 (Fig. 1, 1a): Strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, which ferments glucose, saccharose, maltose and raffinose, and which does not ferment galactose, lactose, trehalose and melibiose. Cells are ellipsoidal and spherical with size 6–10 microns x 5–8 microns, which does not form mycelium and



Obr. 1 Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 163 / Fig. 1 Yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* RIBM 163

Obr. 2 Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107 / Fig. 2 Bacteria strain *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107

Tab. 1 Výsledky analýzy sladů připravených pro varní experimenty /
Table 1 Results of analyzes of malts prepared for brewing experi-
ments

| Slad / Malt | | Pšenice / Wheat | Oves / Oat | Pohanka / Buckwheat | Ječmen / Barley |
|---|---------------|--------------------|---------------|------------------------|--------------------|
| Sladování / Malting | dny / days | 6 | 7 | 4 | 5 |
| Voda / Moisture | % | 5.8 | 4.6 | 3.6 | 4.3 |
| Zcukření / Saccharization | min | 10 | 28 | – | 10 |
| Zákal / Haze 15° | EBC | 1.10 | 3.36 | 9.90 | 0.90 |
| Zákal / Haze 90° | EBC | 0.75 | 4.27 | 5.10 | 0.79 |
| Barva / Colour | EBC | 3.2 | 4.3 | 2.9 | 2.7 |
| pH / pH | | 6.17 | 5.97 | 6.19 | 6.00 |
| Viskozita / Viscosity | mPa.s | 1.67 | 1.55 | 2.10 | 1.48 |
| Extrakt / Extract | % | 83.1 | 59.1 | 79.9 | 83.3 |
| Rozdíl extraktů / Extract difference DLFU | % | 1.4 | 0.2 | – | 1.5 |
| Relativní extrakt / Relative extract 45° | % | 30.9 | 29.7 | – | 34.5 |
| Prokvašení / Limit attenuation | % | 80.2 | 80.4 | – | 79.6 |
| Diastatická mohutnost / Diastatic power | WK | 342 | 35 | – | 302 |
| Bílkoviny / Protein | % | 12.7 | 10.3 | 14.5 | 9.2 |
| Rozpuštěný dusík / Soluble nitrogen | mg/L | 86 | 61 | 99 | 72 |
| Kolbachovo číslo / Kolbach index | % | 38.5 | 32.2 | 36.3 | 41.1 |
| Friabilita / Friability | % | 28.6 | 79.3 | – | 90.1 |
| Beta glukany / Beta glucan | mg/l | 38 | 107 | – | 284 |

až 10 µm x 5-8 µm, netvoří mycelium a jen zřídka tvoří pseudomycelium. V kapalném prostředí buňky tvoří sediment.

RIBM 2-107 and RIBM 2-108 (obr. 2, 2a): Kmeny bakterií *Lactobacillus paracasei*, které fermentují glukosu, fruktosu, sacharosu, maltosu, galaktosu, melezitosu, rafinosu a glukonát za tvorby mléčné kyseliny nebo směsi mléčné kyseliny, octové kyseliny a ethanolu, a které nejsou schopny fermentovat sorbosu, manitol, sorbitol, glycerol a N-acetylglucosamin. Kmeny se liší v tvorbě sensoricky aktivních sekundárních metabolitů.

2.2 Slady

Zrno pšenice Citrus (nové odrůdy s vysokým obsahem karotenoidů), ovesa, pohanky a ječmene bylo sladováno v mikroskladovně s použitím režimu sladování optimalizovaného pro každý druh obiloviny. Popis sladování je uveden níže. Kvalitativní parametry sladů jsou uvedeny v tab. 1.

Pšenice ozimá (6 dnů)

Máčení: Voda 1. den 4 hodiny, 2. den 6 hodin. Třetí den byl obsah vody v zrně upraven namočením nebo dokropením na 45 %. Teplota vody a teplota vzduchu v průběhu vzdušných přestávek byla 14 °C.

Klíčení: Klíčení probíhalo při teplotě 14 °C, celkový čas máčení a klíčení byl 6 dnů.

Oves setý (7 dnů)

Máčení: Voda 1. den 4 hodiny, 2. den 4 hodiny. Třetí den byl obsah vody v zrně upraven dokropením na 45 %. Teplota vody a teplota vzduchu v průběhu vzdušných přestávek byla 14 °C.

Klíčení: Klíčení probíhalo při teplotě 14 °C, celkový čas máčení a klíčení byl 7 dnů.

Tab. 2 Výsledky analýzy mladiny I. Série / Table 2 Results of wort
analyses I. Series

| Slad / Malt | | Pšenice / Wheat | Oves / Oat | Pohanka + ječmen / Buckwheat + Barley |
|--|-------|--------------------|---------------|--|
| Extrakt / Extract | % w. | 10.36 | 10.15 | 10.37 |
| Dosažitelné prokvašení / Limit attenuation | % | 74.2 | 74.2 | 63.8 |
| Celkové polyfenoly / Total polyphenols | mg/l | 38 | 58 | 255 |
| Flavanoidy / Flavonoids | mg/l | 6,03 | 5,7 | 57.62 |
| pH / pH | | 6.13 | 5.86 | 5.99 |
| Barva / Colour | j.EBC | 8.04 | 47.8 | 11.85 |
| Aminodusík / FAN | mg/l | 145 | 171 | 193 |
| Celkový dusík / Total nitrogen | mg/l | 976 | 881 | 1007 |

rarely forms pseudomycelium. In a liquid medium, cells forming sediment.

RIBM 2-107 and RIBM 2-108 (Fig. 2, 2a): Strains of *Lactobacillus paracasei* bacteria, which ferments glucose, fructose, saccharose, maltose, galactose, melezitose, raffinose and gluconate under formation of lactic acid or a mixture of lactic acid, acetic acid and ethanol, and which does not ferment sorbose, mannitol, sorbitol, glycerol and N-acetylglucosamine. Strains differ in the formation of sensory active secondary metabolites.

2.2 Malts

Grain of Citrus wheat (new variety with a high content of carotenoids), oat, buckwheat and barley have been malted on laboratory malthouse using malting process regime optimized for each type of cereal. Description of malting process is given below. Qualitative parameters of malts are given in Table 1.

Winter wheat (6 Days)

Steeping: Water 1st day 4 hours, 2nd day 6 hours. The third day the water content in the grain was adjusted by dipping or sprinkling at 45%. During the air breaks the temperature of both water and air was 14 °C.

Germination: Germination was carried out at 14 °C, the total time of steeping and germination was 6 days.

Oat (7 Days)

Steeping: Water 1st day 4 hours second day 4 hours. The third day the water content in the grain was adjusted to 45% by sprinkling. During the air breaks the temperature of both water and air was 14 °C.

Germination: Germination was carried out at 14 °C, the total time of steeping and germination was 7 days.

Buckwheat (4 Days)

Mechanically hulled buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), free of debris, achenes and dust was used as a raw material.

Steeping: Water 1st day 1 hour, dipping is carried out with slow relief water to remove impurities floating on the surface. The next day, the water content was adjusted to 45% by sprinkling. During the air breaks the temperature of both water and air was 18 °C.

Germination: Germination was carried out at 18 °C, the total time of steeping and germination was four days.

Kilning was identical for all crops and it was carried out on one hazel electrically heated kiln 1 x 22 hours, pre-drying at a temperature of 55 °C for 12 hours and at kilning at 80 °C for 4 hours.

2.3 Brewing trials

Worts were prepared in the pilot brewery (50 l), using the infusion mashing procedure. Then worts were boiled for 70 minutes for the exclusion of thermolabile substances. The main fermentation was

Tab. 3 Výsledky analýzy piva I. Série / Table 3 Results of beer analyses I. Series

| Slad / Malt | | Pšenice / Wheat | | Oves / Oat | | Pohanka+ječmen / Buckwheat+Barley | |
|---|------|----------------------|---------|------------------------|----------|--------------------------------------|---------|
| Kmen / Strain | | RIBM2-107 RIBM163 | RIBM164 | RIBM2-107 RIBM2-108 | RIBM 164 | RIBM2-107 RIBM2-108 | RIBM164 |
| Extrakt původní mladiny / Original extract | % w | 10.2 | 10.2 | 10.0 | 9.9 | 10.2 | 10.2 |
| Zdánlivé prokvašení / Apparent attenuation | % | 65.6 | 60.6 | 55.6 | 56.4 | 40.7 | 39.4 |
| Skutečné prokvašení / Real attenuation | % | 52.9 | 48.8 | 44.8 | 45.4 | 32.8 | 31.7 |
| Dosažitelné prokvašení / Limit attenuation | % | 74.2 | 74.2 | 74.2 | 74.2 | 63.8 | 63.8 |
| Alkohol / Alcohol | % v | 3.52 | 3.26 | 2.95 | 2.96 | 2.2 | 2.13 |
| pH / pH | | 3.40 | 3.32 | 3.50 | 3.43 | 3.45 | 3.52 |
| Barva / Colour | EBC | 8.9 | 7.8 | 23.6 | 25.9 | 11.8 | 15.2 |
| Celkové polyfenoly / Total polyphenols | mg/l | 43 | 43 | 48 | 49 | 239 | 237 |
| Flavonoidy / Flavonoids | mg/l | 38.9 | 33.2 | 4.0 | 8.4 | 36.9 | 37.2 |
| DPPH-ARP | % | 26 | 27 | 26 | 26 | 52 | 53 |

RIBM2-107, RIBM2-108: *Lactobacillus casei* subsp. *Paracasei* kmeny/strainsRIBM163, RIBM164: *Saccharomyces cerevisiae* kmeny/strains

DPPH-ARP: Antiradikálová aktivita/Antiradical activity

Pohanka (4 dny)

Jako surovina byla použita mechanicky loupaná pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* Moench.), zbavená zlomků nažek a prachu.

Máčení: Délka namáček 1. den 1 hodina, máčení se provádí s pomalým přepouštěním vody, aby se odstranily na hladině plovoucí nečistoty. Druhý den byl obsah vody upraven dokropením tak, aby pohanka obsahovala 45 % vody. Teplota vody a teplota vzduchu v průběhu vzdušné přestávky byla 18 °C.

Klíčení: Klíčení probíhalo při teplotě 18 °C, celkový čas máčení a klíčení byl 4 dny.

Hvozdění bylo u všech plodin shodné a probíhalo na jednodílném, elektricky vyhřívaném hvozdě 1 x 22 hodin, při teplotě předsoušení 55 °C po dobu 12 hodin a při dotahovací teplotě 80 °C po dobu 4 hodin.

2.3 Pivovarské zkoušky

Sladiny byly připraveny v pilotním pivovaru (50 l) infuzním postupem rmutování. Sladiny byly poté vařeny po dobu 70 min pro vyloučení termolabilních látek. Hlavní kvašení probíhalo při teplotě 15 °C po dobu 12 dnů. Dokvašování bylo po dobu 4 týdnů při teplotě 2 °C. Závazná dávka kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM 163, RIBM 164) byla 15 milionů buněk/ml, závazná dávka bakterií *Lactobacillus* sp. (RIBM 2-107, RIBM 2-108) byla 15 až 20 milionů buněk/ml. V první sérii byla část každé várky ve sklepě chmelena komerčním preparátem iso-alfa kyselin. Ve druhé sérii fermentované kvasinkami (RIBM 163, RIBM 164) byla piva se sníženým obsahem alkoholu chmelena chmelovým granulátem. Piva byla zfiltrována, plněna do lahví a pasteurována. Rozbory byly provedeny podle Analytiky EBC (EBC, 2010). Sensorické hodnocení bylo provedeno certifikovaným panelem VÚPS.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Analytické parametry sladů (tab. 1) ukazují, že ovesný slad má nízkou diastatickou mohutnost, ale při prodloužené době zcukří uspokojivě. Pohankový slad není možno zpracovat bez dodatku hydrolytických enzymů. Při laboratorní analýze je pohankový slad mísen s ječným sladem. Sladiny z ovesného a pohankového sladu se vyznačují relativně vysokým jemným, koloidním zákalem (4,3 a 5,1 j. EBC). Barva sladin z pšenice Citrus, ova a pohanky byla v rozmezí pšezenských sladů.

Pokusné 10% sladiny (považené sladiny) z pšenice Citrus a ova měly dosažitelné prokvašení 74 %, sladina ze směsi pohanka + ječmen měla hodnotu ještě nižší (64 %). Dosažitelné prokvašení sladin z ječných sladů je běžně v rozmezí 75–80 %. Obsah aminodusíku ve všech sladinách byl na vyhovující úrovni, 145 až 193 mg/l. Sladina z ova byla zakalená (tab. 2).

carried out at 15 °C for 12 days. Secondary fermentation was carried out at 2 °C for 4 weeks. Pitching dose of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM 163, RIBM 164) and bacteria - *Lactobacillus* sp. (RIBM 2-107, 2-108 RIBM) was 15 million cells/ml and 15–20 million cells/ml respectively.

In a first series, part of each brew was hopped by commercial iso-alpha-acid preparation in lager cellar. In the second series fermented by yeast strains (RIBM 163, RIBM 164), beers with reduced alcohol content were hopped by hop granulate. Beers were filtered, bottled and pasteurized.

Analyses were performed according to Analytik EBC (EBC, 2010). Sensory evaluation was carried out by a certified panel of RIBM.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Analytical parameters of malts (Table 1) indicate that oat malt has a low diastatic power, but at the extended time, saccharification is satisfactory. Buckwheat malt cannot be processed without the addition of hydrolytic enzymes. In the laboratory analysis, this malt is mixed with barley malt. Wort from oat or buckwheat malt is characterized by a relatively high fine, colloidal haze (4.3 and 5.1 EBC units). Color of worts from Citrus wheat, oats and buckwheat was in the range of Pilsner malt.

Limit attenuation of experimental 10 °P wort (boiled wort) from Citrus wheat and oats had reached 74%, value of wort from a mixture of buckwheat+barley was even lower (64%). Limit attenuation of worts from barley malt is typically in the range 75–80%. The content of amino nitrogen in all worts was on satisfactory level from 145 to 193 mg / l. Wort from oats was opaque (Table 2).

In a first series of experiments, beer was made of malted wheat, oat and a mixture of buckwheat + barley malt (1:1). Original extract was of about 10%. Fermentation either by yeast strain RIBM 164, mixed bacterial culture RIBM 2-107 +RIBM 2-108 (oats, buckwheat) or mixed bacterial / yeast culture RIBM 2-107 + RIBM 163 was carried out. The selection of strains was based on preliminary laboratory fermentation tests. Attenuation decreased in a number of wheat (65%), oat (55%) + buckwheat barley (40%). pH of beers moved from 3.3 to 3.5. Beer from oat malt was hazy (Table 4).

The content and composition of sensory active volatile compounds, higher alcohols and esters, depended increasingly on grains (malt), rather than on the used production strain (yeasts, bacteria). In wheat beers, the high content of higher alcohols and esters was determined (Table 3). Beers from oats and buckwheat malts was characterized by low content of esters. High levels of dimethyl sulfide, reaching almost 500 µg/l was found in the beers of oat malt. Sensory thresh-

Tab. 4 Obsah sensoricky aktivních těkavých látek v pivu I. série (mg/l) / Table 4 Content of sensory active volatiles in beer I. Series (mg/l)

| Slad / Malt | Pšenice / Wheat | | Oves / Oat | | Pohanka+ječmen / Buckwheat+Barley | | Ječmen / Barley |
|--|----------------------|---------|------------------------|----------|-----------------------------------|---------|-----------------|
| | RIBM2-107 RIBM163 | RIBM164 | RIBM2-107 RIBM2-108 | RIBM 164 | RIBM2-107 RIBM2-108 | RIBM164 | RIBM 95 |
| Altaldehyd / Acetaldehyde | 11.53 | 12.44 | 2.24 | 1.36 | 0.84 | 6.48 | 4.20 |
| Dimethylsulfid / Dimethyl sulphide (µg/l) | 111 | 114 | 484 | 462 | 16 | 41 | 23 |
| Mravenčan ethylnatý / Ethyl formiate | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.60 |
| Octan ethylnatý / Ethyl acetate | 30.50 | 32.66 | 8.23 | 7.16 | 7.55 | 7.63 | 20.50 |
| Octan propylnatý / Propyl acetate | 0.10 | 0.12 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.02 |
| Octan isobutylnatý / Iso-butyl acetate | 0.18 | 0.20 | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.06 | 0.07 |
| Máselnan ethylnatý / Ethyl butyrate | 0.11 | 0.09 | 0.03 | 0.02 | 0.05 | 0.05 | 0.07 |
| Propanol / Propanol | 47.0 | 48.0 | 12.2 | 16.8 | 9.7 | 10.0 | 13.5 |
| Octan butylnatý / Butyl acetate | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.70 |
| Isobutanol / Iso-butanol | 20.6 | 21.8 | 13.4 | 10.9 | 6.6 | 7.3 | 9.1 |
| Octan isoamylnatý / Iso-amyl acetate | 3.04 | 3.20 | 0.25 | 0.21 | 0.95 | 1.10 | 1.14 |
| 2 a 3-methyl-butanol / 2- and 3-methyl butanol | 74.1 | 79.6 | 31.3 | 35.5 | 26.5 | 30.3 | 42.5 |
| Kapronan ethylnatý / Ethyl hexanoate | 0.43 | 0.32 | 0.05 | 0.05 | 0.14 | 0.22 | 0.08 |
| Mléčnan ethylnatý / Ethyl lactate | 2.91 | 2.23 | 1.51 | 2.44 | 1.38 | 1.06 | 0.06 |
| Kaprylan ethylnatý / Ethyl octoate | 0.18 | 0.20 | 0.09 | 0.06 | 0.08 | 0.08 | 0.91 |
| Ethyl-hexanol / Ethyl hexanol | 0.63 | 0.51 | 0.34 | 0.48 | 0.24 | 0.26 | 0.20 |
| Octan fenylatý / Phenyl acetate | 0.01 | 0.01 | 0.05 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| Kaprinan ethylnatý / Ethyl decanoate | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | <0.01 |
| Furfural / Furfural | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.04 | 0.02 |
| Octan fenyl-ethylnatý / Phenyl-ethyl acetate | 1.61 | 1.54 | 0.20 | 0.16 | 0.25 | 0.27 | 0.44 |
| Lauran ethylnatý / Ethyl dodecanoate | 0.01 | 0.00 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.01 |
| β-fenyl-alkohol / β-phenyl alcohol | 26.1 | 25.5 | 16.6 | 17.0 | 8.9 | 8.7 | 12.3 |
| Myristan ethylnatý / Ethyl myristate | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.03 | 0.02 | 0.02 |
| Palmitan ethylnatý / Ethyl palmitate | 0.01 | 0.00 | 0.11 | 0.08 | 0.07 | 0.04 | <0.01 |
| Alkoholy / Alcohols | 168.5 | 175.4 | 73.8 | 80.6 | 52.1 | 56.6 | 77.5 |
| Estery / Esters | 39.1 | 40.6 | 10.6 | 10.3 | 10.6 | 10.6 | 24.6 |
| A / E Poměr/Ratio | 4.31 | 4.32 | 6.95 | 7.85 | 4.91 | 5.34 | 3.15 |

RIBM2-107, RIBM2-108: *Lactobacillus casei* subsp. *Paracasei* kmeny/strainsRIBM163, RIBM164: *Saccharomyces cerevisiae* kmeny/strains

RIBM 95: Běžný kmen spodních kvasnic/Common lager yeast strain

Tab. 5 Sensorická kvalita piv I. série / Table 5 Sensory quality of beers I. Series

| Slad / Malt | Pšenice / Wheat | | | | Oves / Oat | | | | Pohanka + ječmen / Buckwheat + Barley | | | |
|------------------------------------|----------------------|-----|---------|-----|------------------------|-----|----------|-----|---------------------------------------|-----|---------|-----|
| | RIBM2-107 RIBM163 | | RIBM164 | | RIBM2-107 RIBM2-108 | | RIBM 164 | | RIBM2-107 RIBM2-108 | | RIBM164 | |
| Kmen / Strain | | h | | h | | h | | h | | h | | h |
| Říz / Carbonation | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Plnost / Body-fulness | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Hořkost / Bitterness | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 |
| Trpkost / Astringency | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1.5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Sladkost / Sweetness | 2 | 2 | 1 | 2 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 3.5 | 4 | 2.5 | 3 |
| Kyselost / Sourness | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2.5 | 2.5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Ovocná-esterová / Fruity-esteric | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Kvasničná / Yeasty | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1.5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Obilná / Grainy | – | – | – | – | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Kovová / Metal | – | – | – | – | – | – | – | – | 1.5 | 2 | 1 | 1 |
| Celkový dojem / Overall impression | 3.2 | 3.5 | 3.4 | 3.9 | 5.6 | 6 | 6.4 | 5.9 | 5.6 | 6 | 5 | 5.5 |

Deskriptory: rostoucí škála 0–5 / Descriptors: ascending scale of 0 (imperceptible) to 5 (very strong)

Celkový dojem: sestupná škála 1-9 / Overall impression: descending scale of 1-9

Tab. 6 Obsah senzorycky aktivních těkavých látek v pivo II. série (mg/l) / Table 6 Content of sensory active volatiles in beer II. Series (mg/l)

| Slad / Malt | Pšenice+ječmen / Wheat+Barley | | Oves+ječmen / Oat+Barley | |
|--|----------------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Kmen / Strain | RIBM164 | RIBM95 | RIBM164 | RIBM95 |
| Actaldehyd / Acetaldehyde | 2.4 | 2.5 | 5.31 | 2.5 |
| Dimethylsulfid / Dimethyl sulphide (µg/l) | 12 | 9 | 3 | 5 |
| Mravenčan ethylnatý / Ethyl formiate | 0.04 | 0.07 | 0.08 | 0.06 |
| Octan ethylnatý / Ethyl acetate | 31.90 | 17.70 | 39.30 | 19.33 |
| Octan propylnatý / Propyl acetate | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| Octan isobutylnatý / Iso-butyl acetate | 0.18 | 0.09 | 0.12 | 0.12 |
| Máselnan ethylnatý / Ethyl butyrate | 0.06 | 0.02 | 0.05 | 0.05 |
| Propanol / Propanol | 12.12 | 11.60 | 8.33 | 6.07 |
| Octan butylnatý / Butyl acetate | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| Isobutanol / Iso-butanol | 23.25 | 23.29 | 11.22 | 14.62 |
| Octan isoamylnatý / Iso-amyl acetate | 1.58 | 1.22 | 3.59 | 1.46 |
| 2a3-methyl-butanol / 2- and 3-methyl butanol | 95.70 | 67.70 | 94.98 | 61.47 |
| Kapronan ethylnatý / Ethyl hexanoate | 0.10 | 0.05 | 0.13 | 0.07 |
| Mléčnan ethylnatý / Ethyl lactate | 0.27 | 0.19 | 0.10 | 0.18 |
| Kaprylan ethylnatý / Ethyl octoate | 0.23 | 0.10 | 0.17 | 0.05 |
| Ethyl-hexanol / Ethyl hexanol | 0.59 | 0.80 | 0.62 | 0.62 |
| Octan fenylnatý / Phenyl acetate | 0.15 | 0.03 | 0.06 | 0.02 |
| Kaprinan ethylnatý / Ethyl decanoate | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| Furfural / Furfural | 0.04 | 0.15 | 0.04 | 0.04 |
| Octan fenyl-ethylnatý / Phenyl-ethyl acetate | 1.23 | 0.87 | 2.94 | 0.94 |
| Lauran ethylnatý / Ethyl dodecanoate | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| β-fenyl-alkohol / β-phenyl alcohol | 25.91 | 19.15 | 32.83 | 19.94 |
| Myristan ethylnatý / Ethyl myristate | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Palmitan ethylnatý / Ethyl palmitate | 0.36 | 0.33 | 0.29 | 0.03 |
| Alkoholy / Alcohols | 157.6 | 122.7 | 148.0 | 102.8 |
| Estery / Esters | 36.2 | 20.7 | 46.9 | 22.4 |
| A / E Poměr / Ratio | 4.36 | 5.92 | 3.16 | 4.60 |

V první sérii pokusů byla piva vyrobená ze sladované pšenice, ovesa a směsi pohanky + ječného sladu (1:1). Původní extrakt mladiny byl asi 10 %. Fermentace byla provedena buď kmenem kvasinek VÚPS 164, směsnou bakteriální kulturou VÚPS 2-107 + VÚPS 2-108 (oves, pohanka), nebo směsnou bakteriální / kvasničnou kulturou VÚPS 2-107 + VÚPS 163. Výběr kmenů byl založen na předběžných laboratorních fermentačních testech. Prokvašení piv klesalo v řadě pšenice (65 %), oves (55 %) pohanka + ječmen (40 %). pH piva se pohybovalo od 3,3–5,3. Pivo z ovesného sladu bylo zakalené (tab. 4).

Obsah a složení senzorycky aktivních těkavých sloučenin, vyšších alkoholů a esterů, závisel větší měrou na obilovině (sladu), než na použitém produkčním kmenu (kvasinky, bakterie). V pšeničných pivech byl stanoven vysoký obsah vyšších alkoholů a esterů (tab. 3). Piva z ovesného a pohankového sladu se vyznačovala nízkým obsahem esterů. V pivech z ovesného sladu byl nalezen vysoký obsah dimethylsulfidu, dosahující téměř 500 µg/l. Senzorická prahová hodnota je 35–40 µg/l, v koncentraci 100 µg/l dává dimethylsulfid pivu prokazatelně příchut mladinou a po vaření zelenině (Basařová et al., 2010). V senzoryckém hodnocení se dopad dimethylsulfidu neprojevil.

Všechna piva vyrobená z pšeničného sladu měla nejlepší výsledky senzoryckého hodnocení. Nechmelená varianta „piv“, vyrobených z ovesa nebo pohanky a fermentovaných bakteriální kulturou, byla hodnocena lépe než hořká varianta, chmelení hotových piv iso-alfa extraktem. Pivo z pohanky mělo nepříjemnou, „nechmelovou“ hořkost (tab. 5).

Senzorycká deskriptivní analýza sice popisuje jednotlivé chuti a vůně, celkový charakter piva (nápoje) však čtenáři přibližuje spíše „sommeliérský“ popis. V následujícím přehledu je uveden takový popis nápojů připravených v I. sérii experimentů.

old is 35–40 µg/l, the dimethyl sulfide concentration of 100 µg/l, gives the beer provably worty and cooked vegetables off-flavor (Basařová et al., 2010). However, dimethylsulfide showed no impact in the sensory evaluation.

All beers made from wheat malt had the best results of sensory evaluation. For beers produced from oat or buckwheat and fermented with bacterial culture, non-hopped variant was assessed better than bitter variant, hopping of finished beer by iso-alpha extract. Beer made from buckwheat had unpleasant “non-hoppy” bitterness (Table 5).

Although sensory descriptive analysis describes the individual tastes and aromas, the readers rather tend to the ‘sommelier’ description of the character of the beer (drink). In the following list, such description of a drinks prepared in the first series of experiments is shown.

Wheat. RIBM 2-107 + RIBM 163

Beverage with a fruity aroma with grapefruit overtones. In aromas, traces of yeast are recognizable. The fragrance is light and refreshing. Acidity does not interfere with the taste. Flavor profile is harmonized, pleasantly refreshing.

Wheat. RIBM 164

Beverage with a fruity aroma with grapefruit overtones. In aromas, traces of yeast are more pronounced. The fragrance is light and refreshing. Acidity does not interfere with the taste. The flavor profile is fairly harmonized, pleasantly refreshing.

Oat. RIBM 2-107 + RIBM 2-108

Beverage with a fruity aroma, strong, pleasant tones of grain (oats) and a sour smell. In aromas, traces of yeast are recognizable. Acidity is a moderate to pungent. In a hopped variant, bitterness collides with the overall sensory profile.

Oat. RIBM 164

Beverage with a fruity aroma, strong, pleasant tones of grain (oats) and a sour smell. In aromas are recognizable traces of yeast. Acidity is a moderate to pungent. In a hopped variant bitterness collides with the overall sensory profile.

Buckwheat + barley. RIBM 2-107 + RIBM 2-108

Beverage with a fruity aroma and a strong, pleasant tones of corn (sweet cereal). Acidity is moderately strong and acrid. Very unpleasant astringency passing through into a metal. In a hopped variant, bitterness collides with the overall sensory profile.

Buckwheat. RIBM 164

Beverage with a fruity aroma a strong, pleasant tones of corn (sweet cereal). Acidity is moderately strong and acrid. Unpleasant astringency passing through into a metal. In a hopped variant bitterness collides with the overall sensory profile.

In a second series of experiments, low alcohol commonly hopped beer (alcohol to 2% by volume) was made from wheat or oat malt, both mixed with barley malt 1:1. RIBM 164 strain was compared with common lager strain RIBM 95. The higher levels of flavor active compounds (Table 6) and better results of sensory evaluation (Table 7) for beer fermented with RIBM 164 strain were accessed. Sommelier evaluation of beers is shown below.

Pšenice. RIBM 2-107 + RIBM 163

Nápoj s ovocnou vůní s grepovými podtóny. Ve vůni jsou rozeznatelné stopy kvasnic. Vůně je lehká a osvěžující. Kyselost nenarušuje celkovou chuť. Chuťový profil je sladěný, příjemně osvěžující.

Pšenice. RIBM 164

Nápoj s ovocnou vůní s grepovými podtóny. Ve vůni jsou výraznější stopy kvasnic. Vůně je lehká a osvěžující. Kyselost nenarušuje celkovou chuť. Chuťový profil je poměrně sladěný, příjemně osvěžující.

Oves. RIBM 2-107 + RIBM 2-108

Nápoj s ovocnou vůní se silnými, příjemnými obilnými tóny (oves) a nakyslou vůní. Ve vůni jsou rozeznatelné stopy kvasnic. Kyselost je středně silná až štiplavá. Ve chmelené variantě hořkost koliduje s celkovým sensorickým profilem.

Oves. RIBM 164

Nápoj s ovocnou vůní se silnými, příjemnými obilnými tóny (oves) a nakyslou vůní. Silnější kvasničné tóny. Kyselost je středně silná a až štiplavá. Ve chmelené variantě hořkost koliduje s celkovým sensorickým profilem.

Pohanka + ječmen. RIBM 2-107 + RIBM 2-108

Nápoj s ovocnou vůní a silnými obilnými tóny (sladká, obilná). Kyselost je středně silná a štiplavá. Velmi nepříjemná trpkost přecházející až do kovové chuti. Ve chmelené variantě hořkost koliduje s celkovým sensorickým profilem.

Pohanka. RIBM 164

Nápoj s ovocnou vůní a silnými obilnými tóny (sladká, obilná). Ve vůni jsou výraznější stopy kvasnic. Kyselost je středně silná až štiplavá. Nepříjemná trpkost přecházející až do kovové chuti. V dohořčené variantě hořkost koliduje s celkovým sensorickým profilem.

Ve druhé sérii pokusů byla z pšeničného nebo ovesného sladu ve směsi s ječným sladem 1:1 vyrobena nízkoalkoholická, běžně chmelená piva (alkohol do 2 % objemových). Pro pivo kvašené kmenem RIBM 164 byl stanoven vyšší obsah sensoricky aktivních látek (tab. 6) a lepší výsledky sensorického hodnocení (tab. 7). Sommelierské hodnocení piv je uvedeno níže.

Pšenice + ječmen. RIBM 164

Nápoj s ovocnou vůní s obilnými podtóny. Ve vůni jsou výraznější stopy kvasnic. Vůně je lehká a osvěžující. Kyselost nenarušuje celkovou chuť. Chuťový profil je poměrně sladěný.

Oves + Ječmen. RIBM 164

Nápoj s ovocnou vůní s příjemnými obilnými tóny (oves) a nakyslou vůní. Ve vůni jsou rozeznatelné kvasničné tóny. Kyselost je středně silná, hořkost je příjemná.

4 ZÁVĚRY A VÝHLEDY

Výsledky ukázaly, že použitím nově izolovaných kmenů kvasinek a nebo bakterií může být vyrobena řada nápojů s velmi slibnými sensorickými profily a dobrým přijetím spotřebiteli. Nechmelené nízkoalkoholické nápoje s čerstvými citrusovými vůněmi a nakyslou chutí mohou být vyrobeny ze sladu Citrus fermentací směsnou kulturou kvasinek a bakterií (RIBM 2-107+RIBM 163). Pivo nebo nízkoalkoholické pivo s lehkou a osvěžující vůní a chutí může být vyrobeno ze sladu Citrus a nebo směsi s ječným sladem. Také fermentované nápoje z ovesného sladu mají zajímavé chuťové vlastnosti. Pivo nebo nízkoalkoholické pivo ze směsi ovsu a ječného sladu, fermentované kvasničným kmenem RIBM 164 se vyznačuje příjemným ovocným aroma s příjemnými silnými obilnými tóny (oves). Piva fermentovaná kvasničným kmenem RIBM 164 měla podstatně lepší sensorické vlastnosti ve srovnání s pivem fermentovaným běžným kmenem pivovarských kvasinek. Byly podány žádosti o patentovou ochranu nových kmenů. Další práce bude zaměřena na optimalizaci receptury piva a nápojů z hlediska poměru sladů z různých obilovin, parametry fermentace, zákal, koloidní a sensorickou stabilitu.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla podpořena Ministerstvem zemědělství ČR, projekty č QI111B053 a RO1914.

Tab. 7 Analytická a sensorická kvalita piv II. série / Table 7 Analytical and sensory quality of beers II. Series

| Slad / Malt | Pšenice+ječmen / Wheat+Barley | | Oves+ječmen / Oat+Barley | |
|---|-------------------------------|--------|--------------------------|--------|
| | RIBM164 | RIBM95 | RIBM164 | RIBM95 |
| Kmen / Strain | | | | |
| Extrakt původní mladiny / Original extract (%w) | 8.8 | 8.7 | 9 | 9.1 |
| Alkohol / Alcohol (% v) | 2.02 | 1.98 | 1.88 | 1.85 |
| Hořkost / Bitterness (IBU) | 18 | 16 | 16 | 18 |
| Říz / Carbonation | 1.9 | 1.8 | 2 | 1.9 |
| Plnost / Body-fulness | 2.7 | 2.5 | 2.5 | 2.1 |
| Hořkost / Bitterness | 1.8 | 1.9 | 1.7 | 1.8 |
| Trpkost / Astringency | 0.3 | 1 | 0.4 | 0.5 |
| Sladkost / Sweetness | 1.3 | 1 | 1.4 | 0.9 |
| Kyselost / Sourness | 1.1 | 1.7 | 1.7 | 2.1 |
| Ovocná-esterová / Fruity-esteric | 2.5 | 2.1 | 2.5 | 1.8 |
| Kvasničná / Yeasty | 1.1 | 1.4 | 1.1 | 1.4 |
| Obilná / Grainy | 2.1 | 2.3 | 1.8 | 2.1 |
| Celkový dojem / Overall impression | 3.6 | 5.2 | 3.4 | 5.4 |

Wheat + Barley. RIBM 164

Beer with a fruity aroma and grainy overtones. In aromas, traces of yeast are more pronounced. The fragrance is light and refreshing. Acidity does not interfere with the taste. The flavor profile is fairly harmonized.

Oat + Barley. RIBM 164

Beer with a fruity aroma and pleasant grainy tones (oats) and a sour smell. In aromas, traces of yeast are recognizable. Acidity is moderate, bitterness is pleasant.

4 CONCLUSIONS AND OUTLOOK

The results showed a range of beverages with very promising sensory profiles and that a beverage with a good consumer acceptance can be produced using newly isolated yeast and/or bacterial strains. Non-hopped low alcohol beverages with a fresh citrus aroma and acidic flavor could be made from Citrus malt, by mixed yeast/bacterial culture (RIBM 2-107+RIBM163) fermentation. Beer/low alcohol beer with a light and refreshing aromas and flavors could be produced from Citrus malt and/or mixture with barley malt.

Fermented drinks from oat malt also have interesting taste characteristics. Beer/ low alcohol beer from a mixture of oats and barley malt fermented by yeast strain RIBM164 is characterized by a pleasant fruity aroma with pleasant, strong grainy tones (oats). Beers fermented by yeast strain RIBM164 had a significantly better sensory quality, compared to beers fermented by conventional brewing yeast strain. Applications for patent protection of new strains were submitted.

Further work will be focused on optimization of the beer / beverage recipes in terms of the ratio of malts from different cereals, fermentation parameters, haze and colloidal/sensory stability.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Czech Ministry of Agriculture, projects No. QI111B053 and RO1914.

LITERATURA / REFERENCES

- Abdel-All, E.-S. M., Abou-Arab, A. A., Gamel, T. H., Hucl, P., Young, J. C., Rabalski, I., 2008: Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 11171-11177, DOI: 10.1021/jf802168c.
- Adetunji, A. I., Khoza, S., de Kock, H. L., Taylor, J. R. N., 2013: Influence of sorghum grain type on wort physico-chemical and sensory quality in a whole-grain and commercial enzyme mashing process. *J. Inst. Brew.* 119 (3): 156–163. DOI: 10.1002/jib.76.
- Agu, R. C., Goodfellow, V., Bryce, J. H., 2011: Effect of Mashing Regime on Fermentability of Malted Sorghum. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 48 (2): 60–66. DOI:10.1094/TQ-48-2-0422-01.
- Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heparan, D., 2013: A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Int. J. Food Microbiol.*, 167: 44-56. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva (Brewing – Theory and Practice of Beer Production). VŠCHT Praha, pp. 904. ISBN: 978-807080-734-7
- Deželak, M., Zarnkow, M., Becker, T., Košir, I. J., 2014: Processing of Bottom-Fermented Gluten-Free Beer-Like Beverages Based on Buckwheat and Quinoa Malt With Chemical and Sensory Characterization. *J. Inst. Brew.* 120(4): 360–370. DOI:10.1002/jib.166.
- EBC, 2010: Analysis committee. *Analytica-EBC*. Nüremberg: Fachverlag Hans Carl, 2010, 794 p. ISBN 978-3-418-00759-5.
- Faltermaier, A., Waters, D., Becker, T., Arendt, E., Gastl, M., 2014: Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal – a review. *J. Inst. Brew.*, 120: 1–15, DOI: 10.1002/jib.107.
- Farnworth, E. R., 2005: Kefir – a complex probiotic. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods*, 2: 1-17. DOI:10.1616/1476-2137.13938.
- Gabrovská, D., Ouhračková, J., Rysová, J., Fiedlerová, V., Holasová, M., Laknerová, I., Winterová, R., Prokeš, J., Hartman, I., Vavrejinová, S., 2011: Nutriční hodnocení sladů z obilovin a pseudoobilovin (Nutritional assessment of malts from cereals and pseudocereals). *Úroda 12, vědecká příloha*, 133-136. ISSN 0139-6013.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F., 2015: Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol.*, 49: 123-33. DOI:10.1016/j.fm.2015.01.017.
- Hanke, S., Zarnkow, M., Kreis, S., and Back, W. 2005, Hafer in der Malz und Bierbereitung (Oat in malting and brewing). *Brauwelt* 8-9:216-219.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Böhm, V., Bitsch, R., 2002: Spectrophotometric Determination of Yellow Pigment Content and Evaluation of Carotenoids by High-Performance Liquid Chromatography in Durum Wheat Grain. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6663-6668, DOI: 10.1021/jf025701p.
- Hübner F., Schehl, B. D., Thiele, F., Arendt, E. K., 2009: Investigation of the Malting Behavior of Oats for Brewing Purposes. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 67(4):235-241. DOI: 10.1094/ASBCJ-2009-0929-01.
- Janovská D., Káš M., 2012: Pohanka. In: Konvalina P. (Ed.): *Pěstování a využití minoritních obilnina pseudoobilnin v ekologickém zemědělství. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice*, 101-116. ISBN 978-80-87510-24-7.
- Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D., 2009: Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 26: 770-775. DOI: 10.1016/j.fm.2009.04.009.
- Josepa, S., Guillamon, J. M., Cano, J., 2000: PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Dec 15;193(2):255-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09433.x
- Kabak, B., Dobson, A. D., 2011: An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51:248-260. DOI:10.1080/10408390903569640.
- Klose, C., Mauch, A., Wunderlich, S., Thiele, F., Zarnkow, M., Fritz, J., Arendt, E. K., 2011: Brewing with 100% Oat Malt. *J. Inst. Brew.*, 117: 411-421. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00487.x.
- Knievel, D. C., Abdel-All, E.-S.M., Rabalski, I., Nakamura, T., Hucl, P., 2009: Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 50: 113-120 DOI: 10.1016/j.jcs.2009.03.007.
- Kordialik-Bogacka, E., Bogdan, P., Diowski, A., 2014: Malted and unmalted oats in brewing. *J. Inst. Brew.*, 120: 390–398, DOI: 10.1002/jib.178
- Krahl, M., Müller, S., Back, W., Kreis, S., 2011: Arabinoxylan (pentosan) in Malt and Beer Preparation. *Brauwelt International*, 29: 42–45.
- Leite, A. M., Leite, D. C., Del Aquila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A., Silva, J. T., Paschoalin, V. M., 2013: Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *J. Dairy Sci.*, 96: 4149-4159. DOI:10.3168/jds.2012-6263.
- Leite, A. M. O., Mayo, B., Rachid, C. T., Peixoto, R. S., Silva, J. T., Paschoalin, V. M., Delgado, S., 2012: Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.*, 31: 215-221. DOI:10.1016/j.fm.2012.03.011.
- Matoulková, D., Olšovská, J., Slabý, M., Kosař, K., 2014: Kmen bakterie *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107 a jeho použití při výrobě nealkoholických a nízkalkoholických nápojů z ovocných a/nebo obilných substrátů (Strain of *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107 bacteria and use thereof in the preparation of non-alcoholic and low-alcoholic beverages from fruit and/or corn substrates). *CZ Patent 304725*, Praha.
- Moudrý, J., 2011: Oves nahý (oats). In: Moudrý J. et al: *Alternativní plodiny (alternative crops)*. Profi Press, s.r.o., Praha, 24-25. ISBN 978-80-86726-40-3.
- Ouhračková, J., Vavrejinová, S., Gabrovská, D., Rysová, J., Kozák, R., Šourková, S., Suková, I., Hartman, I., 2012: Bezlepková směs z přirozeně bezlepkových surovin (Gluten-free blend of naturally gluten-free raw material). *Užitný vzor (Utility model) 24072*, Praha 9. 7. 2012.
- Pexová Kalinová, J., 2011: Pohanka setá (buckwheat). In: Moudrý J. a kol: *Alternativní plodiny (alternative crops)*. Profi Press, s.r.o., Praha, 40-43. ISBN 978-80-86726-40-3.
- Prokeš, J., Gabrovská, D., Rysová, J., Paulíčková, I. 2008: Nápoj s obsahem rutinu (Beverage containing rutin). *Užitný vzor (Utility model) 19144*, Praha 8. 12. 2008.
- Schnitzzenbaumer, B., Kerpes, R., Titz, J., Jacob, F., Arendt, E. K., 2012: Impact of Various Levels of Unmalted Oats (*Avena sativa* L.) on the Quality and Processability of Mash, Wort, and Beers. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70(3): 142-149. DOI:10.1094/ASBCJ-2012-0708-01.
- Škach, J., Prokeš, J., Hašková, D., 2013: Pivo se sníženým obsahem glutenu a způsob jeho výroby (Beer with reduced gluten content and the method of its production). *CZ Patent 303 804*. Praha, 28. 3. 2013.
- Ward, L. J. H., Timmins, M. J., 1999: Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 90–92. DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., Britz, T. J., 2004: Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *Int. J. Dairy Technol.*, 57: 33-37. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00126.x.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., Britz, T. J., 2005: Characterization of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *Int. Dairy J.*, 15: 383-389. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.07.016.