

Stanovení izomerů nižších mastných kyselin, sensoricky aktivních produktů stárnutí chmele, v pivu

Determination of Short Chain Fatty Acids Isomers, the sensory active products of hops aging, in Beer

Jiří ČULÍK, Tomáš HORÁK, Martin SLABÝ, Pavel ČEJKA, Jana OLŠOVSKÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc, 15, Lípová, 120 44 Prague, Czech Republic, e-mail: culik@beerresearch.cz*

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Čulík, J. – Horák, T. – Slabý, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Stanovení izomerů nižších mastných kyselin, sensoricky aktivních produktů stárnutí chmele, v pivu. *Kvasny Prum.* 59, 2013, č. 4., s. 86–90.

K významným produktům stárnutí chmele se řadí C4 a C5 izomery nižších mastných kyselin, kyselina 2-methylpropanová (isomáselná), 2-methylbutanová a 3-methylbutanová (kyselina isovalerová). Výše zmíněné kyseliny jsou samy o sobě nejen sensoricky aktivní, ale v procesu výroby piva mohou poskytovat po esterifikaci i další sensoricky významné produkty přispívající k pachuti piva po stárnutí. V rámci této studie byla vypracována dostatečně citlivá a selektivní metoda stanovení obsahu těchto látek v pivu, založená na izolaci nižších mastných kyselin a jejich izomerů pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) a kvantitativním vyhodnocení pomocí kapilární plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Detekce pomocí hmotnostního spektrometru odstranila problémy spojené s obtížným chromatografickým dělením výše zmíněných izomerů a jejich kvantifikací. Podařilo se tak zpřesnit výsledky kvantitativní analýzy vzorků v porovnání s detekcí pomocí klasického plamenionizačního detektoru (FID). Optimalizovaná metoda byla následně využita při sledování změn obsahu nižších mastných kyselin a jejich izomerů v pivu vyrobeném ze starého a čerstvého chmele a při použití infuzního a dekokčního varního postupu.

Čulík, J. – Horák, T. – Slabý, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Determination of short chain fatty acids isomers, the sensory active products of hops aging, in beer. *Kvasny Prum.* 59, 2013, No. 4, p. 86–90.

Important products of hop aging are the C4 and C5 isomers of short chain fatty acids; namely 2-methyl propionic acid (isobutyric acid), 2-methyl butyric acid and 3-methyl butyric acid (isovaleric acid). These acids are sensory active and moreover, after the esterification during beer production they can provide further sensory active compounds contributing to a stale aftertaste. In the framework of this study a sufficiently sensitive and selective method for the determination of these substances in beer was developed. This method is based on the isolation of the short chain fatty acids and their isomers by means of solid phase extraction (SPE) and followed by quantification using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The use of mass spectrometry for the detection eliminated the problem of the difficult chromatographic separation and quantification of these compounds. When compared with the usual detection using a flame ionisation detector (FID) the results of the quantitative determination by means of MS are more accurate. The newly developed and optimized method was used for monitoring changes in the contents of the short chain fatty acids and their isomers in beer produced with both fresh and older hops and by using infusion or decoction brewing methods.

Čulík, J. – Horák, T. – Slabý, M. – Čejka, P. – Olšovská, J.: Die Bestimmung von Isomeren der niedrigeren Fettsäuren, der aktiven Produkten der Alterung des Hopfens im Bier. *Kvasny Prum.* 59, 2013, Nr. 4., S. 86–90.

Zu den bedeutenden Produkten der Alterung des Hopfens gehören C4 und C5 Isomere der niedrigeren Fettsäuren, 2-Methylpropan-säure (Isobuttersäure), 2-Methylbutansäure, und 3-Methylbutansäure (Isovalersäure). Die oben genannte Säuren sind für sich nicht nur sensorisch aktiv, aber auch im Prozess der Bierherstellung nach der Esterifikation können zur Bildung der weiteren sensorisch bedeutenden Produkte wirken, die zum Nachgeschmack des Bieres während der Alterung beitragen. Im diesen Artikel wird eine ausreichend empfindliche und selektive Methode zur Gehaltsbestimmung von diesen Stoffen im Bier, die auf Basis Isolation der niedrigeren Fettsäuren und ihren Isomeren durch die Extraktion auf der festen Phase (SPE) und eine quantitative Auswertung mittels Kapillarchromatographie und Massspektrometrie (GC-MS) beschrieben. Die mit der schwierigen chromatographischen Teilung obig erwähnten Isomere und ihre Quantifikation verbundene Probleme wurden durch die Detektion mittels des Masspektrometers gelöst. Es hat gelungen, die Ergebnisse der quantitativen Musteranalyse im Vergleich mit der Detektion mittels des klassischen Flammenionisationsdetektors (FID) zu verfeinern. Die optimierte Methode wurde anschließend während der Verfolgung von Gehaltsänderungen an niedrigen Fettsäuren und ihre Isomere im durch Infusion- und Dekoktionsverfahren giesedeten Bier unter Anwendung Althopfen und Frischhopfen ausgenutzt.

Klíčová slova: *produkty stárnutí chmele, kyselina 2-methylpropanová, 2-methylbutanová, 3-methylbutanová, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie*

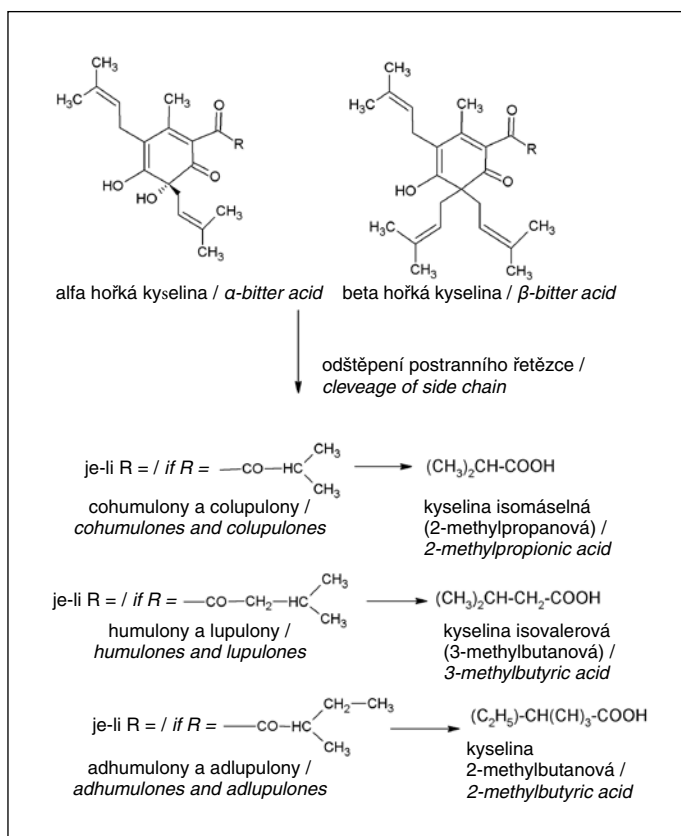
Keywords: *products of hops aging, 2-methylpropan acid, 2-methylbutan acid, 3-methylbutan acid, gas chromatography, mass spectrometry*

1 ÚVOD

Stárnutí chmele je provázáno mnoha změnami, zejména změnami oxidačními. Výsledkem je odštěpení postranních řetězců hořkých kyselin, tak jak je to znázorněno na obr. 1. Mechanismus vzniku navrhli Howard a Tatchell v roce 1956 na základě získaných výsledků působení peroxidu vodíku na α - a β -hořké kyseliny. Sandra a Verzele (1975) prezentovali výsledky, že chmelená piva obsahovala v porovnání s pivy nechmelenými vyšší množství výše zmíněných isomerů C4 a C5 mastných kyselin. Autoři předpokládali, že tyto látky vznikly jako vedlejší produkty oxidace během skladování chmele a při chmelovaru. Hashimoto a Eshima (1977) uvádějí, že kromě výše zmíněných skutečností se mohou taktó vzniklé nižší mastné kyseliny dále podílet na vzniku jejich sensoricky aktivních aldehydů, spoluodpovědných za starou chuť piva. Tyto látky se mohou dostat až do hotového piva, přičemž k jejich zvýšenému obsahu (zvláště u isovalerové kyseliny) může za nepříznivých okolností rovněž přispívat činnost kvasinek při kvašení.

1 INTRODUCTION

The aging of hops involves many changes, particularly oxidation processes. These result in the cleavage of side chains of bitter acids as shown in Fig. 1. The reaction mechanism was described by Howard and Tatchell in 1956. It is based on results from the test reaction between hydrogen peroxide and α - and β -bitter acids. Sandra and Verzele (1975) presented results showing a higher amount of the C4 and C5 isomers when compared with unhopped beers. The authors presumed that these substances were formed as secondary oxidation products during storage and wort boiling. Hashimoto and Eshima (1977) pointed out that the resulting short chain fatty acids can also promote the formation of their sensory active aldehydes which are responsible for stale aftertastes. These substances can possibly penetrate into the beer. Under unfavourable circumstances the yeast activity can also contribute to an increased content of these compounds, particularly of isovaleric acid.



Obr. 1 Předpokládaný mechanismus oxidačního štěpení α - a β -hořkých kyselin / Fig. 1 The assumed reaction mechanism for the oxidative cleavage of α - and β -bitter acids

Izomery kyselin propanové a butanové se vyznačují význačným „sýrovým“ aroma (Krüger, Anger, 1996; Peacock, 1998). U isomáselné kyseliny uvádějí prahovou hodnotu vnímání v pivo 30 mg/kg a u isovalerové kyseliny 1,5 mg/kg. Naproti tomu jiní autoři (Hanke et al. 2010) uvádějí prahovou hodnotu vnímání u isovalerové kyseliny pouhých 0,325 mg/l. Současně však zjistili, že byl negativní senzorycký vjem u isovalerové kyseliny potlačen zvýšeným obsahem ethyl- a isoamylacetátu.

Cílem práce bylo vypracovat vhodnou izolační metodu a navrhnout selektivní analytický postup pro kvalitativní i kvantitativní stanovení diskutovaných látek. S ohledem na jejich stopová množství v pivo bylo navrženo využít k detekci a stanovení těchto látek přístrojové spojení kapilárního plynového chromatografu a hmotnostního detektoru (GC-MS). Jelikož se jednotlivé izomery špatně chromatograficky dělí, byla pro kvantitativní a kvalitativní analýzu použita technika SIM (selected ion monitoring), při které je z fragmentačního spektra látky vybrán pro vyhodnocení charakteristický iont.

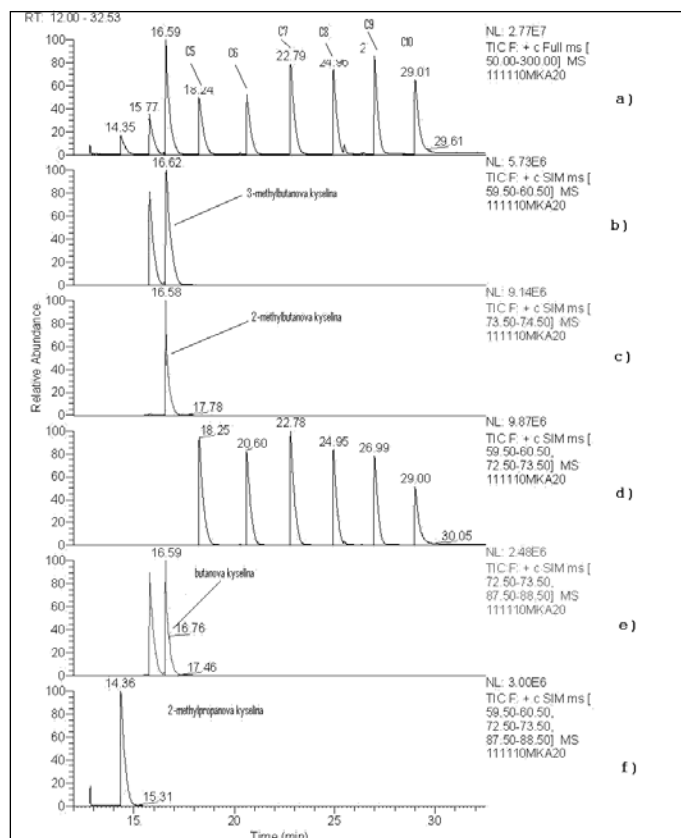
Výsledky nově navržené metody byly srovnány s výsledky celkové analýzy mastných kyselin pomocí spojení kapilárního plynového chromatografu s plamenionizačním detektorem (GC-FID) (Horák et al., 2005 a 2009), která však neumožňuje dokonalé kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení obsahu isomerů 2- a 3-methylbutanové kyseliny.

V závěru byla navržená metoda využita při studiu vlivu stáří použitého chmele na obsah isomerů nižších mastných kyselin v pivo a dále při porovnání vlivu infuzního a dekokčního varního postupu na obsah nižších mastných kyselin a jejich isomerů v pivo.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Kyseliny 2-methylpropanová (isomáselná), butanová (máselná), 2-methylbutanová, 3-methylbutanová (isovalerová), pentanová (valerová), hexanová (kapronová), heptanová (interní standard), oktanová (kaprylová), nonanová (pelargonová) a dekanová (kaprinová), byly ze vzorku extrahovány metodou extrakce na pevné fázi (SPE) a následně stanoveny pomocí GC-MS.

Příprava vzorku pro SPE byla provedena následujícím způsobem. K 20 ml odplyněného vzorku piva bylo přidáno 10 μ l pracovního roztoku vnitřního standardu heptanové kyseliny o koncentraci 2 g/l a 1 ml 1 M HCl.



Obr. 2 Chromatogram nižších mastných kyselin a jejich C4 a C5 isomerů (GC-MS) / Fig. 2 GC-MS chromatogram of the short chain fatty acids and their C4 and C5 isomers

The isomers of propionic and butyric acid have a distinct cheesy flavour. The thresholds values for isobutyric acid of 30 mg/kg and for isovaleric acid of 1.5 mg/kg in beer have been determined (Krüger and Anger, 1996; Peacock, 1998). However, other authors (Hanke et al., 2010) determined a threshold value for isovaleric acid of only 0.325 mg/l. At the same time they found that the sensory perception of isovaleric acid was suppressed by increased contents of ethyl- and isoamyl acetate.

The aim of this study was to develop an isolation procedure and a selective analytical method for qualitative and quantitative determinations of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids. Due to the trace amounts in beer the use of GC with MS for detection was suggested. The problem with the difficult chromatographic separation was resolved by using the SIM (selected ion monitoring) technique. With this method only a specific ion is selected from the fragmentation spectrum of the compound for both, the qualitative and the quantitative determination.

The results obtained with the suggested method were compared with the analysed results for total fatty acids obtained by using a GC equipped with a FID detector (Horák et al., 2005 and 2009). However, this method does not make any accurate qualitative or quantitative determination of the isomers 2- and 3-methyl butyric acid possible.

The developed method was used for monitoring the influences on the contents of the short chain fatty acids isomers in beer due to the age of the hops as well as for the comparison of influences from infusion and decoction brewing methods.

EXPERIMENTAL PART

2-Methyl propionic acid (isobutyric acid), butyric acid, 2-methyl butyric acid (isovaleric acid), 3-methyl butyric acid, pentanoic acid (valeric acid), hexanoic acid (caproic acid), heptanoic acid (internal standard), octanoic acid (caprylic acid), nonanoic acid (pelargonic acid) and decanoic acid (capric acid) were extracted by means of SPE and determined by GC-MS.

The sample preparation for SPE was carried out as followed: 10 μ l of the internal standard solution (2 g/l of heptanoic acid) and 1 ml of 1 M HCl were added to 20 ml of degassed sample.

Solid phase extraction was carried out with SPE columns LiChrolut EN 200 mg from Merck (Darmstadt, D). The columns were condi-

Extrakce na pevné fázi byla prováděna na SPE kolonkách LiChro-lut EN 200 mg (Merck). Kolonka byla kondicionována postupným přidáváním 2,5 ml methanolu a následně 5,0 ml vody. Poté byl na kolonku, aniž by kolonka vyschla, nanesen vzorek a zvolna pomocí vakua extrahován. Eluce sorbovaných nižších mastných kyselin byla následně provedena dvojnásobným přidáváním 0,5 ml chloroformu. Extrakt byl přenesen do 2 ml vialek opatřených inzertem a analyzován pomocí GC-MS.

Stanovení nižších mastných kyselin a jejich C4 a C5 izomerů bylo provedeno pomocí přístrojového spojení kapilárního plynového chromatografu Trace a kvadrupólového hmotnostního spektrometru DSQ II (Thermo Fisher).

Analýza probíhala na křemenné kapilární koloně Tr WaxMS o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce fáze 0,25 μ m za následujících podmínek: teplotní program: 60 °C (2 min) – 5 °C/min – 200 °C – 40 °C/min – 220 °C (2 min), teplota injektoru 220 °C, nástřík 50 s splitless, objem nástříku 1 μ l. Průtok nosného plynu He činil 1,2 ml/min.

Teplota propojení s hmotnostním spektrometrem činila 250 °C.

U C4 a C5 izomerů mastných kyselin a interního standardu (kyseliny heptanové) byl obsah analytů stanoven pomocí módu SIM (vybraných iontů), u zbývajících mastných kyselin pomocí celkového iontového toku (TIC).

Metoda byla využita při analýze piv získaných ze série pokusných čtvrtprovozních várek, kde byly sledovány změny obsahu isomerů nižších mastných kyselin při aplikaci čerstvého a staršího chmele a při porovnání vlivu infuzního a dekokčního varního postupu. Kvašení probíhalo za standardních podmínek s použitím stejného kmeny kvasinek tak, aby bylo vyloučeno ovlivnění výsledků podmínkami fermentace. Použity byly vzorky starších chmelů: Premiant (sklizeň 2009), Bor a Sládek (sklizeň 2009), Žatecký poloraný červeňák (sklizeň 2009) a čerstvý Žatecký poloraný červeňák (sklizeň 2011).

tioned by a gradual addition of 2.5 ml of methanol followed by 5.0 ml of deionised water. Next, the prepared sample was applied on the (still wet) column and slowly extracted under the vacuum. The elution of the short chain fatty acids adsorbed was carried out with 0.5 ml of chloroform repeated twice. The eluate was transferred to the 2 ml GC-sample vials with an insert and analyzed by GC-MS.

For the determination of the short chain fatty acids and their C4 and C5 isomers a TRACE GC equipped with a quadruple MS DSQ II (both Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, US) was used. The GC separation was accomplished using a fused silica capillary column Tr WaxMS, 30 m x 0.25 mm i.d. and 0.25 mm film thickness (Thermo Electron Corp., Marietta, OH, US). The operation conditions were: He carrier gas at 1.2 ml/min, splitless injection mode, purge time 50 s, injection volume 1 μ l and injector temperature 220 °C. The temperature program was: 60 °C (2 min) then 5 °C/min. to 200 °C then 40 °C/min to 220 °C (2 min). The temperature of the GC-MS coupling was 250 °C.

The C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids and the internal standard (heptanoic acid) were determined by means of SIM technique. Other fatty acids were determined by means of total ion current (TIC).

The method was used for the monitoring of changes in the contents of the short chain fatty acids and their isomers in beer produced with both fresh and older hops and by using infusion or decoction brewing methods. The beer samples were obtained from a series of quarter scale pilot plant trials. The fermentation was carried out under standard conditions. To eliminate the influence on the results from the fermentation conditions the same yeast strain was used throughout the trial. For older hops the varieties Premiant (harvest 2009), Bor and Sládek (harvest 2009) and Saaz (harvest 2009) were used. For fresh hops the Saaz variety (harvest 2011) was used.

3 RESULTS AND DISCUSSION

By using a common 30 m long capillary column with a film thickness of 0.25 μ m the retention times for 2- and 3-methyl butyric acids (marked as b) and c)) differ by only hundredths of a minute (Fig. 2). Therefore, the separation was insufficient. The use of a longer, for instance 60 m long column would improve the separation but the analysis time would be extended disproportionately. The resolution of this problem comes through the use of a MS detector in SIM mode

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Jak vyplývá z obr. 2, při použití běžné 30 metrové kapilární kolony o tloušťce filmu 0,25 μ m, kdy se retenční časy obou látek od sebe liší o pouhé setiny minuty (na obr. 2 označeno b) a c)), nelze dosáhnout dokonalé separace píků 2- a 3-methylbutanové kyseliny. Zlepšení rozlišení by bylo možno dosáhnout použitím delší, např. 60 m kolony, ale vedlo by to k neúměrnému prodloužení doby ana-

Tab.1 Porovnání hodnot obsahu nižších mastných kyselin v pivu získaných pomocí GC-FID a GC-MS / Contents of the short chain fatty acids in beer determined by GC-FID and GC-MS

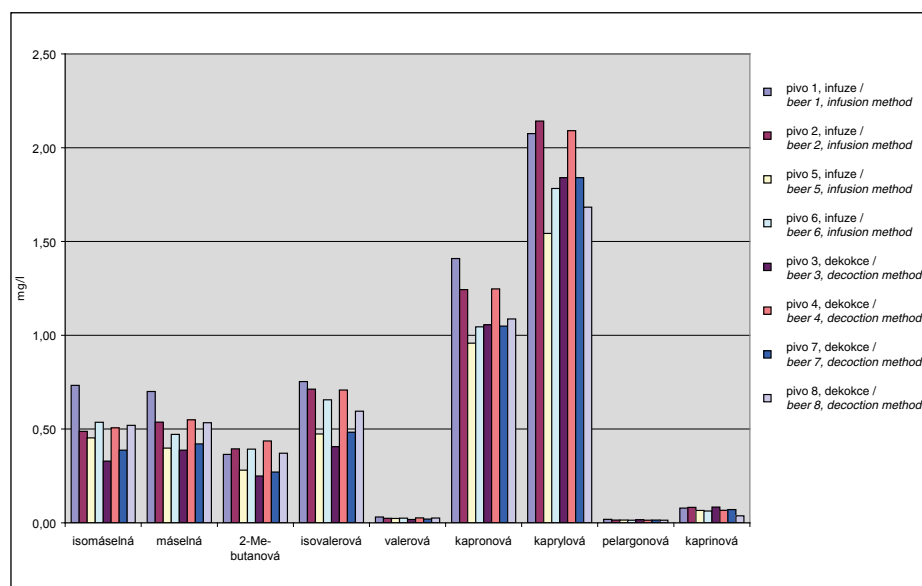
Číslo vz. / Sample No	Kyselina / Acid	2-Me-propanová / 2-Methyl propionic	máselná (C4) / butyric (4)	2-Me-butanová / 2-Methyl butyric	3-Me-butanová / 3-Methyl butyric	valerová (C5) / valeric (C5)	kapronová (C6) / caproic (C6)	kaprylová (C8) / caprylic (C8)	pelargonová (C9) / pelargonic (C9)	kaprinová (C10) / capric (C10)	Detektor / Detector
											mg/kg
22866	FID	0.56	0.48	NS	1.00	0.02	1.68	2.57	0.03	0.71	
	MS	0.73	0.70	0.37	0.75	0.03	1.41	2.07	0.02	0.08	
22867	FID	0.52	0.38	NS	1.00	0.03	1.52	2.69	0.01	1.35	
	MS	0.49	0.54	0.39	0.71	0.02	1.24	2.14	0.02	0.08	
22868	FID	0.80	0.69	NS	1.44	0.06	1.14	2.42	0.13	2.26	
	MS	0.33	0.39	0.25	0.41	0.02	1.06	1.84	0.02	0.08	
22869	FID	0.32	0.28	NS	0.58	0.02	1.26	2.17	0.05	0.90	
	MS	0.51	0.55	0.44	0.71	0.03	1.25	2.09	0.01	0.07	
23147	FID	0.43	0.43	NS	0.69	0.11	1.13	1.71	0.04	0.68	
	MS	0.45	0.40	0.28	0.47	0.02	0.96	1.54	0.01	0.07	
23148	FID	0.55	0.39	NS	0.94	0.09	1.17	2.05	0.05	1.54	
	MS	0.54	0.47	0.39	0.66	0.03	1.04	1.78	0.01	0.06	
23149	FID	0.34	0.34	NS	0.61	0.10	1.25	2.11	0.03	0.88	
	MS	0.39	0.42	0.27	0.48	0.02	1.05	1.84	0.02	0.07	
23150	FID	0.43	0.48	NS	0.70	0.09	1.30	2.05	0.00	1.76	
	MS	0.52	0.53	0.37	0.60	0.03	1.09	1.68	0.01	0.04	

lýzy. V případě MS detekce v SIM módu lze tento problém eliminovat správným výběrem iontů použitých pro vyhodnocení. Tímto způsobem lze kvantifikovat požadované analyty i v případě horšího chromatografického rozlišení (viz obr. 2). Detekce pomocí FID nám tuto možnost nenabízí.

Na základě porovnání výsledků získaných pomocí detektorů FID a MS (tab. 1) lze konstatovat, že bylo mezi srovnávanými metodami u všech nižších mastných kyselin, s výjimkou stanoveného obsahu C4 a C5 kyselin a jejich izomerů a dále kyseliny kaprinové, dosaženo velmi dobré shody. Zřejmě falešně pozitivní zvýšený obsah kyseliny kaprinové, stanovený pomocí detektoru FID, byl s nejvyšší pravděpodobností způsoben koelucí sloučeniny s totožným retenčním časem. V těchto případech se projevuje výhoda použití vysoce specifického a citlivého MS detektoru v porovnání s klasickým nespecifickým FID detektorem.

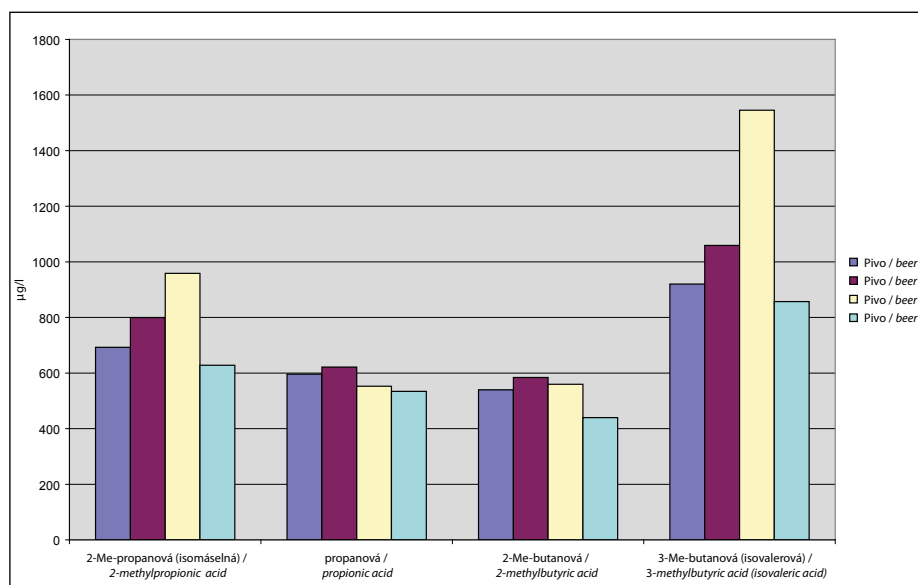
Výsledky pokusných várek se starým a čerstvým chmelem (obr. 3) potvrdily předpoklad, že přítomnost oxidačních produktů hořkých kyselin ve starších vzorcích chmele vede k mírnému zvýšení obsahu C4 a C5 izomerů nižších mastných kyselin v pivo. V případě isovalerové kyseliny se blížil prahové hodnotě senzoryckého vnímání. Lze proto předpokládat, že zvýšený obsah těchto látek nebude přímo odpovědný za starou chuť vyrobeného piva, ale bude pouze jedním z příspěvků k výslednému celkovému senzoryckému vjemu.

Vliv rozdílného použitého varního postupu (infuze-dekokce) na změny obsahu C4 a C5 izomerů i ostatních nižších mastných kyselin nebyl na základě získaných dat potvrzen (obr. 4). Bylo však pozorováno značné kolísání obsahu analytů u jednotlivých dvojic várek. Lze to vysvětlit možnými odchylkami průběhu jednotlivých chmelovarů. Hlubší závěry však zatím nelze, s ohledem na omezený počet varních zkoušek a na základě zatím nedostatečného množství získaných výsledků, vyvodit.



Obr. 4 Vliv zvoleného varního postupu na obsah nižších mastných kyselin a jejich izomerů v pivo / Fig. 4 Influence of chosen brewing methods on the contents of the short chain fatty acids and their isomers in beer

Pozn.: Piva č. 1, 2, 5 a 6 a obdobně piva 3, 4, 7 a 8 byla vyrobena ze dvou rozdílných sladů. Piva 1, 2, 3 a 4 byla vyrobena v první sérii zkoušek, piva 5, 6, 7 a 8 ve druhé sérii zkoušek.
Note: Beers Nos 1, 2, 5 and 6 and likewise beers Nos 3, 4, 7 and 8 were produced with two different malts.
Beers Nos 1, 2, 3, and 4 were produced in the first test series, beers Nos 5, 6, 7, and 8 in the second test series.



Obr. 3 Porovnání obsahu C4 a C5 izomerů mastných kyselin ve vzorcích piv vyrobených ze starého a čerstvého chmele / Fig. 3 Contents of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids in beer samples produced with both older and fresh hops

Pozn.: Pivo č. 1 (Premiant, sklizeň 2009); pivo č. 2 (Bor a Sládek, sklizeň 2009); pivo č. 3 (Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), sklizeň 2009) byla vyrobena ze starého chmele skladovaného při pokojové teplotě, pivo č. 4 bylo vyrobeno z čerstvého chmele (ŽPČ, sklizeň 2011) /

Note: Beer No 1 (Premiant, harvest 2009), beer No 2 (Bor and Sladek, harvest 2009) and beer No 3 (Saaz, harvest 2009) were produced using older hops stored at room temperature. Beer No 4 was produced using fresh hops (Saaz, harvest 2011)

and the correct selection of the ions used for the determinations. In contrast to the use of a FID, the quantification of these two compounds could be achieved (Fig. 2).

The comparison of the results obtained by using a FID and a MS detector showed very good agreement for all the short chain fatty acids with the exceptions for the determinations of the C4 and C5 acids and their isomers and for capric acid (Tab. 1). The increased content of capric acid determined by using FID was probably caused by a coelution of a compound with the same retention time. This case demonstrates the advantage of using a highly specific and sensitive MS detector rather than an unspecific FID.

The results from test batches with fresh and older hops (Fig. 3) confirmed the assumption that the presence of bitter acids oxidation products in older hop samples causes a slight increase in the contents of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids in beer. The content of isovaleric acid was close to the threshold value for sensory perception. Therefore, it can be assumed that the increased contents of these substances are not directly responsible for the beer going stale. Moreover, this is only one of the factors in total sensory perception.

The data obtained from the application of infusion and decoction brewing methods do not confirm any influence of the method used on changes in the contents of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids or other short chain fatty acids (Fig. 4). However, considerable variations in the contents of the analytes for individual pairs were observed. This could be explained by possible deviations in particular brewing processes. Due to the limited number of brewing tests and the insufficient amount of results obtained no profound conclusions can be made yet.

V obou případech poskytla nově navržená GC-MS metoda stanovení C4 a C5 -izomerů i ostatních nižších mastných kyselin spolehlivé výsledky.

4 ZÁVĚR

Byla vypracována dostatečně citlivá a selektivní metoda stanovení obsahu C4 a C5 izomerů i ostatních nižších mastných kyselin v pivu, založená na jejich izolaci pomocí SPE a kvantitativním vyhodnocení pomocí GC-MS. Současně byla zjištěna shoda mezi výsledky získanými metodou GC-FID a GC-MS. Na rozdíl od dříve používané metody GC-FID však metoda GC-MS pracující v SIM módu vyniká vyšší citlivostí a specifičností a navíc umožňuje kvantitativně vyhodnotit obsah C4 a C5 izomerů nižších mastných kyselin i v případě jejich nedokonalého chromatografického rozdělení.

Použití staršího chmele vedlo u piva z pokusných várek k mírnému nárůstu obsahu oxidačních produktů hořkých kyselin, C4 a C5 izomerů nižších mastných kyselin.

Poděkování

Tato práce byla vypracována za podpory MZE-RO1012-Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin.

LITERATURA / REFERENCES

- Hanke, S., Ditz, V., Herrmann, M., Back, W., Becker, T., Krottenthaler, M., 2010: Influence of Ethyl Acetate, Isoamy Acetate and Linalool on off-flavour Perception in Beer. *Brew. Sci.* 63: 94–98.
- Hashimoto, N., Eshima, T., 1977: Composition and Pathway of Formation of Stale Aldehydes in Bottled Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 35(3):145.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., 2005: Stanovení mastných kyselin v pivu technikou SPME. *Kvasny Prum.* 51 (11–12): 374–377.
- Horák, T., Čulík, J., Čejka, P., Jurková, M., Kellner, V., Dvořák, J., Hašková, D., 2009: Analysis of Free Fatty Acids in Beer: Comparison of Solid-Phase Extraction, Solid-Phase Microextraction, and Stir Bar Sorptive Extraction. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11081–11085.

The new proposed GC-MS method for the determination of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids and other short chain fatty acids produced reliable results in both cases.

4 CONCLUSIONS

The proposed method represents a selective and sensitive method for the determination of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids and other short chain fatty acids in beer. The method is based on its extraction on solid phase and a following quantification by GC-MS. The results obtained by GC-FID and GC-MS methods were in good agreement. However, the GC-MS method working in SIM mode excels at sensitivity and specificity and additionally enables the quantitative determination of the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids even by pure chromatographic separation.

In beer made in test batches the use of older hops caused a slight increase in the oxidation products of the bitter acids and the C4 and C5 isomers of the short chain fatty acids.

Acknowledgements

The present study was supported by the Ministry of Agriculture; project MZE-RO1012 – Research of Quality and Processing of Malt and Brewing Raw Materials.

Translated by Eva Paterson

- Howard, G. A., Tatchell, A. R., New Approach to the Detailed Analysis of Hop Resins, 1956: *J. Inst. Brew.* 62: 20.
- Krüger, E., Anger, H. M., 1996: v knize Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft, Behr's Verlag: tab. 9.1.1.4.
- Peacock, V., 1998, MBAA Tech. Quarter., Fundamentals of Hop Chemistry 35(1): 4–8.
- Sandra, P., Verzele, M., 1975: *Eur. Brew. Conv., Proc. Congr.* 15th, Nice: 107.

Do redakce došlo / Manuscript received: 15. 01. 2013
Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 3. 2013

Černokostelecké vysmolení II.

Dne 18. května 2013 proběhne druhý ročník Černokosteleckého vysmolení. Jedná se o jarní paralelu tradičního podzimního Černokosteleckého vykulení, které se svým bohatým řemeslným programem zaměřeným na bednářské řemeslo zařadilo mezi přední pivovarské trachtace. Taktéž vysmolení konané v unikátních prostorách velmi intaktně dochovaného a postupně rekonstruovaného pivovaru v Kostelci nad Černými lesy nabíd-

ne především řemeslný program zaměřený na bednářské řemeslo. Jak již je však ze samotného názvu akce zřejmé, bednáři zaměří svůj um na smolení dřevěných transportních sudů. Krom vysmolování, které bude možno sledovat po celý den, budete moci pivo z čerstvě vysmolovaných sudů okošťovat, budete moci obdivovat mnohá další řemesla či autoveterány. Na tuto akci budou speciálně navařena čtyři piva, tradiční světlá desítka ve Varnsdorfu, ležák v Kounicích a dva nakuřované speciály v minipivovaru Parník Přerov. Nakuřovaná piva s totožnou recep-

turou se budou lišit použitým nakuřovaným sladem, a to buď nakuřováním na buku či na rašelině. Ke všem pivům bude sběratelský materiál a budou na čepu pouze na této akci. Nebude chybět ani odborný program, v rámci kterého si budete moci poslechnout příběhy z průzkumů starých pivovarů (Pavel Jákl, Milan Starec, Martin Vonka, Jan Pechánek a další). Nebudou chybět prohlídky stále se rozrůstajícího pivovarského muzea a o jídlo opravdu nebude nouze.

Více na www.pivovarkostelec.cz.

Milan Starec

