

Z výzkumu a praxe

ÚLOHA AMINOKYSELIN A VYŠŠÍCH ALKOHOLŮ PŘI NEENZYMOVÉ OXIDACI PIVA

Doc. Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Budějovický Budvar, n.p., České Budějovice

Klíčová slova: pivo, oxidace, aminokyseliny, vyšší alkoholy, radikálové reakce, zákal, chemiluminiscence

1. ÚVOD

Neenzymové oxidace základních biochemických sloučenin přitahují pozornost výzkumných pracovníků, neboť mohou být přičinou stárnutí živých organismů i potravin. Stárnutí je obvykle spojováno s oxidačními reakcemi, zejména v souvislosti s tzv. aktivními formami kyslíku (reactive oxygen species – ROS), popř. s volnými radikály kyslíku (oxygen free radicals – ORFs) [1,2].

Aktivní formy kyslíku a jeho radikály mohou vznikat enzymovými i neenzymovými reakcemi a uplatňovat se při stárnutí piva (některé reakce tohoto procesu byly popsány ještě před podrobným studiem radikálových reakcí kyslíku).

Za nejnámější oxidační reakce stárnutí piva se považují melanoidinové oxidace vyšších alkoholů za přítomnosti aminokyselin, Streckerovo odbourávání aminokyselin, Fentonova reakce, photooxidační reakce a oxidace vyšších alkoholů za přítomnosti polyfenolů [3].

Původ vyšších alkoholů vznikajících při kvašení spočívá většinou v přeměně aminokyselin, přičemž se primárně vznikající aldehydy redukují enzymy kvasinek na alkoholy. Při stárnutí piva se mohou aminokyseliny i alkoholy opět oxidovat na aldehydy, udělující v řadě případů pivu typickou vůni a chuť, nebo tyto aldehydy mohou alespoň sloužit jako indikátory stárnutí.

Maillardova reakce může zahrnovat tvorbu radikálů za současné spotřeby rozpustěného kyslíku, čímž se vysvětluje její oxidační i antioxidační povaha [4]. Podle jiných autorů postačuje k oxidaci sloučenin piva komplex reakcí, zahájených reakcí kyslíku s vodou v kyslému prostředí [5].

Průkaz radikálových reakcí se opírá o měření přirozené chemiluminiscence piva

a studium spekter elektronové spinové rezonance (ESR) [6,7]. Za antioxidant se obvykle pokládá látka, schopná zháset radikálové reakce kyslíku. Studium antioxidantů nabývá nyní zvláště velkého významu, jak o tom svědčí závěry konference o volných radikálech a antioxidantech ve Švýcarsku z roku 1992 [2]. Podle názoru zdravotníků by se měl údaj o antioxidačních vlastnostech uvádět na potravinách spolu s údajem o využitelné energii výrobku.

Podle předchozího zjištění lze stárnutí piva urychlit přídavkem peroxidisíranu ve vodném roztoku [8]. Předpokládá se přitom, že z těchto látek vzniká primárně ozon, který poté reaguje s organickými sloučeninami za vzniku singletového kyslíku, což je možné prokázat měřením chemiluminiscence [9]. Extrémně citlivými cíli pro reakce s aktivními formami kyslíku jsou aminokyseliny i alkoholy [10].

Pivo obsahuje bohatou směs sloučenin, zahrnující cukry, aminokyseliny, polyfenoly, alkoholy, hořké látky a malé množství lipidů. Prakticky všechny sloučeniny mohou reagovat s kyslíkovými radikály za tvorby jak senzoricky aktivních, tak neaktivních sloučenin.

V minulém sdělení jsme prokázali schopnost potlačit oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu předpokládanými antioxidanty, např. kyselinou ferulovou, polyfenolovými látkami, vodními výluhy chmele, sladiny nebo čaje. Překvapivě dobrým antioxidantem byl ethanol [10].

2. MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE

2.1 Chemikálie a příprava roztoku

Peroxidisíran draselný, 2-furfural, glukosa, maltosa, xylosa (MERCK, SRN), 2-fenylethanol, 2-furfurylalkohol, benzylalkohol,

kyselina ferulová, (+) katechin hydrát, kyselina askorbová, DL-fenylalanin, L-cystein (FLUKA, Švýcarsko), ethanol 96,5 % rafinovaný jemný (Lihovar Chrudim, ČR). Roztoky všech látek se připravovaly rozpouštěním v destilované vodě, s výjimkou komplexního roztoku aminokyselin pro přípravu melanoidinů (odst. 2.3).

2.2 Roztoky antioxidantů

Chmelový a čajový výluh ($c = 2,5 \text{ g.l}^{-1}$) se připravily podle [10]. Jako potencionální antioxidant se testovaly vodné roztoky kyselin ferulové ($c = 200 \text{ mg.l}^{-1}$), cysteinu ($c = 20 \text{ mg.l}^{-1}$), (+) katechinu ($c = 200 \text{ mg.l}^{-1}$), kyselin askorbové ($c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$) a ethanolu ($c = 10 \% \text{ obj.}$).

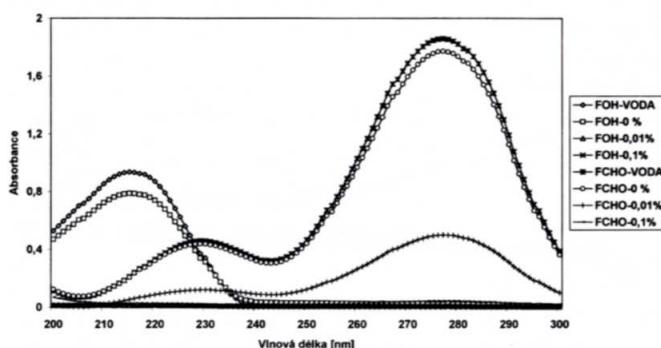
2.3 Roztok melanoidinů

V 1 litru vodovodní vody se rozpustilo 80 g maltosy, 20 g glukosy, 150 mg xylosy a směs aminokyselin o celkové koncentraci 1000 mg.l^{-1} [11]. Podrobné složení směsi aminokyselin a jejich původ uvádí práce [11]. Po úpravě pH kyselinou fosforečnou a hydroxidem sodným ($c = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$) na hodnotu pH = 5,5 se směs vařila 2 h za přístupu vzduchu v otevřeném nerezovém hrnci při dolévání vody na původní objem.

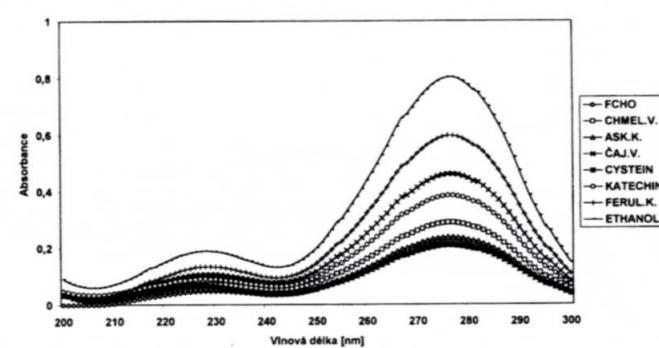
2.4 Oxidace furfurylalkoholu

a furfuralu v destilačním testu

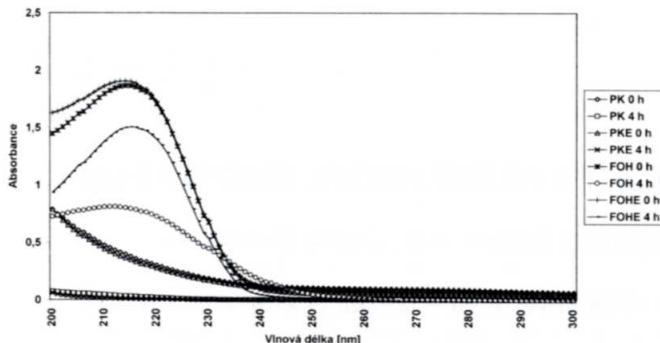
K 100 ml roztoku furfurylalkoholu ($c = 5 \text{ mg.l}^{-1}$), nebo furfuralu ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) se přidalo 0,2 a 2,0 ml roztoku peroxidisíranu draselného ($c = 5 \%$) a směs se přeháněla vodní párou. Po doplnění destilátu na 100 ml destilovanou vodou se proměřilo absorpcní spektrum vzorků proti destilované vodě. Současně se proměřilo absorpcní spektrum roztoku obou látek v destilované vodě ve stejné koncentraci (obr. 1).



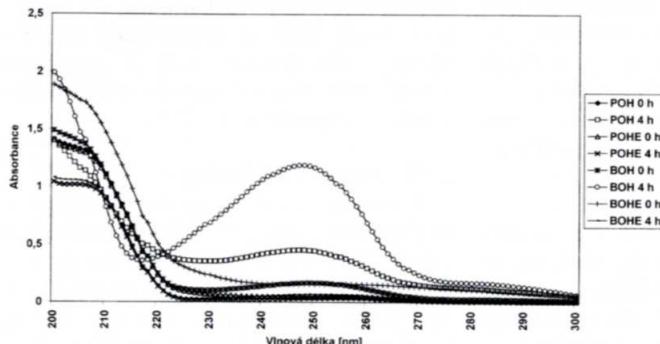
Obr. 1 Absorpční spektra furfurylalkoholu (FOH) ($c = 5 \text{ mg.l}^{-1}$) a furfuralu (FCHO) ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) při oxidaci peroxidisíranem draselným ($c = 0,01$ a $0,1 \%$) v destilačním testu



Obr. 2 Absorpční spekra furfuralu (FCHO) ($c = 5 \text{ mg.l}^{-1}$) při oxidaci peroxidisíranem draselným ($c = 0,01 \%$) v přítomnosti antioxidantů v destilačním testu



Obr. 3 Absorpční spektra furfurylalkoholu (FOH) ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) při oxidaci peroxodisíranem draselným (PK) ($c = 0,01 \%$) ve vodném roztoku a v roztoku ethanolu (E) ($c = 5 \%$ obj.)



Obr. 4 Absorpční spektra furfurylalkoholu (FOH) a benzylalkoholu (BOH) ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) při oxidaci peroxodisíranem draselným ($c = 0,01 \%$) ve vodném roztoku a v ethanolu (E) ($c = 5 \%$ obj.)

2.5 Destilační test antioxidačních vlastností

K 50 ml roztoku furfuralu ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) se přidalo 50 ml roztoku antioxidantu podle odstavce 2.2, 0,2 ml peroxodisíranu draselného ($c = 5 \%$) a směs se přeháněla vodní párou. Po doplnění destilátu na 100 ml destilovanou vodou se proměřilo absorpcní spektrum (obr. 2).

2.6 Oxidace vyšších alkoholů ve vodním prostředí v přítomnosti ethanolu

Pro ověření změn absorbance při oxidaci vyšších alkoholů přímo ve vodním roztoku při pasterační teplotě se k 200 ml vodních roztoků vyšších alkoholů ($c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) přidal 0,4 ml roztoku peroxodisíranu draselného ($c = 5 \%$) a roztoky se zahřívaly při 60°C . Ke stejné sérii vzorků se před ohřevem přidal ethanol ve výsledné koncentraci 5 % obj. Před ohřevem a po něm se měřila absorpcní spektra vzorků (obr. 3, 4).

2.7 Kinetika tvorby zákalu při oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu

K 200 ml roztoku fenylalaninu a 2-fenylethanolu ($c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$) se přidal 0,4, 4 a 40 ml roztoku peroxodisíranu draselného ($c = 5 \%$) a roztoky se zahřívaly 0 až 24 h při teplotách 40 až 80°C . V dvouhodinových intervalech se měřil zákal vzorků (obr. 5, 6).

2.8 Chemiluminiscenční test

Ke vzorkům jednotlivých sloučenin, piv i pivovarských substrátů se přidal roztok peroxodisíranu draselného a ihned po smíchání se v závislosti na čase měřila intenzita chemiluminiscence při 45°C v luminometru BioOrbit 1251 (obr. 7, 8). Měření zajišťovalo pracoviště Biofyzikálního ústavu ČAV v Brně (Dr. Číž, Dr. Lojek).

2.9 Změny absorpcního spektra melanoidinů při skladování

Po přehánění čerstvě připraveného roz-

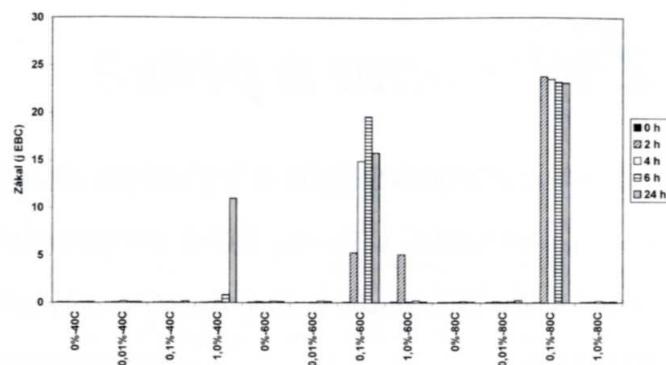
toku melanoidinů vodní párou bez a s přídavkem peroxodisíranu draselného ($c = 0,1 \%$) se proměřilo absorpcní spektrum destilátu. Roztok melanoidinů se potom skládalo bez a s přídavkem ethanolu ($c = 5 \%$ obj.) po 3 dny při 5 a 50°C . Po přehánění vodní párou se opět změřila spektra destilátů (obr. 9).

2.10 Přehánění vodní párou

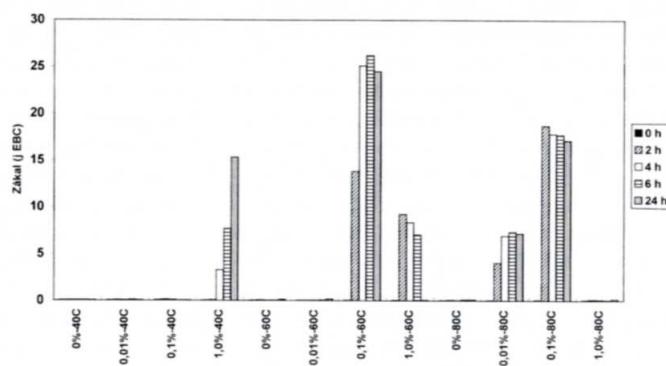
Při přehánění vodní párou podle odstavců 2.4, 2.5 a 2.9 se ze 100 ml vzorku během 10 min přehnalo 50 ml destilátu a po doplnění destilovanou vodou na 100 ml se proměřilo absorpcní spektrum proti destilované vodě.

2.11 Použité přístroje

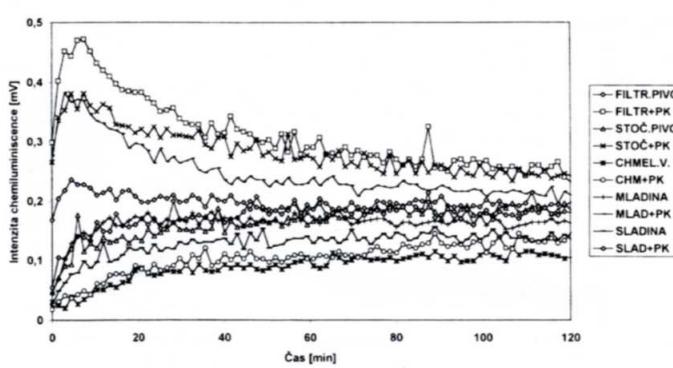
Hodnoty absorbancí a absorpcní spektra se měřila spektrofotometrem CADAS 100 (Dr. B. Lange, SRN) v 1 cm křemenné kyvetě s programy PCSCAN s intervalem mě-



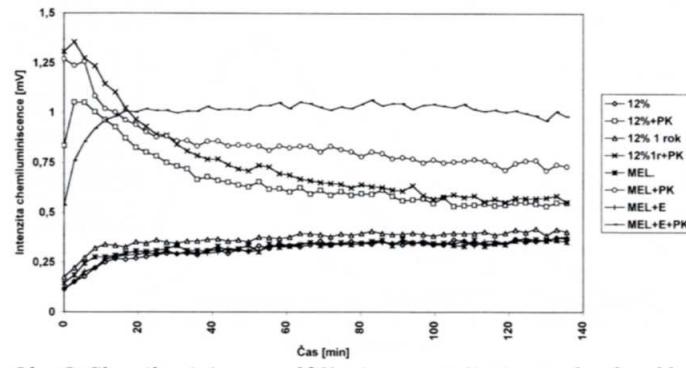
Obr. 5 Tvorba zákalu při oxidaci fenylalaninu ($c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$) peroxodisíranem draselným



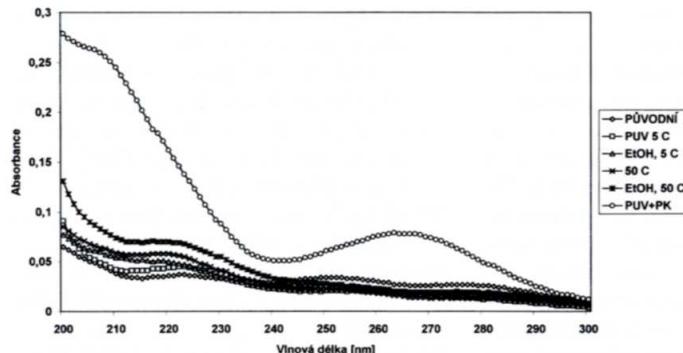
Obr. 6 Tvorba zákalu při oxidaci fenylethanolu ($c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$) peroxodisíranem draselným



Obr. 7 Chemiluminiscence pivovarských substrátů před a po přídavku peroxodisíranu draselného ($c = 5 \%$ obj.)



Obr. 8 Chemiluminiscence 12% piva po stočení a po 1 roku skladování, melanoidiny bez přídavku a s přídavkem ethanolu (E). PK = peroxodisíran draselný ($c = 0,5 \%$ obj.)



Obr. 9 Absorpční spektra destilátů melanoidinů po 3 dnech skladování při 5 a 50 °C bez a s přídavkem ethanolu ($c = 5\% \text{ obj.}$) PK = peroxodisiran draselný ($c = 0,1\%$)

ření 1 nm. Zákal se měřil zákalometrem LTP 6B (Dr.B.Lange, SRN)

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Oxidace furfurylalkoholu a furfuralu v destilačním testu prokázala rychlou degradaci obou sloučenin i v relativně nízkých koncentracích peroxodisiranu draselného. Při oxidaci furfurylalkoholu se přitom v destilátu neprokázalo typické absorpční spektrum furfuralu, což svědčí o další destrukci této sloučeniny. Pro porovnání se naznačovala absorpční spektra vodních roztoků furfurylalkoholu a furfuralu před přeháněním vodní párou (obr. 1).

Presto lze běžně furfural v pivu prokázat, přičemž jeho obsah stoupá při stárnutí, čehož se využívá při průkazu termického stárnutí piva. Vysvětlení lze nalézt v působení antioxidačních látek piva, které silně potlačovaly oxidační účinek peroxodisiranu (obr. 2). Antioxidanty působily přibližně ve stejném pořadí, jako při oxidaci fenylalaninu a fenylethanolu [10].

Kromě vzniku furfuralu kyselou degradací pentos lze uvážit i vznik furfuralu oxidací furfurylalkoholu aktivními formami kyslíku, neboť furfurylalkohol se v pivu nachází v dostatečném množství [12]. Tuto možnost by rozholilo sledování obsahu furfurylalkoholu během stárnutí piva.

Pro ověření antioxidačního účinku ethanolu se ve vodním roztoku oxidovaly fenylethanol, benzylalkohol a furfurylalkohol v přítomnosti ethanolu. Ethanol částečně potlačoval oxidaci furfurylalkoholu, u fenylethanolu a benzylalkoholu se inhibiční účinek ethanolu prokázal snížením absorpčního maxima při 250 nm, které odpovídá tvorbě benzaldehydu (obr. 3, 4).

Při oxidaci vyšších koncentrací fenylalaninu a fenylethanolu se tvoří měřitelný zákal, čehož lze využít při zákalotvorném testu antioxidačního účinku různých látek [10]. Průběh a podmínky tvorby zákalu znázorňují obr. 5 a 6. Při teplotě 40 °C vzniká zákal až při relativně vysoké 1% koncentraci peroxodisiranu, zatímco při 80 °C stejná koncentrace již zákal degraduje. Zajímavá je také podobnost v kinetice tvorby a degradace zákalu u fenylalaninu i fenylethanolu, z čehož vyplývá, že chování obou sloučenin při

ších studiích. Kromě toho lze předpokládat bohatší spektrum senzoricky aktivních látek u aminokyselin, kterých je v pivě přítomno více druhů a s vyšší koncentrací než příslušných vyšších alkoholů.

V předchozích pokusech jsme zjistili, že ethanol inhibuje také tvorbu zákalu v této reakci. Meziproduktem oxidace v zákalotvorné reakci je benzaldehyd, jak se prokázalo porovnáním jeho absorpčního spektra i analýzou produktu oxidace kombinací plynové chromatografie i hmotové spektroskopie [13]. Ve shodě s tím lze tvorbu zákalu vyvolat oxidací benzylalkoholu i benzaldehydu. Jako hlavní produkt oxidace fenylalaninu i fenylethanolu vzniká ovšem fenylcetaldehyd.

Vznik benzylaldehydu z fenylalaninu představuje důležitý teoretický problém, neboť znamená zkrácení uhlíkatého řetězce o postranní methylenovou skupinu. Předpokládáme, že toto zkrácení vzniká v důsledku radikálových reakcí a lze očekávat i tvorbu dalších minoritních sloučenin.

Z výsledků vyplývají rovněž obecné vzory pro oxidaci aminokyselin i vyšších alkoholů, přičemž je nutné uvažovat tvorbu různých produktů při jejich následném odbourávání na jednodušší sloučeniny, posléze až na oxid uhličitý a vodu. Tyto reakce mohou v různém rozsahu inhibovat další látky, jako jsou polyfenoly, ale také samotné aminokyseliny a vyšší alkoholy.

Pojem antioxidant se potom stává relativním, neboť na cíli oxidační reakce závisí, jaká aminokyselina nebo alkohol bude tuto reakci inhibovat. Na vlastnostech produktu oxidace bude rovněž záležet význam antioxidantu. Dosud se pojedant považoval k látkám, bránícím tvorbu nežádoucího produktu oxidace, nebo rozkladu žádoucí látky. V technologickém slova smyslu se za antioxidant považují jakékoli látky, bránící nežádoucímu, spotřebitelsky významným změnám výrobku vlivem oxidace.

Antioxidační účinek mohou mít ale i jednoduché látky, např. ethanol nebo fenylalanin, blokující oxidační reakce za tvorby nežádoucích sloučenin, např. acetaldehydu nebo benzaldehydu v oblasti pod senzorickou prahou hodnotou.

V závislosti na koncentraci těchto látek si lze dále představit jejich kladné působení

oxidaci vyplývá ze základní stavby aromatické molekuly aminokyseliny a je jen málo ovlivněna změnou funkční skupinou postranního alifatického řetězce. Podle této domněnky by aminokyseliny i vyšší alkoholy mohly být přibližně stejně citlivými cíli pro aktivní formy kyslíku. Tuto hypotézu však bude nutné potvrdit v dalších studiích.

Kromě toho lze předpokládat bohatší spektrum senzoricky aktivních látek u aminokyselin, kterých je v pivě přítomno více druhů a s vyšší koncentrací než příslušných vyšších alkoholů.

při nízkých koncentracích a záporné působení při vyšších koncentracích, inhibujících sice oxidační reakce, ale negativně ovlivňujících celkový výsledek tvorbou nežádoucího produktu.

Při stárnutí potravin jsou rozhodující výsledné senzorické změny potraviny, které mohou zahrnovat i tvorbu látek, vznikajících ze sloučenin, specifických pouze pro daný produkt. K tomu přistupují oxidace obecně přítomných složek, např. aminokyselin, přičemž se oxidační reakce navzájem ovlivňují v různém rozsahu.

Za ideální antioxidant lze obecně považovat látku, inhibující co nejvíce oxidační reakce, přičemž její vlastní oxidační produkty nemají senzorickou aktivitu. Ačkoliv některé práce zpochybňují význam oxidačních změn aminokyselin při stárnutí piva, jiné studie prokázaly významné změny vybraných aminokyselin při stárnutí piva [14, 15]. Stupeň oxidačního účinku zřejmě závisí i na druhu oxidačního činidla, neboť např. při fotooxidaci piva vzniká letinková chuť a vůně, na rozdíl od typických chutí.

Užitečnou metodou studia radikálových reakcí je chemiluminiscence. Při zkoumání antioxidačních reakcí se obvykle tvorba radikálů indukuje ohrevem s vhodnou organickou nebo anorganickou sloučeninou a sleduje se účinek antioxidantu při zhášení chemiluminiscence.

Při testování vlivu přídavku roztoků peroxodisiranů se potvrdilo zvýšení intenzity chemiluminiscence v závislosti na druhu meziproduktu výroby piva (obr. 7). Po přídavku peroxodisiranu se zvýšila chemiluminiscence sladiny, mladin a piva, prakticky bez změny zůstal vodní výluk chmele. Antioxidační působení chmelového výluhu bylo dobře patrné, a proto lze látky chmele považovat za vhodný antioxidant.

Zvýšení chemiluminiscence bylo přitom nejvyšší u piva. Peroxodisiran lze tedy považovat za sloučeninu, mající schopnost zesilovat přirozenou chemiluminiscenci piva a meziproduktů. Touto metodou lze měřit prooxidační i antioxidační účinek různých látek, podle toho, zda mohou zeslabovat, nebo naopak zesilovat přirozenou chemiluminiscenci piva, či dokonce zjistit, které látky mohou chemiluminiscenci vyvolat.

Po měření chemiluminiscence jednotlivých složek piva po přídavku roztoku peroxodisiranu draselného se prokázalo, že melanoidní látky vykazovaly přirozenou chemiluminiscenci, která zesílila po přídavku peroxodisiranu (obr. 8). Z obrázku je rovněž dobrý patrný rozdíl ve vyšším nárustu chemiluminiscence u piva, skladovaného po dobu 1 roku. Vysokou chemiluminiscenci rovněž vykazoval roztok melanoidinů, přičemž tvar chemiluminiscenční křivky se poněkud změnil přídavkem ethanolu.

Na schopnost melanoidinů oxidovat vyšší alkoholy upozornil již Hashimoto [16]. Lze předpokládat i možné oxidační působení na aminokyseliny, přičemž jeho intenzita bude záviset na druhu melanoidních látek, které teoreticky mohou vznik-

nout z různých druhů aminokyselin a sacharidů, přičemž se může uplatňovat i inhibiční působení některých aminokyselin, zbývajících v původní směsi. Tím je možné objasnit prooxidační i antioxidační vlastnosti melanoidinů ve směsi s aminokyselinami. Stárnutí piva lze obecně vysvětlit ubýváním antioxidačních vlastností piva. Ve shodě s tím se podařilo prokázat tvorbu těkavých látek, absorbuječích v UV světle po skladování roztoku melanoidinů při vyšší teplotě (obr. 9). Tvorbu těchto látek přitom neinhiboval přídavek ethanolu, na rozdíl od oxidace fenylalaninu.

4. ZÁVĚR

Z výsledků oxidace roztoků aminokyselin a výšších alkoholů peroxidisíranem draselným vyplývá, že tyto sloučeniny mohou snadno podléhat působení aktivních forem kyslíku. Průběh oxidačních reakcí je značně složitý, přičemž se pravděpodobně uplatňují radikálové reakce, umožňující vznik různých sloučenin. Tyto přechodné produkty mohou podléhat dalším oxidacím.

Citlivost furfurylkoholu i furfuralu k oxidaci lze využít k studiu prooxidačního i antioxidačního účinku různých látek, neboť jejich odbourávání lze snadno spektrofotometricky sledovat po přehánění vodní párou.

Oxidační reakce je možné potlačit působením antioxidantů. Některé z nich sice inhibují oxidační reakce, ale současně mohou podléhat rozkladu za tvorby senzoricky nežádoucích sloučenin. Z tohoto důvodu lze aminokyseliny i vyšší alkoholy současně po-

važovat za biochemické cíle oxidace a některé z nich i za antioxidanty.

Citlivost piva k oxidačním reakcím je možné sledovat měřením chemiluminiscence po přídavku roztoku peroxidisíranu draselného. Tato látka zesiluje pěirozenou chemiluminiscenci piva a reakce se může použít k měření antioxidačního účinku jednotlivých látek piva. Výrazný antioxidační účinek vykazoval vodný výluh chmele.

Měření chemiluminiscence melanoidinů po přídavku roztoku peroxidisíranu draselného prokázalo prooxidační schopnost melanoidních látek. Předpokládáme, že melanoidní látky mohou oxidovat aminokyseliny za tvorbu těkavých, senzoricky aktivních látek, přičemž přítomnost volných aminokyselin v roztoku může ovlivnit výsledný efekt oxidace. Při skladování roztoku melanoidinů při vyšší teplotě se podařilo prokázat tvorbu těkavých látek. Předpokládáme, že stárnutí piva se zakládá na oxidačním působení melanoidních látek na aminokyseliny a alkoholy, přičemž postupný pokles antioxidační kapacity zvýrazňuje jeho senzorické změny.

LITERATURA

- [1] PUNCHARD, N.A., KELLY, J.F.: *Free radicals – a practical approach*. Oxford University Press, New York 1996.
- [2] CADENAS, E., PACKER, L.: *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- [3] BAMFORTH, C.W., MULLER, R. E., WALKER, M. O.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51**, 1993, s. 79.
- [4] ZEISE, S., KLEIN, J., KROH, L., STROESSER, R.: *Strategies for food quality control and analytical methods in Europe*. Proc. 6. Eur. Conf. Food Chem. Hamburg, 1991, s. 280.
- [5] SELLÉS, J.F.: *Techn. Quart. MBAA* **34**, 1997, s. 249.
- [6] KANEDA, H., KANO, Y., KAMIMURA, M.: *J. Inst. Brew.* **97**, 1991, s. 105.
- [7] UCHIDA, M., SUGA, S., ONO, M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, s. 205.
- [8] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., ZDVIHALOVÁ, D.: *Kvasny Prum.* **41**, 1995, s. 374.
- [9] KANOFSKY, J.R., SIMA, P.: *J. Biol. Chem.* **266**, 1991, s. 9039.
- [10] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D.: *Kvasny Prum.* **44**, 1998, s. 171.
- [11] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: *Kvasny Prum.* **44**, 1998, s. 40.
- [12] MOLL, M.: *Beers and coolers*. Andover, Hampshire 1994, Velká Británie
- [13] VELÍŠEK, J.: osobní sdělení.
- [14] THUM, B., MIEDANER, H., NARZISS, L., BACK, W.: *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.* 1995, s. 499.
- [15] HILL, P., LUSTIG, S., SAWATZKI, V.: *Mschr. Brauwiss.* **51**, 1998, s. 36.
- [16] HASHIMOTO, N., ESHIMA, T.: *J. Am. Soc. Brew.* **35**, 1997, s. 145.

*Lektorovala Ing. Michaela Poledníková
Do redakce došlo 17. 8. 1998*