# Vývoj vybraných analytických ukazatelů piva v průběhu technologického procesu

Bc. Jiří Fanta

Diplomová práce
2011

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

| | |
|---|---|
| Jméno a příjmení: | **Bc. Jiří FANTA** |
| Osobní číslo: | **T09647** |
| Studijní program: | **N 2901 Chemie a technologie potravin** |
| Studijní obor: | **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin** |
| Téma práce: | **Vývoj vybraných analytických ukazatelů piva v průběhu technologického procesu** |

Zásady pro vypracování:

**I. Teoretická část**

1. **Stručně pojednejte o technologii a mikrobiologii piva**
2. **Uveďte chemické složení piva se zaměřením na antioxidační látky**
3. **Přehledně uveďte metody pro stanovení polyfenolyckých látek a celkové antioxidační kapacity piva**
4. **Podrobněji se zaměřte na jednoduché instrumentální metody vhodné do provozu**

**II. Praktická část**

1. **U vybraných vzorků piv proveďte stanovení celkových polyfenolických látek a celkové antioxidační kapacity u jednotlivých mezistupňů technologického procesu**
2. **Chemické analýzy doplňte také jednoduchými mikrobiologickými rozbory**
3. **Získané výsledky statisticky vyhodnoťte a formulujte závěry**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**[1] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chem. Listy 2004, 98(4), 174–179.**
**[2] BASAŘOVÁ, G. A spol. Pivovarsko sladařská analytika. Praha: Merkanta, s.r.o., 1. díl, 1992, 338 p., 2. díl 1993, 248 p., 3 díl 1993, 199, 322 p.**
**[3] DVOŘÁKOVÁ, M., DOSTÁLEK, P., SKULILOVÁ, Z., JURKOVÁ, M., KELLNER, V., GUIDO, L.F. Polyfenoly ječmene a sladu a jejich antioxidační vlastnosti. Kvasný Prům. 56, 2010, č. 3, s. 160–163.**
**[4] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. Potravinářská biochemie, 2. Vyd. Praha: SNTL–ALFA, 1981. 360 s.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Valášek, CSc.**
Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
*děkan*

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Fanta Jiří Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

# P R O H L Á Š E N Í

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1)];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 20.5.2011

.....

[1] *zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:*

*(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.*

*(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

*(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

[2] *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

*(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).*

[3] *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

*(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

*(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

*(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá metodami vhodnými ke stanovení antioxidační kapacity piva, metodami vhodnými ke stanovení polyfenolů v pivu a popisem mikrobiologie pivovarské výroby. Byla provedena literární rešerše popisující technologický proces výroby piva a chemické složení piva, sladu a chmele. Následuje popis metod stanovení antioxidační kapacity, popis moderních instrumentálních technik běžně využívaných pro analýzu polyfenolů. Teoretická část je doplněna popisem mikrobiologie pivovarské výroby. V experimentální části byly analyzovány vzorky piv z různých mezistupňů technologického procesu a vzorek chmele. Byly provedeny analýzy pro stanovení celkové antioxidační kapacity metodou DPPH a obsahu celkových polyfenolů metodou s Folin-Ciocalteauovým činidlem. Anylýzy byly doplněny jednoduchými mikrobiologickými rozbory.



Klíčová slova: Slad, chmel, pivo, technologie, spektrofotometr, antioxidační kapacita, polyfenoly, mikrobiologie, kvasinky



## ABSTRACT

This theses deal with appropriate methods to determine antioxidant capacity of beer, methods to determine polyphenols in beer and with description of microbiology of brewery technology. It was described technological process of brewing and chemical composition of beer, malt and hops. Next it was described methods for antioxidant capacity, modern instrumental methods for analysis of polyphenols. Teoretical part is completed with description of mikrobiology of brewery. In experimental part were analyzed samples of beer from different stages of technological brewing process and sample of hops. Samples were analyzed for antioxidant capacity with DPPH method and for polyphenols with Folin-Ciocalteau reagent method. Analysis were completed with simple microbiology tests.



Keywords: malt, hops, beer, technology, spectrophotometer, antioxidant capacity, polyphenols, mikrobiology, yeast

Tímto bych rád poděkoval panu Doc. Pavlu Valáškovi, CSc. za vedení a odborné rady v průběhu vypracovávání diplomové práce. Dále děkuji paní Jaroslavě Řemenovské za odbornou pomoc a vedení při analytických stanoveních v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji celé své rodině za všestrannou podporu ve studiu.

Motto:

*„Investice do vědění nesou nejvyšší úrok“*

*Franklin Benjamin*

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uveden jakou spoluautor. Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně 20.5.2011

……

Podpis diplomanta

# OBSAH

**ÚVOD** ..... **11**
**I TEORETICKÁ ČÁST** ..... **12**
**1 TECHNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE PIVA** ..... **13**
1.1 PŘÍPRAVA MLADINY ..... 13
1.1.1 Mletí sladu – šrotování ..... 13
1.1.2 Vystírání a zapařování ..... 13
1.1.3 Rmutování ..... 14
1.1.4 Scezování sladiny a vyslazování mláta ..... 15
1.1.5 Vaření sladiny s chmelem – chmelovar ..... 15
1.1.6 Chlazení mladiny a odlučování kalů ..... 16
1.2 KVAŠENÍ MLADINY A DOKVAŠOVÁNÍ PIVA ..... 16
1.2.1 Pivovarské kvasinky ..... 16
1.2.2 Hlavní kvašení ..... 17
1.2.3 Dokvašování a zrání piva ..... 18
1.3 MIKROBIOLOGIE PIVOVARSKÉ VÝROBY ..... 19
1.3.1 Plísně ..... 19
1.3.2 Cizí kvasinky ..... 20
1.3.3 Bakterie v pivovarství ..... 20
1.3.4 Mikrobiologie výroby piva ..... 21
**2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ PIVA SE ZAMĚŘENÍM NA ANTIOXIDAČNÍ LÁTKY** ..... **23**
2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ PIVA ..... 23
2.1.1 Voda ..... 23
2.1.1.1 Tvrdost vody ..... 23
2.1.2 Sacharidy piva ..... 24
2.1.3 Hořké chmelové látky ..... 24
2.1.4 Polyfenolické látky piva ..... 25
2.1.4.1 Antioxidační účinky polyfenolů ..... 26
2.1.5 Proteiny piva ..... 26
2.1.6 Etanol ..... 27
2.1.7 Vitaminy a minerální látky ..... 27
2.1.8 Oxid uhličitý ..... 27
2.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ SLADU ..... 28
2.2.1 Vlhkost ..... 28
2.2.2 Škrob ..... 28
2.2.3 Dusíkaté látky sladu ..... 31
2.2.4 Neškrobové polysacharidy sladu ..... 32
2.2.5 Lipidy sladu ..... 34
2.2.6 Polyfenolické sloučeniny sladu ..... 34
2.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ CHMELE ..... 36
2.3.1 Obsah vody v chmelu ..... 37
2.3.2 Chmelové pryskyřice ..... 37
2.3.3 Chmelové silice ..... 39
2.3.4 Polyfenolické látky chmele ..... 40
2.3.5 Sacharidy chmele ..... 42

2.3.6 Dusíkaté látky chmele ... 42
2.3.7 Lipidy chmele ... 42
2.3.8 Minerální látky chmele ... 42
**3 METODY STANOVENÍ POLYFENOLŮ V PIVU ... 43**
3.1 METODY STANOVENÍ PŘÍRODNÍCH POLYFENOLŮ ... 43
3.1.1 Izolace fenolických látek ... 43
3.1.1.1 Extrakce pevnou fází (Solid-Phase Extraktion – SPE) ... 43
3.1.1.2 Disperze matrice na pevné fázi (Matrix Solid-Phase Dispersion) ... 43
3.1.1.3 Mikroextrakce pevnou fází (SPME) ... 43
3.2 SEPARACE FENOLICKÝCH LÁTEK – ZÁKLADNÍ INSTRUMENTÁLNÍ METODY ... 44
3.2.1 Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC) ... 44
3.2.2 Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis – CE) ... 44
3.2.3 Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography – TLC) ... 44
3.2.4 Separace flavonoidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatogrphy – HPLC) ... 45
3.3 METODA LC/MS V ANALÝZE FLAVONOIDŮ ... 45
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie ... 46
**4 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PIVA ... 47**
4.1 METODY ZALOŽENÉ NA ELIMINACI RADIKÁLŮ ... 47
4.1.1 Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů ... 47
4.1.1.1 Metoda používající $ABTS^{-+}$ (metoda TEAC) ... 47
4.1.1.2 Metoda pouřívající DPPH ... 48
4.1.1.3 Metoda používající galvinoxyl ... 49
4.1.1.4 Využití jiných stabilních radikálů ... 49
4.1.2 Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů ... 49
4.1.2.1 Metoda ORAC ... 49
4.1.2.2 Metody založené na vychytávání OH-radikálů ... 50
4.1.2.3 Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu ... 50
4.1.3 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace ... 50
4.2 METODY ZALOŽENÉ NA HODNOCENÍ REDOXNÍCH VLASTNOSTÍ LÁTEK ... 51
4.2.1 Metody chemické ... 52
4.2.1.1 Metoda FRAP ... 52
4.2.2 Elektrochemické metody ... 52
4.2.2.1 Cyklická volumetrie ... 52
4.2.2.2 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí ... 52
**II PRAKTICKÁ ČÁST ... 54**
**5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 55**
5.1 VZORKY ... 55
5.1.1 Vzorky piva z jednotlivých fází technologického procesu ... 55
5.1.2 Vzorky chmele a jejich příprava ... 57
5.2 STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY SPEKTROFOTOMETRICKY METODOU DPPH ... 57
5.2.1 Princip metody DPPH ... 57
5.2.2 Instrumentace ... 58
5.2.3 Chemikálie a roztoky ... 58
5.2.4 Pracovní postup ... 58

5.3 STANOVENÍ CELKOVÝCH POLYFENOLŮ SPEKTROFOTOMETRICKY METODOU FOLIN-CIOCALTEAUOVÝM ČINIDLEM ..... 60
5.3.1 Princip metody Folin-Ciocalteauovým činidlem ..... 60
5.3.2 Instrumentace ..... 60
5.3.3 Chemikálie a roztoky ..... 61
5.3.4 Pracovní postup ..... 61
5.4 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ, KVASINEK A PLÍSNÍ ..... 62
5.4.1 Princip metody ..... 62
5.4.2 Instrumentace ..... 62
5.4.3 Cemikálie a roztoky ..... 63
5.4.4 Pracovní postup ..... 63
**6 VÝSLEDKY A DISKUSE ..... 65**
6.1 STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY SPEKTROFOTOMETRICKY METODOU DPPH ..... 65
6.2 STANOVENÍ CELKOVÝCH POLYFENOLŮ SPEKTROFOTOMETRICKY METODOU FOLIN-CIOCALTEAU ..... 69
6.3 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ, KVASINEK A PLÍSNÍ ..... 77
**ZÁVĚR ..... 80**
**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ..... 82**
**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK ..... 88**
**SEZNAM OBRÁZKŮ ..... 89**
**SEZNAM TABULEK ..... 91**
**SEZNAM PŘÍLOH ..... 92**

# ÚVOD

Protože polyfenolům je v potravinářském průmyslu všeobecně věnována stále větší pozornost, je jistě účelné, zkoumat z tohoto hlediska pivo a suroviny pro jeho výrobu. Na polyfenoly z ječného sladu nebo z chmele ještě dnes mnoho pivovarníků pohlíží jako na složky spíše rušivé, protože určité skupiny polyfenolů podporují tvorbu nevratných zákalů ve vychlazeném pivu. Polyfenolické látky, jako nejširší skupina antioxidantů v pivovarství, hrají důležitou úlohu i bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování.

Jednou z možností, jak chránit organismus před vlivem volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek. Mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají spolu s potravou, má antioxidační vlastnosti. V řadě experimentálních studií bylo zjištěno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než u antioxidačních vitaminů.

V buňkách lidského organismu probíhá nespočetně reakcí a procesů, které jsou nezbytné pro život. Tyto reakce jsou však zároveň zdrojem vedlejších produktů zvaných volné radikály, které můžou oxidací poškodit nebo zcela zničit zdravé tělní buňky. Proto se lidský organismus spoléhá na antioxidanty, které s těmito volnými radikály reagují. Tímto chrání buňky před poškozením, které může vést až k chorobám jako je rakovina, srdeční onemocnění, ale je také součástí přirozeného procesu stárnutí organismu. Dostatečný přísun antioxidantů ve stravě zajistí lepší ochranu před těmito chorobami a pomůže zpomalit stárnutí organismu.

Vzhledem k tomu, že pivo je u nás velmi oblíbeným a vyhledávaným nápojem, patří tak mezi jeden z nejvýznamnějších zdrojů přírodních antioxidantů v potravě. Velký význam se přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám, které patří mezi nejširší skupinu antioxidantů v pivovarství.

# I. TEORETICKÁ ČÁST

# 1 TECHNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE PIVA

Tato práce byla vypracována pro malý rodinný pivovar, kde výroba piva začíná šrotováním sladu a končí stáčením nefiltrovaného piva přímo z ležáckých tanků k spotřebiteli. Proto i technologický proces výroby piva je zde popsán mezi těmito fázemi, procesy sladování ječme, filtrace či plnění do přepravních obalů jsou záměrně vynechány. Je určitou konkurenční výhodou malého pivovaru prezentovat své pivo jako zdroj zdraví prospěšných antioxidantů.

## 1.1 Příprava mladiny

### 1.1.1 Mletí sladu – šrotování

Účelem mletí sladu je dokonalé vymletí endospermu sladových zrn na vhodné podíly jemných a hrubých částic při zachování celistvosti obalových pluch. Mechanické rozrušení zrna je potřebné pro zpřístupnění extraktivních látek sladu a urychlení jejich rozpouštění a fyzikální, chemické a biochemické změny, které probíhají při rmutování a v dalších fázích přípravy mladiny. Po rozemletí sladu nesmí šrot obsahovat žádná celá zrna.

Pluchy jsou poměrně elastické a zvláště u křehkých zrn dobře rozluštěného sladu odolávají tlaku při mletí. Zachování celistvosti pluch je důležité pro mletí sladu za sucha a je podmínkou pro vytvoření filtrační přepážky při scezování a vyslazování mláta na scezovací kádi. Rozemleté pluchy tento proces prodlužují, látky z nich vyloužené zhoršují barvu sladiny a následně i barvu, charakter hořkosti, celkový chuťový profil, koloidní i senzorickou stabilitu piva [1].

### 1.1.2 Vystírání a zapařování

Cílem vystírání je dobře smíchat sladový šrot s nálevem varní vody. Výběr surovin, jejich dávky, způsob vystírání a rmutování jsou prvým předpokladem docílení složení sladiny důležitého pro určitý typ piva. K zajištění potřebné kvality je třeba mechanické a fyzikální procesy při šrotování a vystírání optimálně regulovat pro chemické a biochemické reakce, které probíhají při rmutování, scezování a chmelovaru [2].

Převedení tuhých částí sladového šrotu pouhým smícháním s vodou je velmi omezené, protože slad obsahuje jen malý podíl ve vodě rozpustných látek. Přitom pro docílení dobrého varního výtěžku je nutné převést do roztoku maximální množství rozpustných látek.

Převod látek do roztoku při vystírání ovlivní celý další proces výroby piva i jeho kvalitu. Množství rozpuštěných látek závisí na sypání, a na objemu vody v hlavním nálevu.

Pro světlá piva se volí větší nálev, aby se získal řidší rmut, ve kterém se při rmutování urychlí enzymové reakce, podporuje se činnost amylolytických enzymů a tím i rychlejší zcukření sladiny. Mladiny mají vyšší stupeň dosažitelného prokvašení, mláto zadržuje méně extraktu, a proto je i nižší potřeba vyslazovací vody.

Pro tmavá piva se naopak volí menší množství nálevu. Hustý rmut zachovává delší dobu působnost především proteolytických enzymů. Dekokční postup rmutování hustšího roztoku zvyšuje převod látek z pluch, procesy karamelizace cukrů a zvýšení barvy, což má příznivý vliv na chuť tmavého piva [2].

### 1.1.3 Rmutování

Při rmutování se převádí optimální podíl extraktu surovin do roztoku v potřebném zastoupení jednotlivých látek důležitých pro další technologický postup a kvalitu piva. Především jde o zkvasitelné cukry.

Při rmutování působí děje mechanické, chemické, fyzikální a především enzymové. Rozhodující je činnost amylolytických, proteolytických, kyselinotvorných a oxidačně-redukčních sladových enzymů. Štěpení škrobu na zkvasitelné sacharidy působením amylolytických enzymů je nejvýznamnější proces rmutování [3].

Menší část extraktu – cca 15 až 17 % - je přímo rozpustná a při rmutování se vylouží do vody pouhým účinkem míchání a zvýšené teploty, větší část vysokomolekulárních látek obilního endospermu je však možno převést do roztoku až po jejich rozštěpení sladovými enzymy, kdy se vystírka postupně zahřívá na optimální teploty pro činnost jednotlivých enzymů, podle nichž jsou teploty nazývány:

***Kyselinotvorná teplota 35 až 38°C***, které byl přisuzován vliv na zvýšení acidity, má podle současných poznatků význam spíše v tom, že podporuje rozpouštění látek extraktu a zpřístupňuje působení sladových enzymů v další gradaci teplot při rmutování

***Peptonizační teplota 48 až 52°C***, se dociluje zapařováním, tj. přidáním cody teplé 80°C k vystírce. V rozsahu uvedených teplot se podporuje nejen proteolýza, ale i štěpení fosforečnanů a neškrobových polysacharidů typu β-glukanů, především obalových částí škrobových zrn. Tím se nepřímo podporuje amylolýza škrobu v další fázi rmutování.

***Nižší cukrotvorná teplota 60 až 65°C*** zajišťuje při sdruženém působení amylolytických enzymů optimální podmínky pro aktivitu β-amylázy. V roztoku se zvyšuje především podíl redukujících cukrů. U sladů s nízkou aktivitou amylolytických enzymů se rozsahu těchto teplot aplikuje několikaminutová prodleva.

***Vyšší cukrotvorná teplota 70 až 75°C*** je důležitá pro optimální působení termostabilnějšího enzymu α-amylázy. Klesá viskozita roztoku, zvýšení redukujících cukrů je méně výrazné. V rozsahu těchto teplot se drží prodleva až do doby dosažení tzv. jodnormální reakce, kdy rmut již nedává barevnou reakci s jodovým roztokem.

***Odrmutovací teplota 78°C*** je dosažena po ukončení rmutování a spojení díla dekokčních postupů [4].

***Dekokční postupy rmutování*** se vyznačují povařováním dílčích rmutů a podle jejich počtu se dělí na jednormutové, dvourmutové a třírmutové postupy, z nichž nejčastější jsou postupy dvourmutové.

***Infůzní postupy rmutování*** zajišťují rozpouštění a štěpení extraktu sladu s dlouhodobějším účinkem sladových enzymů bez povařování rmutů.

### 1.1.4 Scezování sladiny a vyslazování mláta

Po odrmutování následuje v procesu přípravy mladiny scezování. Je to v zásadě fyzikální proces, filtrace, při kterém se nejdříve oddělí předek (roztok obsahující extraktivní látky sladu) od zbytků sladového šrotu neboli mláta. Následuje vyluhování extraktu zachyceného v mlátě horkou vodou – vyslazování. Získané vodní výluhy, výstřelky, po spojení s předkem dávají celkový objem sladiny pohromadě. Cílem scezování je získat čirou sladinu a maximum extraktu, který do procesu přinesly suroviny. [2]

### 1.1.5 Vaření sladiny s chmelem – chmelovar

Během varu sladiny s chmelem probíhá řada technologicky významných pochodů:

***Odpaření přebytečné vody.*** Dokonalé vyslazení mláta vyžaduje určitý přebytek vyslazovací vody. Jeho odpařením při chmelovaru se získá mladina požadované koncentrace.

***Inaktivace enzymů a sterilace mladiny***. Všechny enzymy jsou inaktivovány již při ohřevu sladiny do varu a mikroorganismy zničeny při pH 5,3 – 5,7 po 15 minutách varu.

***Pokles hodnoty pH a nárůst barvy***. V průběhu chmelovaru klesá hodnota pH o 0,15 – 0,25. Vzrůst barvy je ovlivněn především provzdušněním sladiny, způsobem otopu a délkou varu.

***Tvorba produktů tepelného odparu***. Se vzrůstajícím tepelným zatížením při hvozdění, rmutování a chmelovaru se zvyšuje koncentrace látek, které souhrnně označují jakou produkty Maillardovy reakce.

***Tvorba redukujících látek***. Při chmelovaru vznikají látky, které pro jejich redukční účinky nazýváme reduktory. Ochotně váží kyslík a chrání tak další složky extraktu hotového piva proti oxidaci. S rostoucím obsahem reduktorů se zvyšuje koloidní a chuťová stabilita piva.

***Koagulace bílkovin a tvorba lomu***. Původně průhledná sladina se po zahájení varu zakalí a při pokračujícím varu se začnou vylučovat nejprve velmi jemné vločky, které se postupně zvětšují do velkých shluků, označovaných jako lom mladiny.

***Reakce účinných složek chmele s mladinou***. Chmel propůjčuje mladině hořkou chuť, chmelové aroma a podporuje vylučování bílkovin [4].

### 1.1.6 Chlazení mladiny a odlučování kalů

Vyrobená mladina ve varně pivovaru se musí před zakvašením ochladit na zákvasnou teplotu. Při ochlazení se současně provzdušní a vyloučí se z ní horké neboli hrubé kaly a částečně i jemné neboli chladové kaly. Tyto procesy probíhají od teploty blízké 100°C na teplotu 6 až 8 °C [5].

## 1.2 Kvašení mladiny a dokvašování piva

Během hlavního kvašení dochází k neúplnému zkvašení cukerných látek extraktu mladiny pivovarskými kvasinkami za vzniku etanolu, oxidu uhličitého a vedlejších metabolitů se současným pomnožením kvasničného zákvasu [4].

### 1.2.1 Pivovarské kvasinky

Výroba piva se opírá o cílené využívání kvasinek, převážně druhu *Saccharomyces cerevisice*. Výrobní proces požaduje standardní kvasnice s optimálními vlastnostmi, pokud možná neměnnými i při opakovaném použití. Pivovarské kvasinky jsou v pivovarské mikrobiologické společnosti European Brewery Convention (EBC) definovány jako kulturní kvasinky používané k produkci spodně nebo svrchně kvašených piv [6].

Spodní pivovarské kvasinky *S. Cerevisiae* (*carlsbergensis*), popř (*uvarum*) se používají při výrobě piva typu ležáků v teplotním rozmezí 7 až 15°C se sedimentací kvasnic na dně nádoby. Svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevisce* se používají při výrobě piv typu Ale i dalších druhů piv s teplotním rozmezím 18 až 22°C, často s vynášením kvasnic do kvasničné deky.

Pivovarské kvasinky jsou jako všechny kvasinky jednobuněčné houby (*Fungi*) bez chlorofilu, které se podle morfologických znaků řadí do tříd hub vřeckatých (*Ascomycetes*), čeledi *Saccharomyceteaceae* (Endomycetaceae), rodu Saccharomyces [5]. Tvar buněk je kulovitý až oválný, pro starší buňky je charakteristická zřetelná ostře ohraničená vakuola. Velikost 6 – 7 x 7,5 – 8,7 μm. Povrch buňky je okolo 150 $\mu m^2$. Tomu odpovídá celkový aktivní povrch využitelný pro metabolismus, podle dávky a stupně namnožení to je 200 až 900 $m^2$ v hektolitru kvasící mladiny [7].

Kvasničný kmen a zákvasná dávka mají významný vliv na průběh kvašení a kvalitu piva a volí se podle požadavků na charakteristické vlastnosti vyráběného piva. Za klíčovou vlastnost kvasničného kmene pro kvašení je považována optimální vitalita [8].

Důležitou vlastností je optimální flokulační a sedimentační schopnost, která je geneticky kódovaná a je ovlivněna řadou faktorů [9].

### 1.2.2 Hlavní kvašení

Zdánlivá attenuace $A_z$ je rozdíl mezi původní koncentrací mladiny $E_s$ a zdánlivým extraktem piva $E_z$, skutečná attenuace $A_s$ je rozdíl mezi původní koncentrací mladiny a skutečným extraktem piva [10].

Při zakvašování 1 hl mladiny je nízká až střední dávka hustých kvasnic 0,5 l. To odpovídá asi 15 až 25 x $10^6$ buněk na 1 ml. Doba kvašení je 7 až 12 dnů. Výtěžnost kvasnic je 1,5 až 2 l hustých kvasnic na 1 hl mladého piva. Balling matematicky vyjádřil látkovou bilanci mladiny při fermentaci a experimentálně ji ověřil. Vycházel ze sumární rovnice kvašení a následujících vztahů.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_2H_5OH + CO_2 + \text{energie}$$

Ze 100 hmotnostních částí extraktu vznká 48,319 dílů $C_2H_5OH$ + 46,286 dílů $CO_2$ + 5,323 dílů sušiny kvasnic. V přepočtu platí:

2,0665 g extraktu → 1 g $C_2H_5OH$ + 0,9565 g $CO_2$ + 0,11 g kvasnic [10].

Obsah kyslíku v mladině při zakvašování a v násadních kvasnicích je důležitý především pro pomnožení kvasničných buněk. Provzdušnění by se mělo provádět v ochlazené mladině a jen po dobu zakvašování, aby se docílil obsah rozpuštěného kyslíku v rozmezí 5 až 7 mg/l. Nižší hodnoty provzdušnění mají za následek nižší tvorbu esterů, oxidu siřičitého a vyšší tvorbu alkoholů [11]. Vyšší hodnoty rozpuštěného kyslíku v mladině a nadměrné provzdušnění kvasnic naopak zvyšují tvorbu vyšších alkoholů a potlačují vznik esterů, což je nežádoucí z hlediska organoleptických vlastností piv [12]. Provzdušnění zakvašované mladiny a flotace nezakvašené mladiny snižují antioxidační vlastnosti mladiny i piva a způsobují vyšší tvorbu prekurzorů staré chuti piva.

### 1.2.3 Dokvašování a zrání piva

Při dokvašování a zrání piva tradičním postupem probíhá řada změn původního složení mladého sudovaného piva, a to v závislosti na teplotě, hradícím tlaku, době dokvašování a zrání piva. Mezi rozhodující faktory patří také fyzikálně-chemický stav mladého piva a vlastnosti použitého kmene kvasinek.

Dokvašování a zrání probíhá při nízkých teplotách, kdy teplota pozvolně klesá z 6° C na 2 až 0° C. Prokvašování zbylého extraktu je v prvních třech dnech rychlejší, kvůli promíchání a provzdušnění piva během sudování. Zbylý extrakt, který tvoří asi z 80 % maltóza a z 20 % maltotrióza, sníží přibližně na polovinu. Během dalšího zrání se extrakt pozvolna snižuje [2].

Na hradícím tlaku a teplotě během dokvašování je závislé postupné nasycování piva oxidem uhličitým. Čím je teplota nižší a tlak vyšší, tím je vazba oxidu uhličitého větší. Při tradičním kvašení obsahuje mladé pivo okolo 1 až 2 % zkvasitelného extraktu, který se mění na alkohol a oxid uhličitý [4].

Čiření piva během dokvašování a zrání závisí na teplotě a na množství kalících částeček, tj. amorfních částic a komplexů polyfenolů s polypeptidy, které jsou součástí chladového zákalu a sedají na dno ležáckých nádob společně s mrtvými kvasinkami strhávajícími další podíl vysokomolekulárních polyfenolových a dusíkatých látek. Snížení obsahu vysokomolekulárních polyfenolů v pivě při dokvašování se v tradiční výrobě pohybuje v průměru okolo 10 až 20 %, u dusíkatých látek 10 % a hořkých chmelových látek 3 až 12 % [13].

Během dokvašování a zrání piva dochází k přeměně látek, upravuje se nepříjemná hořkost a kvasničná chuť mladého piva a vytváří se typický buket a chuť zralého piva. Mění se obsah rozpuštěných látek i těkavých složek piva, a to v závislosti na použitých surovinách, technologii a na kmenu kvasinek použitých při výrobě piva [2].

## 1.3 Mikrobiologie pivovarské výroby

V pivovarské výrobě se používají při kvašení a dokvašování pivovarské kulturní kvasinky. Kromě nich se uplatňují při v různém rozsahu i jiné mikroorganismy. Většina z nich se pokládá za nežádoucí [2].

### 1.3.1 Plísně

Podobně jako kvasinky i plísně náležejí do říše hub. Podle systému používaného dosud v praxi se mikroskopické houby (mikromicety) dělí na vláknité mikromicety (mikroskopické vláknité houby, plísně), kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Plísně jsou mikroorganizmy skládající se z dlouhých vláken zvaných hyfy. V makroskopickém měřítku vytvářejí hyfy spleť vláken zvanou mycelium. Plísně se rozmnožují pohlavně i nepohlavně. Plísně mají při výrobě piva ve srovnání s kvasinkami či bakteriemi jen malý význam. Jsou často kontaminací sladařské výroby. Na klíčícím ječmenu a zeleném sladu se vyskytují převážně plísně rodu *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Mucor,* Oospora aj. [14].

Plísně tvoří přirozenou část ječmene již při jeho pěstování a sklizni Obvykle se uvádí, že jedno sklizené zrno obsahuje asi $10^3$ až $10^5$ mikroorganizmů. Zastoupení jednotlivých mikroorganizmů se dále mění při skladování zrna a specifické změny také nastávají při máčení, klíčení a sušení sladu. Již v těchto stádiích výroby mohou ovlivnit hotové pivo tvorbou senzoricky významných metabolitů, vznikem nežádoucích látek způsobujících například přepěňování (gushing) a zejména vznik nebezpečných metabolitů, jako jsou mykotoxiny a nitrosaminy. Na pomnožování plísní a bakterií na ječmenu mají vliv vnější a vnitřní podmínky skladování a antagonistické i synergické vztahy s jinými mikroorganizmy [15].

Podle teplotního rozmezí se plísně dělí na mezofilní, rostoucí v rozmezí teplot 2 až 50°C, a termofilní v rozmezí teplot 10 až 60°C, některé z nich však rostou až do teploty 71°C. Ovšem teplotní pásma růstu plísní se překrývají stejně jako je tomu u vlhkosti, kdy ex-

trémně xerofilní plísně rostou při $a_w < 0,75$, slabě xerofilní při $a_w = 0,8$ až 0,9 a hydrofilní při $a_w > 0,9$. Ve vlastní pivovarské výrobě mají plísně menší význam, neboť se v mladině a pivě pomnožují proti jiným mikroorganismům pomaleji nebo vůbec ne. Hlavním činitelem brzdících jejich rozvoj je nedostatek kyslíku. Přesto lze plísně nalézt ve stočeném pivu, např. plísně rodu *Penicillium*, *Fusarum*, *Aspergillus* aj. [14].

Plísně produkují toxické sekundární metabolity zvané mykotoxiny. Určitý mykotoxin mohou produkovat různé rody plísní a určitý druh plísně může produkovat i více mykotoxinů. Mykotoxiny jsou toxické pro rostliny i teplokrevné živočichy, včetně lidí. Mají různé biologické účinky, např. mutagenní, karcinogenní, teratogenní [16].

### 1.3.2 Cizí kvasinky

Za cizí, neboli divoké kvasinky se všeobecně považují kvasinky jiných rodů nebo druhů, než ke kterým náležejí kulturní kvasinky. Širší termín kvasničná kontaminace označuje veškeré kvasinky, které se negativně projevují v určitém místě výroby, např. i kulturní kvasinky ve filtrovaném pivu [2].

Počet, tvar a velikost spór se pokládá za důležitý identifikační znak cizích kvasinek. Pohlavní spóry mohou mít tvar jehlicový (např. *Nematospora*), oválný (např. *Schizosaccharomyces*), kloboukovitý (pichia), nebo jsou saturnovité a v asku se může nacházet jedna nebo více spór (např. osm u rodu *Schizosaccharomyces octosporus*). Počet spór nemusí být vždy stejný, vyskytují-li se haploidní spóry, nebo diploidní spóry. Cizí kvasinky se prokazují různými metodami. Klasické metody využívaly snadnou tvorbu spór některých cizích kvasinek na sádrovém kavalku nebo na půdě s octanem draselným, nebo větší odolností cizích kvasinek proti vinné kyselině [17].

Poměrně spolehlivá je metoda s krystalovou violetí, která v mladinovém agaru inhibuje růst pouze kulturních spodních kvasinek, ale nikoliv kulturních svrchních nebo cizích kvasinek. Pro detekci cizích kvasinek je vhodná půda CLEN s kadaverinem, lysinem, ethylaminem a dusičnanem jako zdroji dusíku [18].

### 1.3.3 Bakterie v pivovarství

Pivo vytváří nepříznivé podmínky pro množení mikroorganizmů, má nízké pH a snížený obsah živin, jako jsou sacharidy a aminokyseliny, většina byla spotřebována kvasinkami během kvašení [19]. Avšak navzdory těmto nepříznivým podmínkám existuje několik mikroorganizmů, kterým se daří v pivu rozrůstat. Z mnoha bakterií vyskytujících se v přírodě

má v pivovarské výrobě význam jen menší počet rodů. Mezi ně patří octové bakterie (např. *Acetobacter, Gluconobacter*), mléčné bakterie (např. *Lactobacilus, Pediococcus*), tzv. mladinové bakterie (většinou z čeledi Enterobacteriaceae), dále rody *Pectinatus, Megasphaera, Bacillus, Micrococcus, Acinetobacter, Pseudomonas* a v zahraničních pivech také *Zymomonas*. Zymomonas mobilis je odolný vůči hořkým látkám chmele. Je schopen růst při pH nad 3,4 a koncentraci alkoholu nižší než 10 %. Ke kažení piva je primárně způsobeno vyšší produkcí acetaldehydu a sulfanu [20].

### 1.3.4 Mikrobiologie výroby piva

Ve sladu je velké množství plísní, bakterií i kvasinek a varní voda obsahuje především bakterie, i když se v nádržích na vodu a potrubí mohou nacházet i kvasinky. Skladovaný suchý ječmen obsahuje hlavně koliformní bakterie a bakterie rodu *Pseudomonas*, ale při namáčení výrazně vzrůstá počet mléčných bakterií [21]. Z plísní ječmene se nejčastěji uvádějí rody *Fusarium, Alternaria* a *Cladosporium*, během skladování se vyskytuje ještě *Aspergillus* a *Penicillium*.

V průběhu výroby piva se mění vlastnosti jednotlivých meziproduktů. Hvozdění mohou přežívat termorezistentní bakterie a jejich spóry, zejména rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Ve vystírce se mohou vyskytovat gramnegativní bakterie schopné redukovat dusičnany na dusitany. Při rmutování se mohou potlačovat nebo podporovat jednotlivé skupiny mikroorganizmů v závislosti na pH a rozmezí teplot. Na konci rmutování přežívají především termorezistentní druhy mléčných bakterií a rody *Clostridium* a *Bacillus*. Někteří zástupci tohoto rodu mohou také silně redukovat dusičnany na dusitany a způsobovat tvorbu nitrosaminů [22].

Sladina je tekutý substrát s vysokou koncentrací sacharidů, dusíkatých látek a růstových faktorů, takže se v nich může pomnožovat většina přítomných mikroorganizmů díky příznivému pH (5,0 až 5,5) i obsahu kyslíku. Podobné vlastnosti má i mladina, ačkoliv hořké látky mohou potlačovat některé mléčné bakterie nebo bakterie rodu *Bacillus*. V mladině se vyskytuje velké množství kvasinek i mladinových bakterií, převážně z čeledi Enterobacteriacae (např. *Klebsiella, Citrobacter, Escherichia*). Mikrobiální kontaminace ochuzuje mladinu o kyslík a růstové faktory a tím může účinně inhibovat růst kulturní kvasinek [23].

Po zakvašení kulturními kvasinkami rychle klesá obsah rozpuštěného kyslíku a hodnota pH, čímž se potlačuje rozvoj mladinových bakterií a preferují se mléčné bakterie. I spektrum aminokyselin se mění, také podle jejich specifického využívání kvasinkami. Současně

s poklesem rozpuštěného kyslíku se také mění spektrum cizích kvasinek od aerobních k fakultativně anaerobním druhům. Podobný trend se projevuje při dokvašování piva [24].

Stanovením mikrobiologické čistoty kvasnic se lze snadno informovat o sanitačním stavu pivovaru. V kvasnicích lze nalézt veškerou již zmíněnou kontaminaci mladiny.

Mikrobiologická čistota vody se řídí většinou místními předpisy pro kvalitu pitné vody. Voda, která je ve styku s pivem, se musí kontrolovat na množství *Escherichia Coli*, koliformní bakterie, enterokoky, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfrigens* a mikroorganismy kultivované při 22 a 36 °C.

# 2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ PIVA SE ZAMĚŘENÍM NA ANTIOXIDAČNÍ LÁTKY

## 2.1 Chemické složení piva

Po chemické stránce je pivo směsí různých sloučenin. Pivo obsahuje makromolekuly bílkovin, sacharidů, nukleových kyselin a dalších látek, mezi které patří především polyfenolické sloučeniny, hořké látky, vitaminy, minerální látky a alkohol. Chemické složení piva se mění v závislosti na kvalitě použitých surovin, na stupni prokvašení a podmínkách výrobního procesu. Energetická hodnota 10% piva se pohybuje okolo 1500 $kJ.l^{-1}$ a 12% piva okolo 1800 $kJ.l^{-1}$.

### 2.1.1 Voda

V pivě voda představuje 75 až 80 % hmotnosti podle druhu výrobku a podle koncentrace původní mladiny. Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti vody ovlivňují průběh přípravy, základní kvalitu i specifické vlastnosti piva. Voda na výrobu piva se používá jako jedna ze základních surovin. Svými vlastnostmi musí splňovat požadavky na pitnou vodu, především z hlediska zdravotní a hygienické nezávadnosti.

#### *2.1.1.1 Tvrdost vody*

Obsah rozpuštěných solí je důležité v praxi využívané kriterium pro posouzení vhodnosti vody k určitým technologickým aplikacím. Ve vodě tvoří zpravidla převažující podíl soli vápníku a hořčíku. Dříve se pro jejich obsah používal termín „tvrdost vody“, ten v praxi doposud často přežívá. To vyjadřovalo buď součet obsahu vápenatých, hořečnatých a barnatých iontů, někdy se taky údaj považoval za obsah všech kationtů s nábojovým číslem větším než 1.

Podle hodnoty „celkové tvrdosti“ se rozeznává:

- měkká voda – do 1,3 $mmol.l^{-1}$,

- středně tvrdá voda – 1,3 až 2,5 $mmol.l^{-1}$,

- tvrdá voda – 2,5 až 3,8 $mmol.l^{-1}$,

- velmi tvrdá voda – nad 3,8 $mmol.l^{-1}$.

***Karbonátová (přechodná) tvrdost vody***

Odpovídá obsahu hydrogenuhličitanů vápníku a hořčíku. Během chmelovaru se hydrogenuhličitany alkalických kovů mění odštěpením oxidu uhličitého na více či méně rozpustné uhličitany a to ovlivňuje vápenato-hořečnatou rovnováhu. Uhličitan hořečnatý je nestálý, při delším varu se rozkládá a mlže být z roztoku zcela vyloučen. Za varu probíhá reakce:

$$Ca(HCO_3)_2 \rightarrow CaCO_3\downarrow + H_2O + CO_2\uparrow$$

$$Mg(HCO_3)_2 \rightarrow MgCO_3\downarrow + H_2O + CO_2\uparrow$$

$$MgCO_3\downarrow + H_2O \rightarrow Mg(OH) + CO_2$$

***Nekarbonátová (trvalá) tvrdost vody***

Je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi kyselin sírové, chlorovodíkové, dusičné a jiných, které se varem nemění.

### 2.1.2 Sacharidy piva

Celkový obsah sacharidů v pivu se pohybuje okolo 28 $g.l^{-1}$ a představuje hlavní energetickou složku piva (až 60 %) a hlavní součást extraktu. Nejvýznamnější cukry jsou dextriny, neboť ty společně s alkoholem zvyšují disperzi piva v zažívacím traktu lidského organismu, což umožňuje rychlou látkovou výměnu. V menším množství jsou obsaženy některé monosacharidy a oligosacharidy. Nejvíce zastoupené jsou zkvasitelné cukry maltóza a maltotrióza a nezkvasitelné pentózy [4].

*Tab. 1. Sacharidy piva.*

| **Sacharidy piva** | **C[g.l$^{-1}$]** | **Sacharidy piva** | **C[g.l$^{-1}$]** |
|---|---|---|---|
| Glukóza | 0,1 – 0,5 | Isomaltotrióza | 0,4 – 1 |
| Fruktóza | 0,1 – 0,2 | Dextriny | 20 – 30 |
| Sacharóza | 0 – 0,1 | β-glukany | 150 – 400 |
| Maltóza | 1,5 - 5 | Pentózany | 0,2 – 0,5 |
| Maltotrióza | 1 - 3 | | |

### 2.1.3 Hořké chmelové látky

Pivo je nápoj, který obsahuje hořké chmelové látky (až 40 $mg.l^{-1}$), které zahrnují řadu velmi si podobných složitých organických sloučenin, které snadno podléhají oxidaci i dalším chemickým přeměnám. Nejúčinnější z nich je skupina α-hořkých kyselin, méně účinné jsou β-hořké kyseliny. Chmelové α-hořkých kyseliny jsou jen nepatrně rozpustné ve vodě,

a tedy i v pivu. Při chmelovaru z větší části izomerují za vzniku *cis*- a *trans-iso*-α-hořkých kyselin, které jsou již rozpustnější a vykazují silnou hořkost. Obdobná reakce přeměny β-hořkých kyselin probíhá jen v nepatrné míře a proto jejich příspěvek k hořkosti piv je mnohem menší. Piva vařená z chmelů a chmelových výrobků s vyšším obsahem β-hořkých kyselin vykazují obvykle jemnější a méně drsnou hořkost než piva obsahující pouze nebo převážně jen iso-α-hořké kyseliny. Piva vyrobená z chmelů s nízkým obsahem kohumulonu mají mírnější a příjemnější hořkost. Kromě vytváření senzorické hořkosti jsou hořké látky důležité i pro vznik a stabilitu pivní pěny [25].

### 2.1.4 Polyfenolické látky piva

Pivo obsahuje široké spektrum polyfenolů a fenolových kyselin (0,1 až 0,18 $g.l^{-1}$), které přecházejí do piva z ječmene, popř. sladu, chmele a chmelových výrobků a které ovlivňují senzorické vlastnosti jako je chuť, vůni, pěnivost, barvu, ale i celkovou trvanlivost piva. Bývají řazeny k přirozeným antioxidantům, z nichž se v pivech vyskytují fenolové kyseliny zahrnující *ortho*- i *para*- deriváty kyseliny benzoové (např. kyselina salicylová, kyselina gentisová, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina protokatechinová, kyselina gallová, kyselina vanilinová a kyselina swingová) a deriváty kyseliny skořicové (např. kyselina *p*-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina sinapová), dále lze v pivu nalézt kyselinu chlorgenovou a její deriváty, chinony i ubichinony a především různé flavonoidy, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů zahrnující v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání $C_6$-$C_3$-$C_6$ a jejichž struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu.

Podle stupně oxidace C3 řetězce se rozeznává 7 základních struktur flavonoidů: katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanoly, flavony, flavanoly, anthokyanidiny [26].

V průběhu pivovarské technologie dochází k řadě chemických přeměn polyfenolických složek pocházejících s původních surovin, především v průběhu chmelovaru, kvašení, filtrace, a stabilizace koloidních vlastností piva. Jedná se o reakce hydrolytické, isomerační, kondenzační až polymerační a oxidoredukční. Hydrolytické reakce vedou obvykle ke štěpění glykosidů na aglykony. Z izomeračních reakcí je typickou reakcí především přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol během chmelovaru. Kondenzační až polymerační reakce se uplatňují především ve smyslu tvorby výšemolekulárních látek s vysokou srážecí aktivitou s bílkovinami piva. Tím dochází k tvorbě polyxeno-bílkovinných komplexů, které za

určitých podmínek mohou vypadávat z roztoku a tím vytvářet koloidní zákaly. S oxidačně-redukčními procesy souvisí zejména problematika senzorické stability piva po naplnění do konzumních obalů, v nichž polyfenolické složky hrají důležitou roli. Právě polyfenoly a zejména flavonoidy jsou jako nejúčinnější přirozené antioxidanty piva tyto děje eliminují [26].

#### *2.1.4.1 Antioxidační účinky polyfenolů*

Antioxidační účinky polyfenolů jsou komplexní a lze je přiřadit několika mechanismům. Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidu, proteinkinasu C) i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účasní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem. Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Látky s nízkou hodnotou redoxpotenciálu jsou schopny redukovat některé volné radikály, např. superoxidové, peroxylové, alkoxylové a hydroxylové. Při reakcích poskytují vodík a samy se při tom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxylový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury [27].

### 2.1.5 Proteiny piva

Proteiny jsou látky, které mají vliv na kvalitu piva. Obsah v pivu je 3 až 5 $g.l^{-1}$ čistých bílkovin, z toho 84 % přechází ze do piva ze sladu a 15 % přechází z pivovarských kvasinek. Pivo obsahuje téměř všechny esenciální aminokyseliny. Obsah aminokyselin se pohybuje v mezích 300 – 500 $mg.l^{-1}$. Tyto látky významně ovlivňují možnost vzniku koloidních zákalů, formování a stabilitu pěny, a dále podporují plnost chuti piva.

Koloidní zákaly se obvykle dělí na chladové, které se z piva vylučují při jeho ochlazení na 0 °C, které se při zvýšení teploty opět rozpustí, a na trvalé zákaly, které jsou v podstatě druhou fází chladového zákalu, kdy přirozeným stárnutím dochází ke stálému zvětšování koloidních částic, které jsou již nerozpustné a které se z piva nevratně vyloučí. Mezi zákalotvorné proteiny patří především hordeiny vyznačující se vysokým obsahem glutaminu a prolinu.

### 2.1.6 Etanol

Nejvýraznější těkavou složkou piva je etanol. Jeho množství závisí od koncentrace původní mladiny a stupni prokvašení a podílí se na plnosti chuti piva. 10% pivo obsahuje asi 2,8 až 3,5 % hm. etanolu a 12% ležák asi 3,5 až 4,2 % hm. To je přibližně 35 až 42 $g.l^{-1}$.

Výzkumy navíc potvrzují, že rozumná konzumace alkoholu pro zdravou dospělou populaci je 20 až 40 g alkoholu za den, tj. 0,5 až 1 litr piva denně u mužů a 0,3 až 0,6 l piva denně u žen a pozitivně ovlivňuje fyzickou a duševní kondici člověka. Ve srovnání s abstinenty jsou ti, kteří dodržují tuto relativně bezpečnou dávku, méně náchylní např. na kardiovaskulární onemocnění, neboť u nich dochází ke zvýšení sériové koncentrace HDL cholesterolu, což vede k poklesu krevního tlaku v důsledku rozšíření cév [28].

### 2.1.7 Vitaminy a minerální látky

Předností piva oproti např. vínům a jiným alkoholickým nápojům je, že svým příznivým a vyváženým obsahem vitaminů může pokrýt značnou část doporučené denní dávky. Pivo je jediným nápojem, který obsahuje významná množství vitaminů.

*Tab. 2. Nejvýznamnější vitaminy piva.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Thiamin [$\mu g.l^{-1}$] | 3-80 | Riboflavin [$mg.l^{-1}$] | 0,02-1,0 |
| Kys. pantotenová [$mg.l^{-1}$] | 0,05-2 | Nikotinamid [$mg.l^{-1}$] | 3-14 |
| Pyridoxin [$mg.l^{-1}$] | 0,1-1,5 | Kys. folová [$\mu g.l^{-1}$] | 100 |
| Biotin [$\mu g.l^{-1}$] | 2-15 | Kys. askorbová [$mg.l^{-1}$] *) | 10 - 50 |

*) Platí pouze pro piva s přídavkem kyseliny askorbové

Nezanedbatelný je i obsah některých minerálních látek a stopových prvků, které pocházejí většinou ze sladu. Pivo obsahuje 0,8 až 2,4 $g.l^{-1}$. minerálních látek.

Někteří autoři rozdělují chemické složení piva na látky těkavé a netěkavé [4].

### 2.1.8 Oxid uhličitý

Oxid uhličitý je přirozeným produktem kvašení a v pivu je obsažen v množství 0,35 až 0,55 % hm. To odpovídá přibližně 3,5 až 5,5 $g.l^{-1}$ v pivu. Způsobuje říz piva. Říz piva patří

k jeho významným a velmi obtížně definovatelným vlastnostem, neboť je výsledkem působení různých technologických, surovinových a zpracovatelských faktorů.

Z 1 hl mladiny vzniká během hlavního kvašení 3,5 až 3,8 kg $CO^2$.

Sycení piva oxidem uhličitým je závislé na hradícím tlaku a teplotě. Čím je teplota nižší a tlak vyšší, tím je v pivu větší sycení i fixace oxidu uhličitého. Při tradičním kvašení obsahuje zelené pivo přibližně 1 až 2 % zkvasitelného extraktu, který se mění na alkohol a oxid uhličitý. Během prvních 14 dnů dokvašování se pivo nasytí oxidem uhličitým. Fixace oxidu uhličitého se vysvětluje jeho rozpouštěním a disociací vzniklé kyseliny uhličité. Čím je pH piva nižší, tím je fixace lepší [2].

## 2.2 Chemické složení sladu

Chemické složení sladu ovlivňuje průběh výroby piva, ale především jeho základní i specifické chemické, biochemické a organoleptické vlastnosti. Sleduje se řada chemických a biochemických kvalitativních znaků sladů, které se stanovují v kongresní sladině.

### 2.2.1 Vlhkost

Vlhkost sladu po uhvozdění je u světlých sladů asi 3,5 % a u tmavých sladů asi 2 %. V odležených sladech se vlhkost mírně zvyšuje, což je příznivé pro mletí (vyšší elastičnost pluch). Vyšší vlhkost zpracovávaného sladu může způsobovat snížení extraktivnosti, potíže při skladování, problémy při kvašení apod. Vlhkost sladu proto nemá přesáhnout 6 % [2].

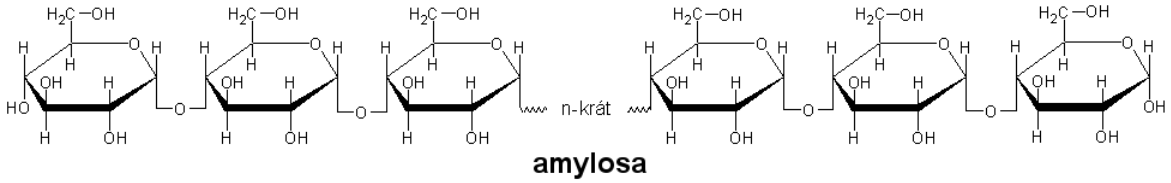
### 2.2.2 Škrob

Škrob v endospermu sladu se nachází ve škrobových zrnech, jejichž stěny se skládají z neškrobových polysacharidů a proteinů. V optimálně cytolyticky rozluštěných sladech jsou stěny škrobových zrn dokonale degradované, toho se docílilo v průběhu sladování. Tím je škrob lépe přístupný působení amylolytickým enzymům. U hůře rozluštěných sladů jsou především obalové části škrobových zrn blíže špici sladového zrna nedostatečně rozrušené a škrob v nich obsažený je hůře degradovaný amylolytickými enzymy ve varním procesu.

Škrobová zrna tvoří až z 98 % čistý škrob, zbytek připadá na proteiny, lipidy, obalové části škrobových zrn a minerální látky, především fosforečnany, vápník a hořčík. Ve sladu se vyskytují velká a malá škrobová zrna. Velká škrobová zrna o rozměru 25 až 30 μm tvoří

asi 10 % celkového počtu zrn, ale 90 % hmotnosti škrobu. Protože obsahují méně doprovodných látek (asi 0,13 %) než zrna malá (asi 0,16 %), jsou lépe degradovatelná ve varním procesu. Malá škrobová zrna o velikosti 1 až 5 μm se početně podílejí na škrobu sladového srna asi z 90 %, ale hmotnostně pouze z 10 %. Jsou hůře degradovatelná a jejich štěpení omezuje i tvorba komplexů škrobu především s lipidy. Zvláště komplexy amylózy s lipidy jsou mnohem hůře štěpitelné než volná amylóza [29].

Škrobová zrna se skládají z vrstvených sférokrystalů. Lineární amylózové a větvené amylopektinové řetězce jsou vzájemně propletené, vytváření svazky nebo mycely vázané vodíkovými vazbami, mohou se roztáhnout přes více micel, a tím drží škrobová zrna pohromadě. Amylóza tvoří řetězce glukózových jednotek vázaných vazbami α-1,4, základní složkou je disacharid maltóza. Tyto řetězce vytvářejí šroubovice obsahující šest glukózových jednotek. Relativní molekulová hmotnost při 60 až 2 000 glukózových zbytcích se pohybuje mezi 10 000 až 500 000. Ve vodě tvoří škrobový sol, který delším stáním za teploty 50 až 60°C tvoří gel a ten retrograduje opět v zákal. Barví se jodovým roztokem modře. Ve velkých škrobových zrnech připadá na celkové množství škrobu asi 17 až 24 % amylózy, u malých zrn je to asi 40 %.



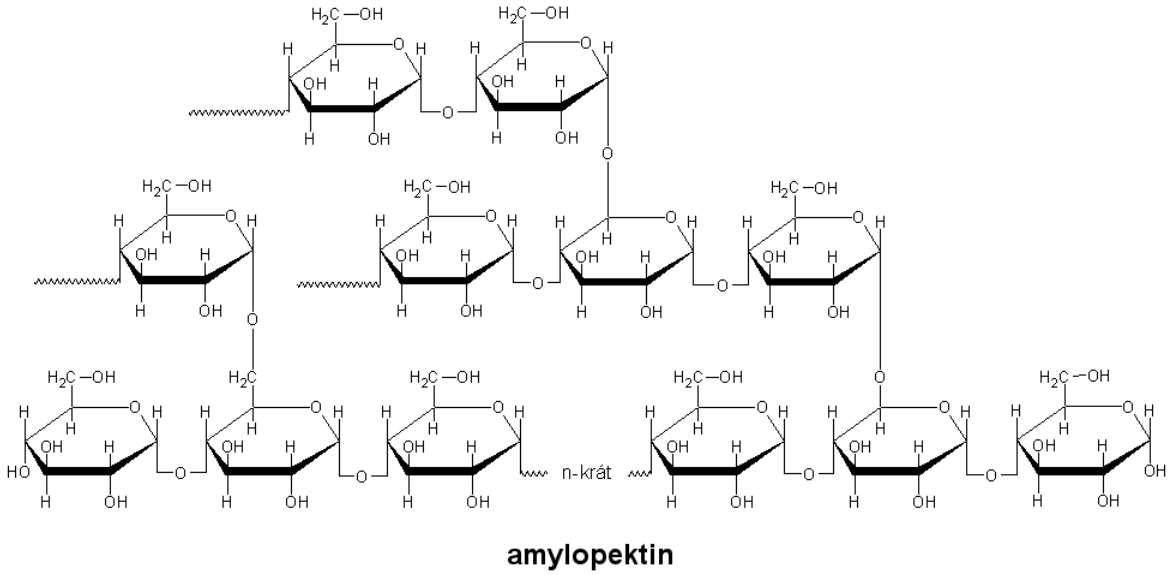

*Obr. 1. Struktura Amylózy.*

Amylopektin se skládá z glukózových jednotek vázaných vazbami α-1,4 (4 až 5 %) a α-1,6, větvení je po každých 7 až 8 glukózových jednotkách, vnější větvení je po 13 až 15 glukózových jednotkách. Základními disacharidy jsou tedy maltóza a isomaltóza. Rozlišují se řetězce A, které jsou větvené jen na redukujícím konci, a řetězce B, které mohou mít více míst větvení. Toto uspořádání a obsah fosfátů způsobuje schopnost mazovatění amylopektinu. Relativní molekulová hmotnost amylopektinu obsahujícího 1 až 6 milionů glukózových jednotek je mezi 6 000 až 40 000, jodovým roztokem se barví fialově až čistě červeně.

*Tab. 3. - Běžné hodnoty světlého sladu plzeňského typu a tmavého sladu mnichovského typu* [13].

| Rozbor | Světlý slad plzeňský | Tmavý slad mnichovský |
|---|---|---|
| **Mechanický rozbor** | | |
| Objemová hmotnost (kg) | 55-58 | 52-55 |
| Hmotnost 1000 zrn v původním sladu (g) | 32-55 | 28-32 |
| hustota | 1,10-1,18 | - |
| Moučnatost (%) | 90-96 | - |
| Vývin střelky ¾ až 1 (%) | 70-75 | 75-85 |
| **Fyzikálně-chemické znaky** | | |
| Obsah vody (%) | 3,8-4,5 | 1,0-4,5 |
| Extrakt v sušině (%) | 79-83 | 76-78 |
| pH | 5,6-6,0 | 5,65-5,75 |
| Rozdíl extraktu v jemném a hrubém mletí (%) | 1,5-2,3 | - |
| Doba zcukření (min) | 10-15 | 20-30 |
| Barva kongresní sladiny (j. EBC) | 3,0-4,2 | 9,5-16 |
| Barva po povaření (j. EBC) | 5-6 | - |
| Relativní extrakt při 45°C (%) | 35-37 | - |
| Diastatická mohutnost (j. W.K.) | 220-280 | 50-150 |
| Celkový obsah bílkovin (%) | 9,5-11,5 | 9,4-12,6 |
| Kolbachovo číslo (%) | 36-41 | 29-48 |
| Formolový dusík (mg na 100g sušiny) | 160-200 | - |
| α-aminodusík (mg na 100g sušiny) | 120-150 | - |
| β-glukany (% v sušině) | 0,5-1,0 | - |
| Zdánlivý stupeň prokvašení (%) | 75-78 | - |
| Viskozita kongresní sladiny (mPa s) | 1,5-1,6 | - |
| α-amyláza (D.U. EBC) | 40-70 | - |
| β-amyláza (mm-imunochem Laurell) | 46 | - |
| β-glukanáza (R.S.V.) | > 800 | - |
| Homogenita (%) | > 70 | - |
| Obsah nitrosaminů ($\mu g.kg^{-1}$) | < 2,5 | - |

Výsledek barevné reakce škrobu s jodovým roztokem závisí na délce řetězců molekul. Reakce je ovlivněna spirálovou strukturou amylopektinu, probíhá jen za tepla a její rozsah snižují bílkoviny, alkálie, polyfenoly a jiné látky [30].




*Obr. 2. Struktura amylopektinu.*

### 2.2.3 Dusíkaté látky sladu

Dusíkaté látky představují ve výrobě piva velice rozmanitý komplex sloučenin, od nerozpustných vysokomolekulárních složek až po jednoduché aminokyseliny. Tyto sloučeniny mají ve výrobě piva pozitivní i negativní význam v závislosti na svých fyzikálně chemických vlastnostech. Přispívají k plnosti chuti piva, mají význam pro pěnivost a stabilitu pěny, podílejí se na tvorbě barvy, působí jako tlumivé složky piva. Nízkomolekulární sloučeniny jsou nezbytné pro množení a metabolismus kvasinek, ale jsou i prekurzory v tvorbě komponent typu aldehydů odpovědných za nežádoucí starou chuť piva. Vysokomolekulární dusíkaté látky jsou vedle polyfenolů základní složkou v mechanismu tvorby některých látek, které negativně ovlivňují senzorické vlastnosti piva, např. aldehydy jsou nositeli staré chuti piva. Vysokomolekulární dusíkaté látky jsou vedle polyfenolů základní složkou, která se podílí na tvorbě nebiologických zákalů. Ve 100 g sušiny sladu je přítomno přibližně 3,5 g rozpustných proteinů [31], z nichž 2,1 g (60 %) je ve sladu a 1,4 g (40 %) se uvolní do roztoku během rmutování. Teploty rmutování značně ovlivňují obsah koagulovatelných dusíkatých látek ve rmutu.

Podle starší nomenklatury se proteiny ve sladu dělily do čtyř základních skupin, na albuminy, globuliny, prolaminy a gluteniny, dále pak se rozlišovaly různé složené proteiny. V odborné literatuře je uváděno velmi rozdílné zastoupení jednotlivých skupin proteinů

v sušině ječmene v závislosti na celkovém obsahu bílkovin v ječmeni. Albuminy 12,1 %, globuliny 8,4 %, prolaminy 25 % a gluteniny 54,5 % [32].

### 2.2.4 Neškrobové polysacharidy sladu

Ječné zrno obsahuje 10 až 14 % neškrobových polysacharidů. Celulosy, hemicelulosy, ligniny a další polysacharidy (glykany, často řazené mezi tzv. rostlinné gumy). Zvýšené hladiny neškrobových polysacharidů ve sladu, a to nejen typu β-glukanů, ale podle současných poznatků i méně zastoupených pentozanů (arabinoxylanů), ovlivňují viskozitu sladiny i piva a mohou způsobovat závažné problémy při scezování sladiny i filtraci piva [33].

***Celulóza***

Obsah celulózy v ječném zrnu je 4 až 7 %. Je obsažena především v pluchách, ve stopách v klíčku, oplodí a osemení. Tvoří zpevňující složku buněčných stěn. Skládá se z glukózových jednotek vázaných glykosidovými vazbami β-1,4. Hlavní stavební jednotkou je disacharid cellobióza. Celulóza je ve vodě nerozpustná a je i enzymově obtížně štěpitelná. Nezúčastňuje se metabolismu ječného zrna během klíčení, ani v procesu sladování a rmutování se nemění.

***Hemicelulózy a gumovité látky***

Jsou to především neškrobové a necelulózové polysacharidy typu β-glukanů a arabinoxylanů (pentozanů). Ve vodě nerozpustné hemicelulózy a jejich rozpustné štěpné produkty (gumové látky) představují v průměru 10 % hmotnosti ječného zrna. Jen asi pětinu z toho tvoří ve vodě rozpustné gumovité látky. Zbytek jsou vysoce viskózní sloučeniny s relativní molekulovou hmotností okolo 2 000 000, které musí být degradovány při sladování a rmutování. Rozpustné gumovité látky tvoří především nižší β-glukany, které v závislosti na své molekulové hmotnosti nepříznivě zvyšují viskozitu sladiny, mladiny a piva a naopak pozitivně ovlivňují jeho pěnivost a chuťové vlastnosti.

***Hemicelulózy***

Hlavně β-glukany, jsou heteroglukany buněčných stěn rostlin, které zpevňují a vyplňují prostor mezi celulózovými vlákny. V buněčných stěnách endospermu ječného zrna tvoří asi 75 % hmoty, v aleuronové vrstvě asi 25 %. Hemicelulózy obsažené v pluchách jsou tvořený převážně z pentozanů [13].

***Pentózany (arabinoxylany)***

Tvoří spolu s β-glukany hlavní podíl neškrobových polysacharidů ječného či sladového zrna. Skládají se z hlavních řetězců tvořených D-xylanopyrynózovými jednotkami vázanými vazbami β-1,4. Průměrně je zastoupeno v pentózanech 52 až 60 % xylózy, 36 až 46 % glukózy [34].

Obsah arabinoxylanů v obilce ječmene je velmi variabilní, v průměru 4 až 10 %, jejich množství ve sladu ovlivňuje technologie sladování. Nacházejí se v aleuronové vrstvě, ale především ve stěnách škrobových zrn endospermu, kde tvoří podíl asi 20 %. Mají vysokou schopnost vázat vodu, a to až 100 g na 1 g sušiny. V závislosti na větvení stoupá jejich rozpustnost ve vodě, kde tvoří velmi viskózní disperze. Jejich vlastnosti jsou v tomto směru ovlivněny strukturou a molekulovou hmotností [34].

Pentózy se mohou vyskytovat v zrnu též jako vázané na glukany ve formě xyloglukanů. Základ molekuly tvoří β-D-(1→4)glukan (celulóza) s D-xylopyranózovými jednotkami vázanými na glukózu α-(1→4)-glykosidovými vazbami [34].

***β-glukany***

Jsou to řetězce glukopyranózových jednotek vázaných asi z 30 % glykosidovými vazbami β-(1→3) a se 70 % vazbami β-(1→4), které dávají molekule pružný charakter se schopností kontrakce nebo protažení. Obsah β-glukanů v ječmeni se pohybuje okolo 5 až 6 %, ve sladu okolo 1 % a během výroby piva jejich obsah dále klesá. Na β-glukanové řetězce se v malém množství vážou arabinoxylanové nebo xylosové zbytky. β-glukany se liší molekulovou hmotností a vyskytují se v rozpustné a v nerozpustné formě. Při teplotě 40 °C se extrahuje asi 20 % β-glukanů obilného zrna, při 60 °C asi 30 až 70 %. Ve vodném prostředí se vytvářejí zesítěné agregáty gelu stabilizovaného vodíkovými vazbami volných hydroxylových skupin pyranózylových zbytků. Během výrobního procesu klesá rozpustnost β-glukanů zřejmě i jejich vzájemnými interakcemi s bílkovinami [35].

Během sladování a dále při rmutování musí být nejdříve rozštěpeny esterové vazby hydroxylových skupin β-glukanů s karboxylovými skupinami proteinů, aby uvolněné β-glukany byly dále enzymově degradovány na nížemolekulární a méně viskózní složky. Velké množství nízkomolekulárních β-glukanových dextrinů ovlivňuje viskozitu i chuť piva a stabilitu jeho pěny.

### 2.2.5 Lipidy sladu

Mezi významné lipidy patří zejména mastné kyseliny, acylglyceroly, fosfolipidy, lipoproteiny a lipopolysacharidy, z doprovodných látek lipidů jsou důležité stroly. Lipidy tvoří heterogenní skupinu látek s hydrofobními vlastnostmi. Největší význam pro kvalitu piva mají mastné kyseliny. Celkový obsah lipidů v ječmeni a sladu se příliš neliší a může být až 4,5 % v sušině. Největší podíl mastných kyselin v lipidech ječmene (50 až 60 %) tvoří kyselina linolová. Lipidy obsažené v mladině a pivu pocházejí ze sladu, chmelové lipidy nemají podstatný vliv na kvalitu piva [36].

### 2.2.6 Polyfenolické sloučeniny sladu

Polyfenoly ve sladu jsou skupinou látek různé molekulové hmotnosti a rozdílných fyzikálně-chemických vlastností. V ječmeni a sladu se vyskytují především v obalové části zrn a v aleuronové vrstvě, kde jsou přítomny hlavně flavonoidní látky, jejichž nosičem je bílkovina hornin [4]. Polyfenoly sladu a piva lze rozdělit na tyto skupiny (hlavní skupiny tvoří fenolové kyseliny a flavonoidy):

- ***jednoduché fenoly***

- ***fenolové kyseliny***

Významné jsou deriváty kyselin 4-hydroxybenzoové, skořicové a zejména chlorogenové.

- ***barevné flavonoidy***

Jako jsou monoglykosidy a diglykosidy antokyanů (známých také jako anthokyaniny) a jejich aglykonů anthokyanidinů (např. kyanidin).

- ***bezbarvé flavonoidy***

Jako jsou katechiny (flavan-3-oly) a leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly).

- ***kondenzované a další polymerní polyfenoly***

Ty jsou odvozené od monomerních flavanoidů.

- ***kumariny***

- ***chinony***

Jsou to např. ubichinony.

Zastaralé jsou názvy anthokyanogeny, anthoxanthiny a další, např. flavolany, flavilany či flavilogeny. Termín anthokyanogeny se však doposud často používá v pivovarské literatuře podobně jako název proanthokyanidiny. Za anthokyanogeny se považovaly bezbarvé katechiny spolu s leukoanthokyanidiny, které se při zahřívání s kyselinami štěpí na příslušné barevné anthokyanidiny a bezbarvé katechiny. Katechiny mohou oxidací poskytovat leukoanthokyanidiny. Název leukoanthokyanidiny je v platném názvosloví vyhrazen pouze pro monomerní flavan-3,4-dioly. Název proanthokyanidiny zahrnuje bezbarvé katechiny a jejich oligomery, dnes řazené mezi kondenzované taniny – tyto látky způsobují trpkou svíravou chuť.

Polyfenoly mají v technologii a kvalitě piva pozitivní i negativní význam. Nezoxidované poyfenoly svými přirozenými antioxidačními vlastnostmi oddalují stárnutí chuti piva a tvorbu nebiologických zákalů, antioxidační vlastnosti mají i volné fenolové kyseliny extrahované ze zeleného sladu. Antioxidační vlastnosti polyfenolů však velmi závisejí na prostředí a nejsou tak významné jako antioxidační vlastnosti oxidu siřičitého produkovaného pivovarskými kvasinkami při kvašení. Tvorba oxidu siřičitého při pivovarském kvašení rovněž závisí na mnoha technologických faktorech, ale především na genetických vlastnostech použitého kmene kvasinek [37]. Pokud se nedocílí dostatečná hladina oxidu siřičitého jako přirozeného antioxidantu piva, je přítomnost polyfenolů s redukčním účinkem velmi žádoucí. Při urychleném stárnutí piva sice nebyla zjištěna souvislost mezi obsahem fenolických látek a senzorickými vlastnostmi piva, ale obecně se uvádí, že vyšší počet hydroxylových skupin a nižší stupeň kondenzace u jejich oligomerů má kladný vliv na oxidačně-redukční vlastnosti meziproduktů i stočeného piva. Sladové polyfenoly přicházejí do procesu dříve než chmelové a podléhají více oxidačním změnám [37].

K dalším pozitivním vlastnostem připisovaným polyfenolickým látkám patří schopnost asociovat s polypeptidy a vylučovat kaly během chlazení mladiny. Kromě toho polyfenoly přispívají k plnosti chuti piva.

Při rozpouštění extraktu na počátku varního procesu se uvolňují se sladového šrotu polyfenolické sloučeniny, které přešly do rozpustné formy již při sladování. Další polyfenoly, které zůstaly ve vázané formě, nejsou však schopné se při rmutování uvolňovat. Do rozpustné formy lze sladové polyfenoly převést ve varním procesu pomocí přídavných enzymů, např. papainu, které naruší jejich vazbu na polypeptidy [38]. Sladové polyfenoly jsou podstatně méně rozpustné než chmelové, přesto hlavní podíl polyfenolických sloučenin v pivu pochází ze sladu.

*Tab. 4 Obsah polyfenolů ve frakcích sladového šrotu.*

| **Vlastnost** | **Endosperm mouka** | **Aleuron mouka** | **Pluchy** | **Slad** |
|---|---|---|---|---|
| Podíl frakce (%) | 75,6 | 15,8 | 8,6 | 100,0 |
| Obsah polyfenolů ($mg.l^{-1}$) | 46,0 | 58,0 | 30,4 | 76,2 |
| Obsah flavonoidů ($mg.l^{-1}$) | 14,8 | 11,8 | 8,6 | 23,6 |
| Index polymerace *) | 3,11 | 4,92 | 11,96 | 3,23 |

*) Index polymerace je poměr obsahu celkových polyfenolů o obsahu flavonoidů stanovených metodou popsanou v pivovarských analytikách [39].

Rozpustnost polyfenolů je dána poměrem polárních a nepolárních skupin v jejich molekule. Rozpustnost fenolových kyselin stoupá s jejich vzrůstající disociační konstantou a hodnotou pH prostředí. Rozpustnost flavonoidních látek stoupá s počtem hydroxylových skupin v molekule, s rostoucím počtem methoxylových skupin naopak klesá. Glykosidy jsou podstatně rozpustnější než aglykony [2].

Bylo prokázáno, že piva vyrobená ze sladů z nově vyšlechtěných odrůd ječmene s nízkým obsahem flavonoidů mohou mít nižší senzorickou stabilitu v porovnání s pivy vyrobenými ze sladů z běžných odrůd ječmene.

## 2.3 Chemické složení chmele

Chmel obsahuje technologicky důležité sloučeniny, balastní látky, ale i nežádoucí složky.

*Tab. 5. Průměrné složení chmele.*

| **Látka** | **Obsah [%]** |
|---|---|
| voda | 8 – 12 |
| Celkové pryskyřice | 15 – 20 |
| Polyfenolické látky | 2 – 6 |
| Silice | 0,2 - 2,5 |
| Vosky a lipidy | 1 – 3 |
| Dusíkaté látky | 12 – 15 |
| Sacharidické látka (celulóza) | 40 – 50 |
| Minerální látky | 6 - 8 |

Technologicky významnými složkami chmele ovlivňující průběh výroby i kvalitu piva jsou polyfenoly, silice a chmelové pryskyřice. Chemické složení chmele je závislé na odrůdě, ročníku a způsobu posklizňové úpravy. V tabulce (Tab. 5.) je shrnuto obvyklé průměrné složení chmele.

### 2.3.1 Obsah vody v chmelu

Obsah vody ovlivňuje vlastnosti chmele během skladování. Příliš suché chmele s vlhkostí po 10 % se drolí a dochází ke ztrátám technologicky významných, především hořkých látek. Naopak chmele s obsahem vody nad 12 % jsou snadno napadány mikroorganismy a podléhají více oxidačním a polymeračním změnám. Proto obsah vody v chmelových hlávkách po usušení by se měl pohybovat v rozmezí 10 až 12 %.

### 2.3.2 Chmelové pryskyřice

V chmelu je jich obsaženo až 30 % hmotnosti. Chmelové pryskyřice jsou deriváty floroglucinonu. Po izomerii ve varním procesu jsou odpovědné nejen za intenzitu hořkosti piva, ale i na charakteru hořkosti.

Základními složkami chmelových pryskyřic jsou měkké chmelové pryskyřice, kam patří specifické α-hořké kyseliny a β-hořké kyseliny, dále pak nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice. Chemicky se jedná o složité organické sloučeniny, které snadno podléhají oxidaci a dalším chemickým přeměnám. Zejména α-hořké kyseliny snadno oxidují a mění se na nespecifické měkké pryskyřice až tvrdé pryskyřice, které mají podstatně nižší pivovarskou hodnotu. Proto se musí chmel skladovat v chladu a temnu za omezeného přístupu kyslíku [4].

#### *α-Hořké kyseliny*

α-Hořké kyseliny jsou tvořeny směsí sedmi dosud známých analogů humulonu (Tab. 6.): humulonu, kohumulonu, adhumulonu, prehumulonu, posthumulonu. Další dva nebyly doposud v publikacích pojmenovány.

*Tab. 6. Obsah analogů v α-hořké kyselině*

| **Název** | **%** |
|---|---|
| Humulon | 35 – 70 |
| Kohumulon | 20 – 55 |
| Adhumulon | 10 – 15 |
| Prehumulon | 1 – 10 |
| Posthumulon | 1 – 5 |

α-Hořké kyseliny jsou slabé kyseliny, které velmi obtížně disociují a jsou proto ve vodě a vodných roztocích obtížně rozpustitelné v závislosti na pH roztoku. Při varu mladiny pH 5,9 je rozpustnost 480 $mg.l^{-1}$, při pH 4,8 až 5,0 již jen 84 $mg.l^{-1}$. Jejich vylučování z roztoku je výrazné při kvašení, kdy se pH snižuje pod hodnotu 4,8.

Iso-α-hořké kyseliny vznikají při varu sladiny s chmelem či chmelovými přípravky. Jsou nejdůležitějšími produkty reakcí chmelových pryskyřic zajišťujícími asi 85 % hořkosti piva.

Čisté Iso-α-hořké kyseliny dávkované do piva dávají výrobky s jiným charakterem hořkosti než chmel či chmelové přípravky, což potvrdilo předpoklad, že typickou hořkost piva ovlivňují i transformační produkty těchto látek [2].

Při izomeriaci vzniká z každého analogu α-hořkých kyselin *cis*- a *trans*-stereoizomer iso-α-hořkých kyselin. Tyto stereoizomery mají odlišné fyzikální a pivovarské vlastnosti.

### *β-Hořké kyseliny*

β-Hořké kyseliny se vyskytují v chmelu v množství okolo 3 až 5 %. Jsou přirozenou směsí pěti a více analogů (obr. 7.) nazývaných lupulon, kolupulon, adlupulon, prelupulon a poslupulon.

*Tab. 7. Obsah analogů v β-hořké kyselině*

| **Název** | **%** |
|---|---|
| Lupulon | 30 – 55 |
| Kolupulon | 20 – 55 |
| Adlupulon | 5 – 10 |
| Prelupulon | 1 – 3 |
| Postlupulon | Není známo |

β-Hořké kyseliny se velmi špatně rozpouští ve vodných roztocích, ve vroucí mladině při pH 5,6 se rozpouští pouze 9 $mg.l^{-1}$. β-Hořké kyseliny mají slabou esterovou vůni a nahořklou chuť. Jsou ještě méně stálé než α-hořké kyseliny, podléhají snadno oxidativní izomeraci a hlavně odštěpování postranních řetězců.

Transformační produkty β-hořkých kyselin vykazují určitou hořkost a vyšší rozpustnost než samotné β-hořké kyseliny. Jejich podíl na hořkosti piva je však v porovnání s izomeračními produkty α-hořkých kyselin výrazně nižší, i když u určitých odrůd chmele s jejich vyšším obsahem mohou nejen doplňovat intenzitu, ale pozitivně ovlivňovat i charakter hořkosti.

Hulupony jsou nejdůležitější produkty přeměny β-hořkých kyselin. Dosahují 50 až 75 % hořkosti iso-α-hořkých kyselin. Jsou mírně a příjemně hořké.

***Tvrdé pryskyřice***

Tvrdé pryskyřice jsou látky nerozpustné při extrakci hexanem. Rozlišují se oxidační produkty odvozené od α-hořkých kyselin, kam patří např. mírně hořké δ-pryskyřice, nehořká hulupinová kyselina nebo nepatrně hořký abeo-isohumulon, kterému se připisuje příznivé působení v pěnivosti piva, a ε-pryskyřice, které se odvozují od β-kyselin a jsou ve vodě nerozpustné [2].

### 2.3.3 Chmelové silice

Chmel obsahuje 0,5 až 3,0 % hm. silic. Je to směs několika set látek různého chemického složení, fyzikálních vlastností i aroma, které doposud nebyly zcela identifikovány a jejichž celkové množství a zastoupení jejich jednotlivých složek závisí především na genetických vlastnostech odrůdy, dále na podmínkách pěstování, sklizně a skladování.

Chmelové silice se dají rozdělit do tří základních skupin:

- uhlovodíková frakce,
- kyslíkatá frakce (oxidovaná frakce),
- frakce sirných sloučenin.

***Uhlovodíková frakce chmelových silic***

Její podíl je v čerstvém chmelu 70 až 80 %. Obsahuje alifatické uhlovodíky (pentan, oktan, isopren, undekan až heptadekan a některé větvené izomery), dále monoterpeny jako myrcen, α- a β-pinen, β-ocimen, limonen a seskviterpeny, kam se řadí β-farnesen, α-humulen, β-karyofylen, α- a β-selinen, γ- a δ- kadinen, γ-muurolen a řada dalších acyklických, mono-, di- a bicyklických seskviterpenů, které bývají zastoupeny jen v nepatrném množství.

***Kyslíkatá (oxidovaná) frakce chmelových silic***

Ta vzniká během zrání, zpracování a skladování chmele a tvoří asi 30 % celkových silic. Je složitou směsí terpenových, seskviterpenových, alifatických a aromatických alkoholů, různých aldehydů, ketonů, epoxidů, kyselin a esterů. Vzhledem k vyšší rozpustnosti této frakce může být jejich zastoupení v pivu výrazné a ovlivňuje charakter jeho aroma.

Nejintenzivnější aroma vykazují estery, kterých bylo identifikováno v chmelových silicích velké množství. Byly prokázány např. methylestery C6-C13 s přímými řetězci, s větvenými řetězci, odvozené od nasycených i nenasycených alifatických kyselin i estery terpenových alkoholů geraniolu, nerolu a linaloolu [40].

***Frakce sirných sloučenin***

Je obsažena v chmelových silicích v malém množství, okolo 0,1 %, sirné sloučeniny se ale negativně projevují jako chuťové a vonné látky již v nízkých koncentracích. Zvýšený obsah sirných sloučenin mají především chmele ošetřené během vegetace sirnými preparáty proti houbovým chorobám a chmele konzervované sířením v posklizňových úpravách.

Jednoduché sirné sloučeniny a sirné sloučeniny chmelových silic typu terpenových sulfidů, polysulfidů a thioesterů mohou nepříznivě ovlivnit vůni a chuť piva [41].

### 2.3.4 Polyfenolické látky chmele

Polyfenolické látky chmele mají stejně jako sladové polyfenoly pozitivní i negativní význam v technologii a v kvalitě piva, mohou působit např. jako antioxidanty nebo prooxidanty. Polyfenoly mají redukční schopnosti, kterými chrání chmelové pryskyřice před oxidací. Díky své reaktivitě podporují tvorbu lomu při chmelovaru, ale hlavně čiření piva vylučováním kalů reakcemi s dusíkatými látkami v průběhu chlazení mladiny a kvašení, a to intenzivněji než sladové polyfenoly.

Pozitivní vlastnosti ztrácejí sladové a chmelové polyfenolické sloučeniny oxidačními a kondenzačními reakcemi, kdy se vzniklé látky podílejí na tvorbě nebiologických zákalů, tmavší barvě, drsné chuti a tvorbě sloučenin odpovědných za starou chuť piva.

Chmelové polyfenoly jsou v mladině a pivu obsaženy v menším množství než sladové, mají polární charakter, jsou ve vodě snáze rozpustné a podílejí se z 20 až 30 % na celkovém obsahu polyfenolů piva v závislosti na dávce chmele [2].

***Flavonoly a glykosidy flavonolů***

Flavonoly patří mezi rostlinná barviva a mají antioxidační účinky. Ve chmelu jsou přítomné jak jejich aglykony, tak jejich glykosidy, ve kterých je nejčastěji cukernou složkou D-glukóza a L-rhamnóza. K hlavním flavonolům chmele patří kemferol, kvercetin a myricetin. V chmelu se vyskytují i méně běžné flavonoly, např. morin, který v poloze C-5 nemá hydroxylovou skupinu.

***Katechiny***

Bezbarvé katechiny (flavan-3-oly) a leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-oly) tvoří převážnou část chmelových polyfenolů. Významnými katechiny jsou (+)-katechin, (-)-epikatechin a (+)-gallokatechin. Z leukoanthokyanidinů jsou významné leukopelargonidin, leukokyanidinin a leukodelfinidin, z nichž mohou v kyselém prostředí vznikat odpovídající barevné anthokyanidiny, tzn. Pelargonidin, kyanidin a delfinidin.

***Fenolové kyseliny a jejich deriváty***

V chmelu se nachází velké množství aromatických hydroxy- a methoxysubstituovaných fenolových kyselin odvozené převážně od kyselin 4-hydroxybenzoové a kávové (3,4-dihydroxyskořicové). Významnou skupinou jsou chlorgenové kyseliny: 3-*O*-kaffeoyl-L-chinová (chlorgenová), 4-*O*-kaffeoyl-L-chinová (kryptochlorgenová), 5-*O*-kaffeoyl-L-chinová (neochlorgenová), 3,5-di-*O*-kaffeoyl-L-chinová (isochlorgenová a), 3,4-di-*O*-kaffeoyl-L-chinová (isochlorgenová b) a 4,5-di-*O*-kaffeoyl-L-chinová (isochlorgenová c). Jsou to estery (depsidy) kávové kyseliny s chinovou kyselinou, snadno kondenzují na různé oligomery až polymery a oxidují na chinony, které jsou zapojeny do reakcí hnědnutí mladiny a piva.

***Kumariny***

Kumariny se vyskytují v menší míře jako volné aglykony nebo glykosidy, u kterých cukernou složku tvoří převážně D-glukóza. Mají antibakteriální, antifungicidní a další biologické účinky [34].

### 2.3.5 Sacharidy chmele

Sušený chmel obsahuje 2 až 4 % monosacharidů, nepatrné množství di-, tri- a oligosacharidů a asi 1 až 2 % pektinových látek. Tyto cukry nemají ve výrobě piva technologický význam.

### 2.3.6 Dusíkaté látky chmele

Množství dusíkatých látek ve chmelu závisí na odrůdě, podmínkách vegetace a sklizně. Pohybuje se okolo 12 až 22 %, respektive 12 až 18 % v sušině. Tvoří je směs vysoko-, středně- a nízkomolekulárních látek. Jejich technologický význam není průkazný, protože např. při dávce 200 $g.hl^{-1}$ připadá v mladině 20 $mg.l^{-1}$ proteinů na dávkované chmelení [2].

### 2.3.7 Lipidy chmele

Lipidy se v usušeném chmelu vyskytují v nízkých koncentracích, asi 3 %. Jsou to různé alkoholy, estery, kyseliny a steroidní látky, které nemají zásadní vliv na technologii a kvalitu piva.

### 2.3.8 Minerální látky chmele

Minerální látky jsou v suchém chmelu obsaženy běžně v množství 7 až 10 %. Kovy jako měď, mangan a zinek při vyšších koncentracích v chmelu mohou ovlivnit růst kvasnic při kvašení i zhoršit koloidní stabilitu stočeného piva [2].

# 3 METODY STANOVENÍ POLYFENOLŮ V PIVU

## 3.1 Metody stanovení přírodních polyfenolů

### 3.1.1 Izolace fenolických látek

Je mnoho způsobů jak izolovat flavonoidy z různých typů zkoumaných látek, jako například rostlin, nápojů a jiných tekutých vzorků. Pevné vzorky je třeba nejdříve homogenizovat. Homogenizací lze perforovat plazmatické membrány buněk za účelem uvolnění buněčného obsahu do prostředí. K tomu se používají různé metody, nejčastěji rozbití buněk ultrazvukem, protlačení buněk malým otvorem, použití mírného detergentu na perforace plasmatické membrány a nebo rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce. Následuje izolace analytu pomocí extrakce vhodným rozpouštědlem, případně přečištění a zkoncentrování vzorku extrakcí pevnou fází [42].

#### *3.1.1.1 Extrakce pevnou fází (Solid-Phase Extraktion – SPE)*

Při analýze polyfenolyckých komponent je SPE široce využívanou metodou. Ve většině případů sorbent představuje $C_{18}$-vázaný oxid křemičitý. Roztok vzorku a rozpouštědlo bývají mírně okyseleny, čímž se zabrání ionizaci flavonoidů, která by vedla ke snížení retence. Relativně nová metoda SPE využívá jako sorbenty MIP polymery, což jsou polymery obsahující obtisky příslušných molekul. Tyto sorbenty jsou vysoce selektivní pro cílové analyty a obvykle mají dobrou mechanickou a tepelnou stabilitu [43].

#### *3.1.1.2 Disperze matrice na pevné fázi (Matrix Solid-Phase Dispersion)*

MSPD je postup poprvé využitý roku 1989. Dovoluje kompletní rozdělení komponent a selektivní vymývání jednotlivých molekul různých skupin sloučenin ze stejného vzorku v jednom kroku. Metoda byla využita při izolaci léků ve stravě, živočišné tkáni, ale našla také široké využití při analýze ovoce, zelenině a jiných podobných matricích [43].

#### *3.1.1.3 Mikroextrakce pevnou fází (SPME)*

Při mikroextrakci pevnou fází jsou využívána vlákna z taveného křemene potažená polyakrylátem nebo polydimethylsiloxanem jako stacionární fáze pro extrakci analytu z kapalného nebo plynného vzorku. Spotřeba organických rozpouštědel je mnohem menší než u extrakce pevnou fází. Na mikroextrakci pevnou fází navazuje některá ze separačních me-

tod jako např. plynová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie [43].

## 3.2 Separace fenolických látek – základní instrumentální metody

### 3.2.1 Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC)

Plynová chromatografie byla používána pro analýzu flavonoidů na začátku šedesátých let 20. Století. Deriváty flavonoidů byly separovány na koloně naplněné SE-30 silikonovým polymerem, následovala tepelně-vodivostní detekce. Frakce byly odebírány pro IR a UV-VIS spektroskopii. Ačkoliv GC není již tak hojně využívána k analýze polyfenolů, její význam v poslední době roste díky rozvoji vysokoteplotní chromatografie a zavedení vylepšených derivačních procedur. Při derivatizaci flavonoidů většinou dochází ke vzniku trimethylsilyletherových (TMS) derivátů. Methylace flavonoidů s více než jednou hydroxylovou skupinou může dát vzniknout několika derivátům, které komplikují kvantifikaci. Současné využití plynové chromatografie v analýze je zaměřeno na jejich antioxidační aktivitu, metabolismus a taxonomii. Flavonoidy jsou detekovány hmotnostním spektrometrem s elektronovou ionizací v režimu výběrového monitorování iontů [43], [44].

### 3.2.2 Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis – CE)

Separace metodou CE je založena na odlišnosti elektroforetických mobilit iontů v elektroforetickém médiu uvnitř malé kapiláry. Většina studií využívajících kapilární elektroforézu pro analýzu flavonoidů se vztahuje k výzkumu přírodních produktů. Hlavní typy kapilární elektroforézy jsou kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektroforetická elekroforéza (MEKC) s typickým fosfátovým a borátovým pufrem. Kapiláry mají vnitřní průměr 50 až 100 μm, napětí je 10 až 30 kV a objem nástřiku se pohybuje v rozmezí 10 až 50 nl. Na kapilární elektroforézu obvykle navazují UV-VIS, fluorescenční, ED a MS detektory [43], [44].

### 3.2.3 Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography – TLC)

V současné době stále hraje chromatografie na tenké vrstvě v analýze flavonoidů významnou roli. TLC je mimořádně výhodná pro rychlé rozdělení rostlinných a léčivých extraktů před detailní analýzou instrumentálními technikami (především LC/UV-VIS). Ve většině

případů je využíván jako stacionární fáze $SiO_2$. Detekce probíhá v rozmezí 350 až 365 nm, je možné využití i měření optické hustoty při stejné vlnové délce [43], [44].

### 3.2.4 Separace flavonoidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatogrphy – HPLC)

Vysoké účinnosti v separaci složek vzorku je dosaženo použitím vhodných stacionárních a mobilních fází. Vzhledem k tomu, že mobilní fáze protéká separačním systémem pod vysokým tlakem, bývá metoda někdy označována také jako vysokotlaká kapalinová chromatografie [44].

Separace flavonoidů se obvykle provádí pomocí RP-HPLC. Nejčastěji používanou stacionární fází je chemicky vázaná oktadecylová fáze. Využívají se také silikagel, Sephadex a polyamidy. Gradientová eluce je obvykle prováděna binárním systémem rozpouštědel, a to vodnou fází s přídavkem kyseliny octové a mravenčí a vedle nich také methanolu nebo acetonitrilu. Kapalinová chromatografie většinou probíhá při pokojové teplotě, ale někdy se doporučuje zvýšit teplotu na 40 °C, aby se dosáhlo zkrácení doby trvání analýzy a protože kolony, u kterých se udržuje stálá teplota, poskytují opakující se eluční časy [45].

Všechny aglykony polyfenolů obsahují alespoň jedno aromatické jádro, proto dobře absorbují UV záření. Detekce flavonoidů se obvykle provádí při 250, 265, 290, 350, 370 a 400 nm, v přítomnosti anthokyanidinů s přidanou vlnovou délkou v rozsahu 500 až 525 nm.

Analýza flavonoidů fluorescenční detekcí je využívána jen zřídka, jelikož flavonoidy jen omezeně vykazují přirozenou fluorescenci (např. izoflavony, flavonoidy s OH skupinou na třetím uhlíku flavanového skeletu a methoxylované flavony). Vlastnosti funkčních skupin a jejich poloha rozhodují, zda jednotlivé flavonoidy fluoreskují či nikoliv.

Protože většina flavonoidů díky přítomnosti skupin fenolických látek, může být využita také elektrochemická detekce, i když tato metoda není tak citlivá jako fluorescenční detekce [43].

## 3.3 Metoda LC/MS v analýze flavonoidů

Jelikož polyfenolické sloučeniny tvoří skupinu mírně polárních molekul, lze pro jejich analýzu využít reverzní kapalinovou chromatografii s následnou hmotnostní detekcí a elektrosprejem jako iontovým zdrojem. Užití LC/MS v analýze potravin poskytuje důležité in-

formace o struktuře cílové nebo neznámé látky přímo v matricích. V některých případech připojená technika může poskytnout úplnou on-line strukturní analýzu, která není časově náročná [46].

### 3.3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí převedením na kladné a záporné ionty. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami, zejména plynovou a kapalinovou chromatografií, umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složitější matrici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [47].

# 4 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PIVA

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplívá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však často problematické. Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

## 4.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Metody hodnotící schopnost eliminovat radikály spočívají v hodnocení schopnosti vzorků vychytávat volné radikály. Jde o radikály kyslíku (hydroxyl, poroxyl, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS, galvinoxyl). Zvláštní skupinu tvoří metody testující schopnost inhibovat nebo zpomalovat lipidovou peroxidaci [48].

### 4.1.1 Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

#### *4.1.1.1 Metoda používající $ABTS^{-+}$ (metoda TEAC)*

Jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Testuje schopnost vzorku či látek zhášet kation-radikál $ABTS^{-+}$ (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Jednou z možností chemické oxidace je kation radikálu připravován reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem nebo s oxidem za vzniku modrozeleného zbarvení roztoku [49]. Zhášení radikálu $ABTS^{-+}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra $ABTS^{-+}$, nejčastěji se měří při 734 nm. V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{-+}$ generuje oxidací ABTS. Převážně je používán systém ABTS/$H_2O_2$/peroxidáza nebo ABTS/methmyoglobin/$H_2O_2$. Vlivem antioxidantů dochází k odbarvení modrozelené reakční směsi, přičemž úbytek absorbance je úměrný antioxidační aktivitě [49].

Metoda je označována jako TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6 hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina).

Při vlastním experimentálním měření se užívají dva postupy. V prvém se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál $ABTS^{-+}$, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu $ABTS^{-+}$. Častěji se užívá uspořádání, při němž se antioxidant přidává k radikálu $ABTS^{-+}$ již vyprodukovaném pomocí peroxidázy [50]. Stanovení celkové antioxidační aktivity je možno provádět i komerčně vyráběnými sety (napt. Randox Laboratories Ltd.). Používá se i sériově na mikrotitračních destičkách [50].

Celková antioxidační aktivita se hodnotí parametrem TEAC. Označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 $mmol.l^{-1}$. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu ($mmol.l^{-1}$), která je rovna antioxidační aktivitě vzorku [51].

Pro spektrofotometrickou metodu stanovení celkové antioxidační aktivity s ABTS jsou popsány aplikace měření v hydrofilním i lipofilním prostředí. Byla rovněž vypracována metoda kombinující HPLC separaci látek s následnou detekcí radikálových zhášečů na základě reakce s $ABTS^{\bullet+}$ [52].

Metoda stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění, od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky.

#### *4.1.1.2 Metoda používající DPPH*

Tato metoda je považována za jednu za základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazilem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazil) [48]. DPPH je stabilní radikál, který může být díky své struktuře akceptorem vodíku a přejít do formy stabilní diamagnetické molekuly. Což jsou pohybující se molekuly – elektron (nebo nukleon), které se chovají jako elektromagnet, přísluší mu tedy určitý magnetický moment. Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). DPPH má v metanolu intenzivní fialové zbarvení, které se působením antioxidantů snižuje. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času [53] nebo se pracuje v kinetickém režimu [54]. Test lze provádět i na mikrotitračních destičkách [55]. Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance nebo HPLC. Použití

detekce HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je výhodné zvláště u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometrie zabarvení vzorku eliminuje. U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny [55] nebo v jednotkách standardu Troloxu. Jsou používány aplikace na TLC, vhodné pro screening radikálové zhášecí aktivity směsných vzorků. Podobnou modifikací je kombinace testu se separací látek se směsi metodou HPLC, kdy látky rozdělené na koloně reagují kontinuálně s DPPH a spektrofotometricky se detekuje pík radikálu [52].

#### *4.1.1.3 Metoda používající galvinoxyl*

K metodám využívajícím reakci antioxidantu se stabilními radikály patří také test s galvinoxilem (2,6-di-*terc*-butyl-4-[(3,5-di-*terc*-butyl-4-oxocyklohexy-2,5-dien-1-yliden)methyl]fenoxyl) [56].

Princip metody spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxilu látkami poskytujícími vodík podobně jako při testu DPPH. Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm nebo na základě elektronové spinové rezonance ESR.

#### *4.1.1.4 Využití jiných stabilních radikálů*

Pro hodnocení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá také syntetický volný radikál Fremyho sůl (nitrosodisulfonan draselný), detekce a hodnocení reakce se provádí ESR [57].

### 4.1.2 Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

#### *4.1.2.1 Metoda ORAC*

Při použití metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci [58]. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β-fykoerytrinu (β-PE) po ataku radikály. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2´-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid), při generaci hydroxylových radikálů pak systém $H_2O_2$ + $Cu^{2+}$. Vzhledem k tomu že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Originální metoda ORAC, která používá sondu β-PE ($ORAC_{PE}$), má široké využití a poskytuje významné informace o antioxidační kapacitě vzorků různého typu [59]. Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností β-PE

(např. omezená fotostabilita). Zavedením jiného typu fluorescenční sondy, a sice fluoresceinu (FL), se metodika ($ORAC_{FL}$) zpřesňuje. Uvádí se, že metoda $ORAC_{FL}$ je exaktnější v důsledku přesného a jednoduchého reakčního mechanismu, který spočívá v klasickém přenosu vodíku [60].

#### *4.1.2.2 Metody založené na vychytávání OH-radikálů*

Při těchto metodách jsou OH-radikály generovány různými postupy (Fentonovou reakcí [61], UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou syntetických derivátů . Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající $OH^{\cdot}$ snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání $OH^{\cdot}$ salicylovou kyselinou. Vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí metodou HPLC s UV detekcí [62]. Jiným postupem je použití 2,2-dimethyl-2H-pyrrol-l-oxidu (DMPO) jako lapače $OH^{\cdot}$. Adukt DMPO-OH může být kvantifikován pomocí ESR nebo HPLC-ECD. Další možností je vychytávání $OH^{\cdot}$ deoxyribózou [63], jejíž degradační produkty jsou stanovovány reakcí s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). Výhodou tohoto postupu je možnost stanovit jak antioxidační, tak i pro oxidační vlastnosti látek. Vychytávání $OH^{\cdot}$ radikálů lze rovněž sledovat specifickou chemiluminiscenční sondou indoxyl-β-glkuronidem (IBG) [64].

#### *4.1.2.3 Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu*

K produkci radikálu je užívána např. neenzymová reakce 5-methylfenazinium-methylsulfátu a NADH nebo systém xanthin/xanthinoxidasa. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky při 550-560 nm. V testech UV může být nitrotetrazoliová modř nahrazena syntetickým formazanovým barvivem WST-1, které je vzhledem k dobré rozpustnosti vhodnější pro provádění testu na mikrotitračních destičkách. Je rovněž možná detekce metodou ESR na základě reakce superoxidového anion-radikálu s DMPO. Dalším používaným postupem je kombinace HPLC a chemiluminiscence [65]. Měří se inhibice chemiluminiscence luminolu látkami separovanými při HPLC. Jelikož luminal je schopen reagovat s různými reaktivními kyslíkovými radikály, postihuje tato metoda široké spektrum antioxidační aktivity látek.

### 4.1.3 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Při studiu látek s antiradikálovými účinky se proto řada metod

zaměřuje přímo na testování inhibičních účinků na lipidovou peroxidaci. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály ($OH^{\bullet}$), tak sekundárně vznikající radikálové produkty (peroxyl, alkoxyl) a mohou též působit jako látky nelatující ionty přechodných kovů. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednouchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů [66]. Jinou možností je studium na mikrosomech [67]. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech [68], mitochondriích [69] nebo LDL-částicích (low-density lipoproteins).

K nejjednodušším testům patří metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. Jako iniciátor radikálové reakce je často užíván AAPH, produkty peroxidace jsou sledovány spektrofotometricky při 234 nm. Metoda má řadu modifikací, které se liší ve způsobu přípravy lipidové fáze a způsobu detekce [70]. Často je užíván postup využívající zpraženou oxidaci β-karotenu a linolové kyseliny vzdušným kyslíkem [71]. Antioxidační účinek látek je hodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm podle spotřeby β-karotenu, přičemž provedení je možné i na mikrotitračních destičkách. Stanovení se také provádí v modifikaci na TLC. Metoda s β-karotenem se užívá pro stanovení vzorků TAA, je vhodná i pro screening směsných vzorků [72].

Jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thibarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení vzniklých TBA-MBA je jednoduché, citlivé, avšak nespecifické, zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA. Výhodou je, že test lze realizovat i na mikrotitračních destičkách. Specifičtějším vyhodnocením kvantity TBA-MDA je metoda HPLC [73].

## 4.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky.

### 4.2.1 Metody chemické

#### *4.2.1.1 Metoda FRAP*

Na principu redoxní reakce je založena metoda FRAP (ferric reducting antioxidant potencial). Při této metodě redukují antioxidanty ze vzorku komplex $Fe^{3+}$-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) ($Fe^{3+}$-TPTZ). Nárust absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu $Fe^{2+}$-TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké pH (3,6), nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly, navíc vznikající $Fe^{2+}$ je *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion $Fe^{3+}$ a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat [74].

### 4.2.2 Elektrochemické metody

#### *4.2.2.1 Cyklická volumetrie*

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit cyklickou volumetrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka – tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku $E_A$ a jeho anodického proudu $I_A$. Čím je nižší hodnota $E_A$, tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku $I_A$ je možné určit koncentraci látek. Cyklická volumetrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty EA korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. s lipoperoxidací, DPPH [75].

#### *4.2.2.2 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí*

Elektroaktivní látky je možno velmi přesně a citlivě detekovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat kom-

plexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Při analýze neruší zbarvení směsí, ale je nutné dodržet vysokou čistotu reagencií v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s různými jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH [75].

# II. PRAKTICKÁ ČÁST

# 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V praktické části bylo cílem stanovit u vybraných vzorků piva, z různých mezistupňů technologického procesu, celkovou antioxidační kapacitu a obsah celkových polyfenolů. Dále chemické analýzy doplnit jednoduchými mikrobiologickými rozbory na celkový počet mikroorganizmů, kvasinek a plísní.

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity, byla vybrána spektrofotometrická metoda DPPH. Metoda je založena na reakci barevného radikálu 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazilu s antioxidanty v analyzovaném vzorku, poté se stanoví úbytek absorbance.

Pro stanovení celkových polyfenolů byla vybrána spektrofotometrická metoda s využitím Folin-Ciocalteauova činidla, které spolu s měřeným vzorkem a uhličitanem sodným reaguje do modrého zbarvení, u kterého se stanoví absorbance.

Mikrobiologické rozbory byly provedeny na Petriho miskách s použitím dvou typů agarových živných půd. Pro stanovení celkového počtu mikroorganizmů byl použit agar PCA (plate count agar) a pro stanovení kvasinek a plísní byl použit jednotný agar PDA (potato dextrose agar). U obou rozborů byly použity metody přelivem.

## 5.1 Vzorky

Vzorky pro stanovení chemických analýz a mikrobiologických rozborů byly poskytnuty rodinným pivovarem v Ratíškovicích. Byly připraveny čtyři várky piva českého typu a to dekokčním způsobem vaření na jeden rmut. 10° světlá, 12° světlá, 13° polotmavá a 12° granát. Byly použity tři druhy sladu ze sladovny v Záhlinicích. Slad světlý, slad bavorský a slad karamelový. Chmel byl použit Žatecký poloranný červeňák ve formě granulí typ 90. Pivovarské kvasnice *Saccharomyces pastorianus* RIMB 95 byly přivezeny z pivovaru Bernard. Vzorky byly odebírány během varného, kvasného a zrajícího procesu do sterilních skleněných vzorkovnic o objemu 200 ml. Vzorky sladu a chmele byly odebrány přímo ze skladovacích obalů.

### 5.1.1 Vzorky piva z jednotlivých fází technologického procesu

Během technologického procesu vaření jednotlivých várek byly odebírány vzorky ke stanovení chemických analýz a mikrobiologických rozborů. Byly odebrány vzorky předku, výstřelku, sladiny, mladiny, dále vzorky prokvašeného piva po hlavním kvašení a vzorky piva po dokvašení a zrání.

Pro mikrobiologické rozbory byl vzorek sladu připraven mletím a poté provedeno vlastní ředění, kdežto pro chemické analýzy výluh sladu nahradila přímo sladina. Pro stanovení byla připravena tyto piva:

***10° světlá***

Dekokční způsob vaření (1 rmut), světlý slad, granulovaný chmel Žatecký poloraný červeňák typ 90 (dávka chmele – 25 mg/l hořkých isosloučenin v pivu), pivovarské kvasnice *Saccharomyces pastorianus* RIMB 95.

***12° světlá***

Dekokční způsob vaření (1 rmut), světlý slad, granulovaný chmel Žatecký poloraný červeňák typ 90 (dávka chmele – 30 mg/l hořkých isosloučenin v pivu), pivovarské kvasnice *Saccharomyces pastorianus* RIMB 95.

***13° polotmavá***

Dekokční způsob vaření (1 rmut), světlý slad (65 %), bavorský slad (30 %), karamelový slad (5 %), granulovaný chmel typ Žatecký poloraný červeňák (dávka chmele – 30 mg/l hořkých isosloučenin v pivu, pivovarské kvasnice *Saccharomyces pastorianus* RIMB 95.

***12° granát***

Dekokční způsob vaření (1 rmut), světlý slad (60 %), bavorský slad (40 %), granulovaný chmel Žatecký poloraný červeňák (dávka chmele – 30 mg/l hořkých isosloučenin v pivu, pivovarské kvasnice *Saccharomyces pastorianus* RIMB 95.

*Tab. 8. Přehled a značení vzorků*

| | 10° světlá **A** | 12°světlá **B** | 13° polotmavá **C** | 12°granát **D** |
|---|---|---|---|---|
| Chmel **1** | A1 | B1 | C1 | D1 |
| Předek **2** | A2 | B2 | C2 | D2 |
| Výstřelek **3** | A3 | B3 | C3 | D3 |
| Sladina **4** | A4 | B4 | C4 | D4 |
| Mladina **5** | A5 | B5 | C5 | D5 |
| Hlavní kvašení **6** | A6 | B6 | C6 | D6 |
| Pivo (ležení) **7** | A7 | B7 | C7 | D7 |

### 5.1.2 Vzorky chmele a jejich příprava

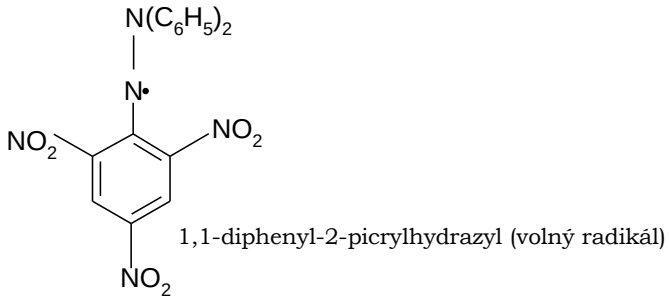
Pro chemické analýzy vzorků chmele byl zvolen výluh chmele horkou vodou, který se nejvíce blíží reálným podmínkám při zpracování chmele během chmelovaru. Do první varné baňky o objemu 200 ml se přidalo 0,4483 g rozdrceného chmele (to odpovídá dávce chmele pro 10° pivo s obsahem 20 mg/l hořkých isosloučenin v mladině) a do druhé baňky o objemu 200 ml se přidalo 0,6690 g rozdrceného chmele (to odpovídá dávce chmele pro 12 a 13° pivo s obsahem 30 mg/l hořkých isosloučenin v mladině), baňky se doplnily po rysku 200ml. Baňky s obsahem se přivedly pod zpětným chladičem do varu. Doba varu byla 30 minut. Po ukončení varu se baňky s obsahem zchladily a přefiltrovaly přes filtrační papír. Filtráty se uložily do lednice a dle potřeby použily pro stanovení.

Pro mikrobiologické rozbory byl vzorek chmele připraven drcením v porcelánové třecí misce a bylo provedeno vlastní ředění.

## 5.2 Stanovení celkové antioxidační kapacity spektrofotometricky metodou DPPH

### 5.2.1 Princip metody DPPH

Metoda je založena na reakci barevného radikálu 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazilu (DPPH) s antioxidanty v analyzovaném vzorku. Za intenzivní fialové zbarvení volného radikálu je odpovědný nepárový elektron hydrazylového dusíku.




*Obr. 3. Volný radikál DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil).*

Vzájemná reakce má za následek postupné odbarvování reakčního prostředí a postupné snižování absorbance ve stanovovaném roztoku spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm. Rozdíl absorbance na začátku a po 60 minutách reakce kvantifikuje redukční aktivitu zkoumaného vzorku [76].

### 5.2.2 Instrumentace

- Spektrofotometr UV/VIS - LAMBDA 25
- Odměrné baňky 25 ml
- Ultrazvuková lázeň
- Analytické váhy
- Mikropipety

### 5.2.3 Chemikálie a roztoky

- Kyselina askorbová - standard
- DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazil)
- Metanol
- Destilovaná voda

### 5.2.4 Pracovní postup

***Příprava zásobního roztoku DPPH***

Naváží se 24 mg DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazil) a doplní se metanolem po rysku 100 ml (c=240mg/l). Protřepe se a uchová v mrazáku, před použitím se vytemperuje na laboratorní teplotu.

***Příprava pracovního roztoku DPPH***

Odebere se 30 ml zásobního roztoku DPPH a přidá se 135 ml metanolu.

***Příprava zásobního roztoku kyseliny askorbové (c = 800mg/l)***

Naváží se 160 mg kyseliny askorbové a doplní destilovanou vodou po rysku 200 ml.

***Kalibrační křivka na kyselinu askorbovou pro stanovení celkové antioxidační kapacity***

Do čtyřech odměrných baněk o objemu 25 ml se připraví ředěním kalibrační roztoky kyseliny askorbové ze zásobního roztoku o koncentraci c = 800mg/l. Kalibrační roztoky se naředí tak, aby výsledná koncentrace kalibračních roztoků kyseliny askorbové byla 40, 80, 120, 160 mg/l. Do každé baňky se odpipetuje požadované množství zásobního roztoku 1,25; 2,5; 3,75 a 5 ml. Destilovanou vodou se doplní po rysku 25 ml.

*Tab. 9. Kalibrační roztoky kyseliny askorbové*

| **odměrná baňka (25ml)** | **1** | **2** | **3** | **4** |
|---|---|---|---|---|
| zásobní roztok kys. askorbové (ml) | 1,25 | 2,5 | 3,75 | 5 |
| destilovaná voda (ml) | 23,75 | 22,5 | 21,25 | 20 |
| $c_{kys.askorbová}$ [mg/l] | 40 | 80 | 120 | 160 |

Dále do čtyřech odměrných baněk o objemu 25 ml se napipetuje 8,55 ml pracovního roztoku DPPH. Z připravených kalibračních roztoků o koncentraci 40, 80, 120, 160 mg/l se paralelně odpipetuje 450 µl a přidá do odměrných baněk s pracovním roztokem DPPH. Po 60 minutách se změří spektrometricky při 515 nm. Dále se změří absorbance pracovního roztoku DPPH (hodnota $A_0$), která se zahrnuje do rovnice (1) úbytku absorbance.

$$\textit{Úbytek absorbance (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \,.\, 100 \qquad (1)$$

$A_0$ = absorbance pracovního roztoku DPPH

$A_1$ = absorbance jednotlivých kalibračních roztoků připravených smícháním s pracovním roztokem DPPH

Podle jednotlivých výpočtů úbytků absorbancí se sestaví kalibrační křivka na kyselinu askorbovou. Před každým novým měřením se sestaví nová kalibrační křivka, protože v přípravě nových pracovních roztoků DPPH, nebo i starších pracovních roztoků DPPH, mohou být odchylky.

***Vlastní stanovení celkové antioxidační kapacity***

Před vlastní analýzou se vzorky obsahující $CO_2$, vloží do ultrazvukové lázně na cca 20 minut (Hlavní kvašení a hotové pivo). Všechny vzorky se naředí destilovanou vodou v poměru 3:1, kdy by absorbance takto naředěných vzorků měla být do hodnoty 1.

Do odměrných baněk o objemu 25 ml se odpipetuje 8,55 ml pracovního roztoku DPPH a 450 µl vzorku. Po 60 minutách se stanovuje spektrometricky při 515 nm. Do výpočtů úbytků absorbancí se zahrnuje absorbance $A_0$ naměřena při kalibraci. Podle kalibrační rovnice regresní křivky se vypočítá celková antioxidační kapacita vzorků a vyjádří se jako kyselina askorbová v mg na litr.

## 5.3 Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteauovým činidlem

### 5.3.1 Princip metody Folin-Ciocalteauovým činidlem

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení barevných produktů reakce hydroxylových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin-Ciocalteau. Činidlo obsahuje: wolfram sodný, molybdenan sodný, kyselinu fosforečnou, kyselinu chlorovodíkovou, síran lithný a brom. Činidlo je jasně žluté barvy.

### 5.3.2 Instrumentace

- Spektrofotometr UV/VIS - LAMBDA 25
- Odměrné baňky 25 ml
- Ultrazvuková lázeň
- Analytické váhy
- Mikropipety
- Filtrační papír

### 5.3.3 Chemikálie a roztoky

- Tanin - standard
- Folin-Ciocalteauovo činidlo (firma PENTA)
- Uhličitan sodný
- Destilovaná voda

### 5.3.4 Pracovní postup

***Příprava zásobního roztoku taninu (c = 500 mg/l)***

Na analytických vahách navážíme 50 mg taninu, převedeme do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplníme po rysku destilovanou vodou.

***Příprava 20 % (hmotnostní) roztoku uhličitanu sodného***

Navážíme 40 g uhličitanu sodného a přidáme 160 g destilované vody, důkladně rozmícháme a přefiltrujeme přes filtrační papír.

***Kalibrační křivka na tanin pro stanovení celkových polyfenolů***

Do pěti odměrných baněk o obsahu 25 ml se připraví kalibrační roztoky, které budou zahrnovat ředění zásobního roztoku taninu tak, aby výsledná koncentrace taninu kalibračních roztoků činila 4, 5, 6 a 7 mg/l, a slepý vzorek (baňka 0). Nejprve se připraví slepý vzorek, který obsahuje 1,25 ml Folin-Ciocalteuova činidla a 3,75 ml uhličitanu sodného, baňka se doplní po rysku 25 ml destilovanou vodou. Dále se do odměrných baněk 25 ml napipetuje zásobní roztok taninu v objemech 0,2; 0,25; 0,3 a 0,35 ml, do každé se přidá 1,25 ml Folin-Ciocalteuovo činidla. Počká se 3 minuty a přidá se 3,75 ml uhličitanu sodného, doplní se destilovanou vodou po rysku 25 ml. Po dvou hodinách se stanovuje absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 765 nm proti slepému vzorku. Sestrojí se kalibrační rovnice regresní křivky z jednotlivých stanovení. Před každým novým stanovením se sestaví nová kalibrační křivka, protože během práce a skladování Folin-Ciocalteuova činidla, může docházet ke změnám, a během dalších analýz může docházet k odchylkám.

*Tab. 10. Přehled objemů kalibračních roztoků*

| **Odměrná baňka** | **0** | **1** | **2** | **3** | **4** |
|---|---|---|---|---|---|
| Zázobní roztok taninu (c=500 mg.l$^{-1}$) [ml] | - | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 |
| Folin-Ciocalteuovo činidlo [ml] | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| Uhličitan sodny $Na_2CO_3$ [ml] | 3,75 | 3,75 | 3,75 | 3,75 | 3,75 |
| Destilovaná voda [ml] | 20 | 19,8 | 19,75 | 19,7 | 19,65 |
| $C_{tanin}$ [mg.l$^{-1}$] | - | 4 | 5 | 6 | 7 |

***Vlastní stanovení obsahu celkových polyfenolů***

Před vlastní analýzou se vzorky obsahující $CO_2$, vloží do ultrazvukové lázně na cca 20 minut (Hlavní kvašení a hotové pivo). Do připravených odměrných baněk o objemu 25 ml nepipetujeme 0,25 ml vzorku, přidáme 1,25 ml Folin-Ciocalteuoa činidla a necháme 3 minuty stát. Poté přidáme 3,75 ml uhličitanu sodného a doplníme destilovanou vodou po rysku 25 ml. Necháme na temném místě dvě hodiny reagovat a poté stanovíme absorbanci spektrofotometricky při vlnové délce 765 nm. Podle kalibrační rovnice regresní křivky se vypočítají obsah celkových polyfenolů jednotlivých vzorků a vyjádří se jako tanin v mg na litr [77].

## 5.4 Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní

Pivovarská mikrobiologie se zabývá studiem mikroorganismů vyskytujících se v pivovarské výrobě. Zajímá se nejen o správné zásady pěstování pivovarských kvasinek, ale také o škody způsobené ve výrobě mikroorganismy, které na druhé straně mohou být v odvětví potravinářského průmyslu užitečné. Jedním z cílů této práce je jednoduchý mikrobiologický rozbor (CPM, kvasinky a plísně) sladu, chmele a vybraných vzorků piv z jednotlivých mezistupňů technologického procesu výroby piva, na porovnání mikrobiologického profilu výroby.

### 5.4.1 Princip metody

Podstatou metody je kultivace mikroorganismů, kvasinek a plísní na vhodných agarových půdách za optimálních podmínek pro jejich růst.

### 5.4.2 Instrumentace

- Petriho misky, zkumavky
- sterilizátor, mikropipety

### 5.4.3 Cemikálie a roztoky

- PDA agar (potato dextrose agar)
- PCA agar (plate count agar)
- Fyziologický roztok
- Destilovaná voda

### 5.4.4 Pracovní postup

***Příprava živné půdy PLATE COUNT AGAR pro stanovení CPM***

Pro stanovení CPM se připraví živná půda PCA (plate count agar, pH = 7,0). Na 1000 ml destilované vody se odváží 20,5 g sypkého agaru. Vše převedeme do nádoby, necháme 5 minut stát a poté důkladně promícháme do dokonalé suspenze. Obsah zahříváme do varu. Poté necháme sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 až 20 minut. Agar zchladíme na teplotu 40 až 50 °C a použijme.

***Příprava živné půdy POTATO DEXTROSE AGAR pro stanovení kvasinek a plísní***

Pro stanovení kvasinek a plísní se připraví jednotná půda PDA (potato dextrose agar, pH = 5,2). Na 1000 ml destilované vody se odváží 39,0 g sypkého agaru. Vše převedeme do nádoby, necháme 5 minut stát a poté důkladně promícháme do dokonalé suspenze. Obsah zahříváme do varu. Poté necháme sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 až 20 minut. Agar zchladíme na teplotu 40 až 50 °C a použijeme.

***Příprava vzorků desetinným ředěním***

Všechny tekuté vzorky se naředí desetinným ředěním fyziologickým roztokem až po 5 ředění, tak že určitý objem vzorku se asepticky přenese do zkumavky s 9-ti násobným objemem sterilního fyziologického roztoku (ředění $10^{-1}$) a použitá pipeta se odloží do desinfekčního roztoku. Obsah zkumavky se opatrně, ale důkladně promíchá, vezme se nová sterilní pipeta, odebere se přesný objem a přenese se do následující zkumavky opět s 9-ti násobným objemem sterilního fyziologického roztoku (ředění $10^{-2}$). Tento postup se opakuje až po ředění $10^{-5}$.

Vzorek sladu se připraví tak, že se pomele, naředí 1:10 s fyziologickým roztokem (ředění $10^{-1}$) a nechá důkladně promíchat. Poté se výše uvedeným postupem pokračuje na ředění $10^{-5}$.

Vzorek chmele se připraví tak, že se rozdrtí v třecí misce, naředí 1:10 s fyziologickým roztokem (ředění $10^{-1}$) a taktéž nechá důkladně promíchat. I ten se naředí výše uvedeným postupem na ředění $10^{-5}$.

***Očkování mikroorganismů přelivem živné půdy***

Do připravených a popsaných Petriho misek dávkujeme 1 ml vzorku a přelijeme připraveným sterilním agarovým živným médiem o teplotě 40 až 45 °C. Ihned po nalití agarové živné půdy se opatrně, ale důkladně krouživým pohybem misky celý objem promíchá. Při této metodě se snižuje riziko kontaminace a odpadá nutnost odsušovat misky v sušárně, ale kolonie rostou v celém objemu živného média. Po ztuhnutí agaru se zavřené Petriho misky uchovají v optimálním prostředí po určitou dobu. Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů se misky s naočkovanými živnými půdami uchovají po dobu 2 dnů při teplotě 30 °C a pro stanovení kvasinek a plísní po dobu 5 dnů při teplotě 25 °C.

***Vyhodnocení počtu bakterií, kvasinek a plísní ve vzorcích, po kultivaci***

K vyhodnocení počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní si vybereme jen Petriho misky z těch ředění, kde je množství kolonií dobře počitatelné – kde nejsou kolonie vzájemně přerostlé, slité či jinak nepřehledné. Za nejvhodnější misky k počítání se považují obvykle takové, kde je počet kolonií mezi 30 a 300. Zjištěný počet kolonií se po odečtu průměruje u paralelních misek a výsledek se přepočítává na 1 ml nebo 1 gram původního vzorku tím, že se zohlední použité ředění. Počty kolonií tvořících jednotky se vypočítají podle vzorce (2).

$$N = \frac{\sum C}{V\ .\ (n_1 + 0{,}1\ .n_2).d} \qquad (2)$$

$\sum \boldsymbol{C}$ – počet kolonií na miskách vybraných k počítání

$\boldsymbol{V}$ - objem inokula očkovaného na každou misku

$\boldsymbol{n_1}$ – počet misek z prvního ředění

$\boldsymbol{n_2}$ – počet misek z druhého ředění

$\boldsymbol{d}$ – první z obou ředění

# 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

## 6.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity spektrofotometricky metodou DPPH

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity byla vybrána metoda DPPH. Metoda je založena na reakci barevného radikálu 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazilu (DPPH) s antioxidanty v měřeném vzorku. Metoda byla podrobněji popsána výše ( kapitola 5.2.1.).

***Kalibrační křivka na celkovou antioxidační kapacitu vyjádřené jako kys. askorbová***

Podle předpokládané antioxidační kapacity byla hledána optimální koncentrace kalibračních roztoků kyseliny askorbové a optimální ředění vzorků piva, tak aby se absorbance při spektrofotometrickém stanovení, pohybovala v rozmezí hodnot 0 až 1. Bylo provedeno několik pokusných stanovení. Nakonec se ukázalo, že optimální koncentrace kalibračních roztoků kyseliny askorbové je 40, 80, 120 a 160 mg/l. A ředění vzorků piva v poměru 1:3 destilovanou vodou.

Zjištěná závislost úbytku absorbance na koncentraci kyseliny askorbové je znázorněna na obrázku (Obr. 4).

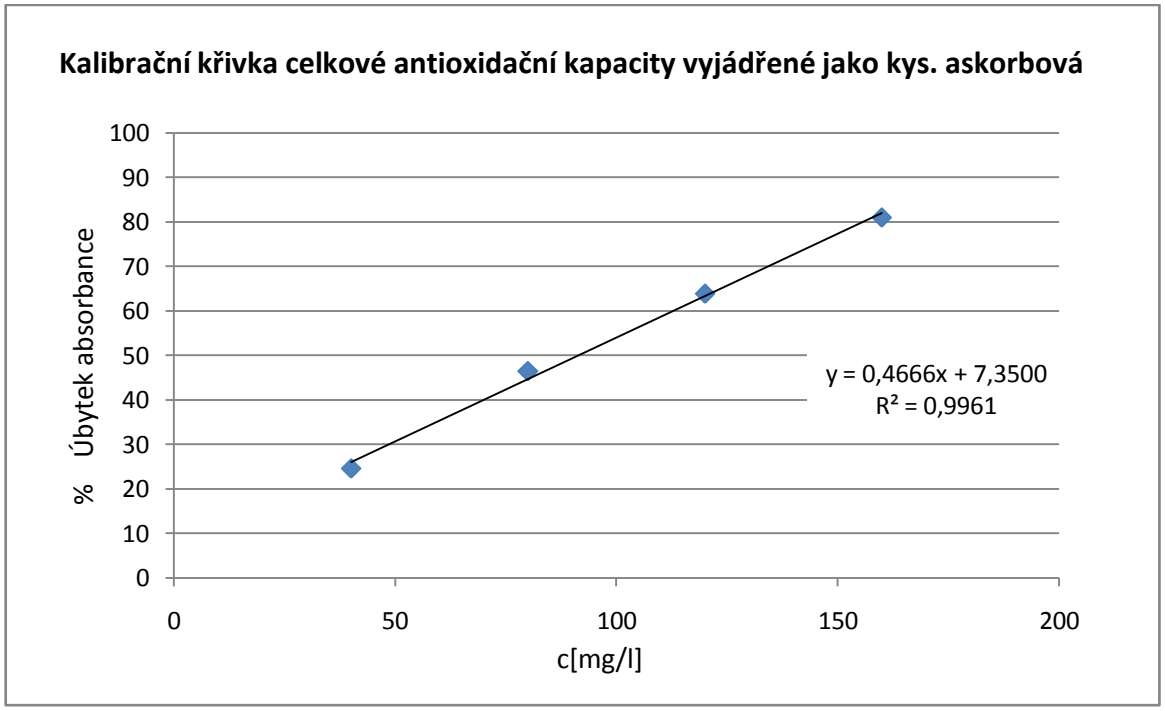
Úbytek absorbance byl vypočten podle vzorce (1),

$$\textit{Úbytek absorbance}\ (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100, \qquad (1)$$

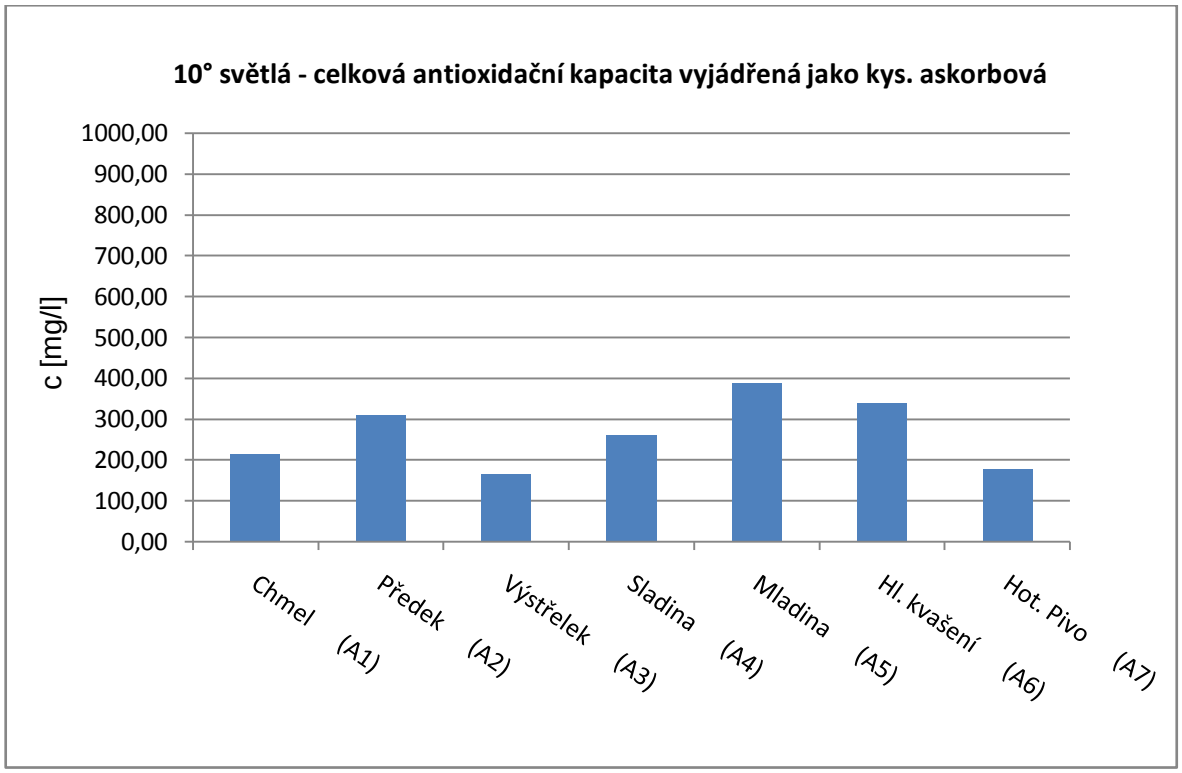
kde $A_1$ je absorbance vzorku v čase t = 60 minut od začátku reakce a $A_0$ je absorbance pracovního roztoku DPPH.

***Stanovení celkové antioxidační kapacity piva***

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity byly připraveny a stanoveny vzorky čtyř druhů piv (10° světlá, 12° světlá, 13°polotmavá, 12° granát) z různých fází technologického procesu výroby piva (předek, výstřelek, sladina, mladina, hlavní kvašení, ležení). K tomu byly připraveny výluhem vzorky chmele. Celkově bylo měřeno 28 vzorků. Přehled vzorků znázorňuje tabulka (Tab. 8). Před každou novou sérií měření byla provedena kalibrační křivka na celkovou antioxidační kapacitu vyjádřené jako kyselina askorbová (Obr. 4).




*Obr. 4. Závislost úbytku absorbance na koncentraci kyseliny askorbové*

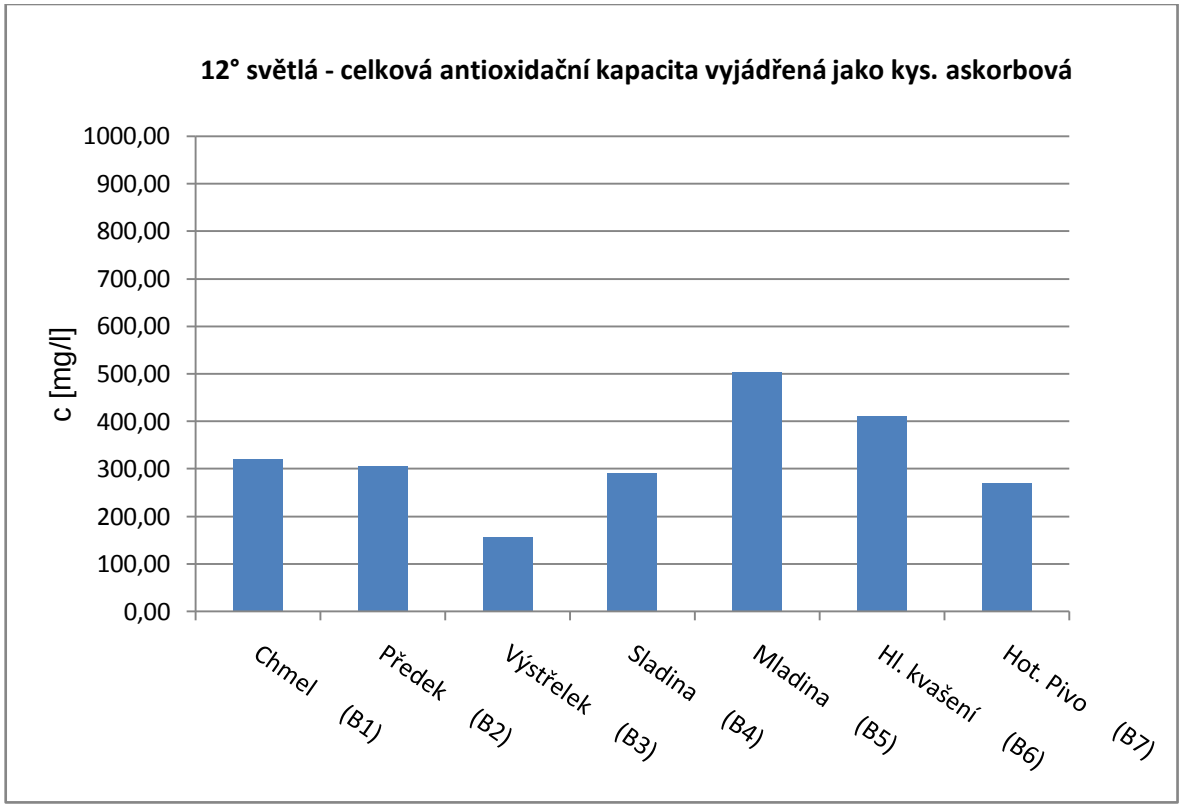



*Obr. 5. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 10° světlá*

Úbytek absorbance studovaných vzorků byl pomocí rovnice regresní kalibrační křivky závislosti úbytku absorbance na koncentraci kyseliny askorbové vyjádřené jako množství kyseliny askorbové v mg na litr.

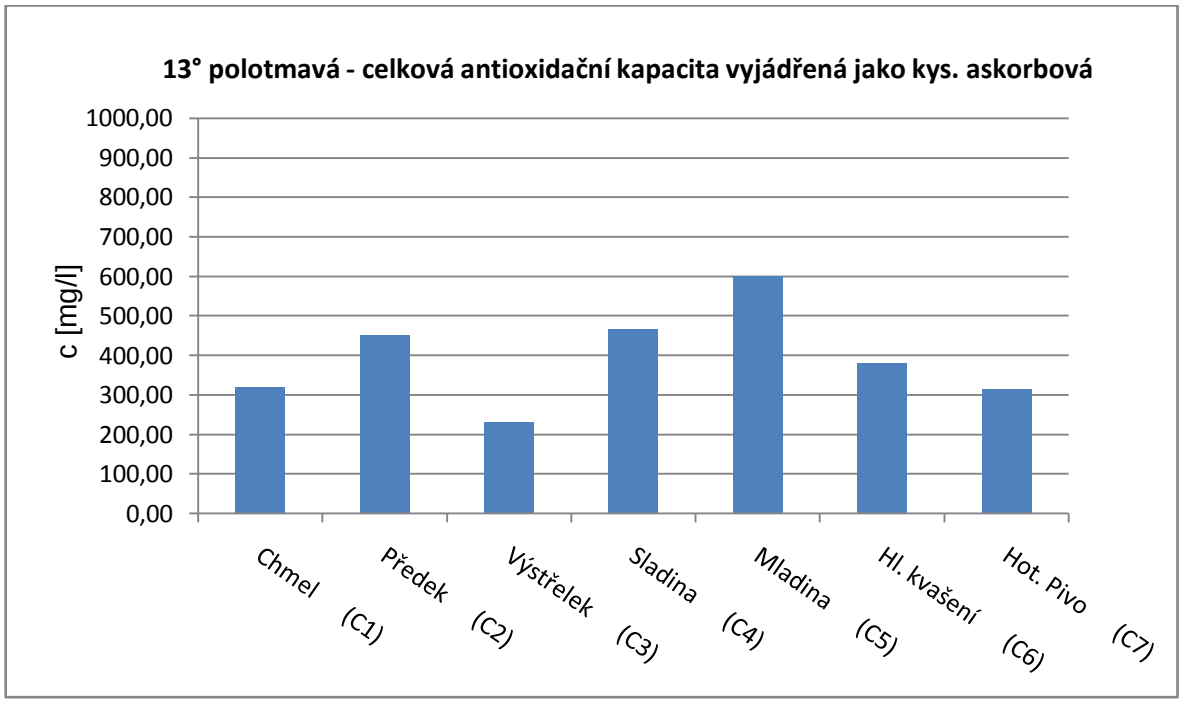
Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno v čase t = 60 minut od začátku reakce. Každý vzorek byl paralelně připraven a stanoven třikrát. Byly vypočteny hodnoty úbytků absorbancí podle vzorce (1), z těchto hodnot byly vypočítány podle rovnice regresní křivky celkové antioxidační kapacity vyjádřené jako kyselina askorbová v $mg.l^{-1}$. Nakonec byla vypočtena průměrná hodnota.

Výsledné hodnoty stanovení celkové antioxidační kapacity 10° světlého piva jsou znázorněny na obrázku (Obr. 5), kde je patrné že největší celkovou antioxidační kapacitu při výrobě 10° piva vykazuje mladina (A5), která obsahuje jak extraktivní látky sladu, tak i extraktivní látky chmele po chmelovaru. Během hlavního kvašení (A6) ve spilce a dokvašování piva (A7) v ležáckém tanku antioxidační kapacita klesá.




*Obr. 6. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 12° světlá*

Dále je patrné, že antioxidační kapacita sladu u 10° piva se podílí na hotovém výrobku výrazně, příspěvek chmele (A1) zde není tak výrazný, protože 10° piva se chmelí méně než 12° piva a to v obsahu hořkých isosloučenin kolem 20 mg/l v hotovém pivu. Do piva během chmelovaru přechází přibližně 28 % hořkých látek. Nejnižší antioxidační aktivitu vykazuje výstřelek (A3), tato skutečnost se dala vzhledem k technologickému procesu předpokládat.

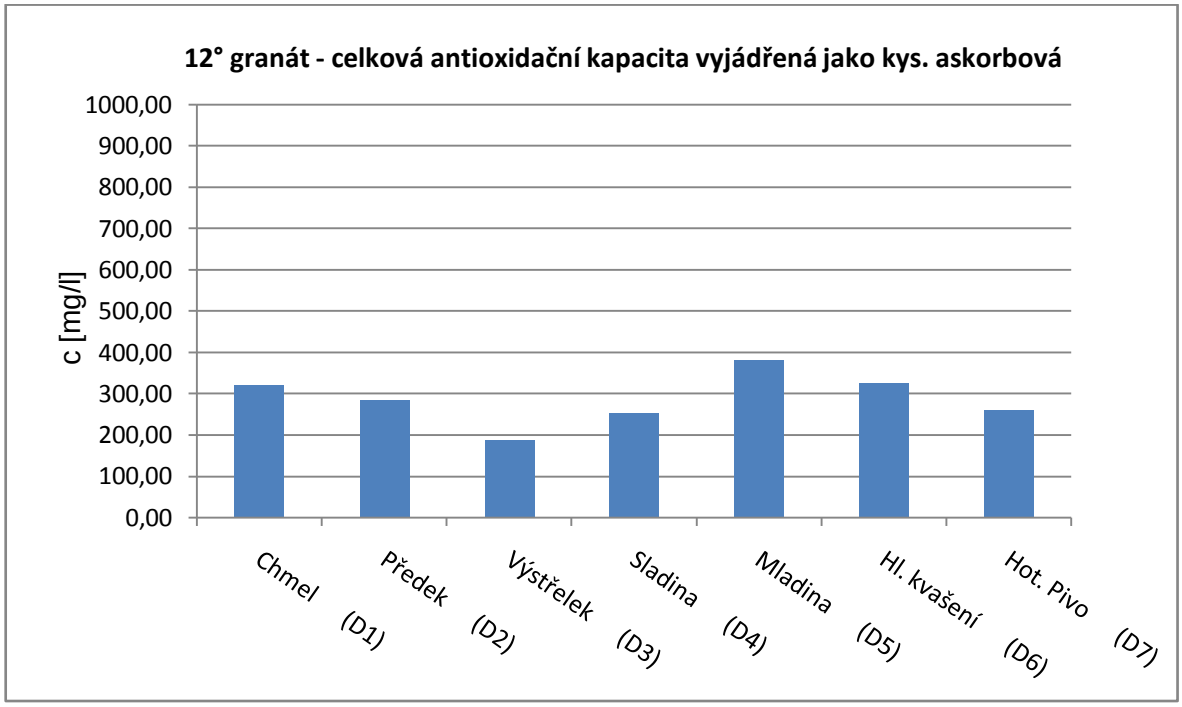



*Obr. 7. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 13° polotmavá*

Na obrázku (Obr. 6) je graficky znázorněna celková antioxidační aktivita 12° piva. Zde je patrné, že příspěvek chmele (B1) k antioxidační aktivitě je výraznější než u 10° piva, vzhledem k vyšší dávce chmele, a to v obsahu hořkých isosloučenin 30 mg/l v hotovém pivu. Antioxidační kapacita předku (B2), výstřelku (B3) a sladiny (B4) u 12° piva je stejnoměrně vyšší než u 10° piva. Mladina (B5) opět vykazuje nejvyšší antioxidační kapacitu.

Polyfenoly se během hlavního kvašení vylučují z roztoku a jejich obsah klesá v průměru o 20 až 30 % v porovnání s mladinou [2]. Tím se částečně vysvětluje snížení antioxidační kapacity vzorku piva po hlavním kvašení. Celková antioxidační kapacita 13° polotmavého piva (Obr. 7) je všech fázích výroby ve srovnání s 10° světlým a 12° pivem vyšší. Vhle-

dem k většímu sypání na várku, a tím pádem vyššímu obsahu antioxidačních látek přecházejících ze sladu do piva, se tato skutečnost dala předpokládat.




*Obr. 8. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 12° granát*

Zcela jiné je srovnání celkových antioxidačních kapacit 12° světlého piva (Obr. 6) a 12° piva granát (Obr. 8), kde u 12° piva granát jsou hodnoty celkové antioxidační kapacity ve všech fázích výroby nižší, což může být způsobeno nižší extraktivností bavorského sladu.

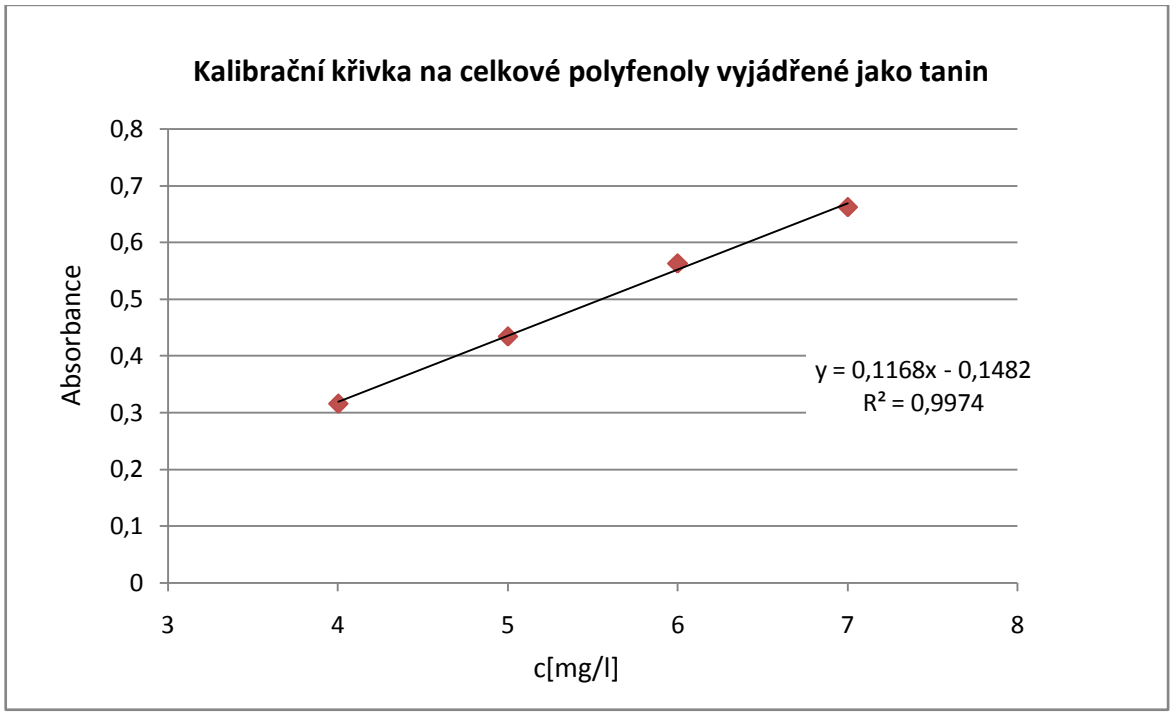
## 6.2 Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteau

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení barevných produktů reakce hydroxylových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin-Ciocalteau. Metoda a postup byly podrobněji popsány v experimentální části (kapitola 5.3.1.). Pro stanovení celkových polyfenolů byly použity stejné vzorky jako u celkové antioxidační kapacity.

### *Kalibrační křivka na tanin*

Podle předpokládaného obsahu polyfenolů byla hledána optimální koncentrace kalibračních roztoků taninu a optimální ředění vzorků piva, tak aby se absorbance při spektrofotometrickém stanovení, pohybovala v rozmezí hodnot 0 až 1. Bylo provedeno několik pokusných stanovení. Postupným odzkoušením různých koncentrací taninu v roztoku se ukázalo, že optimální koncentrace kalibračních roztoků taninu je 4, 5, 6 a 7 mg/l. A ředění vzorků piva v poměru 1:99 destilovanou vodou.

Zjištěná závislost absorbance na koncentraci taninu je znázorněna na obrázku (Obr. 9.).



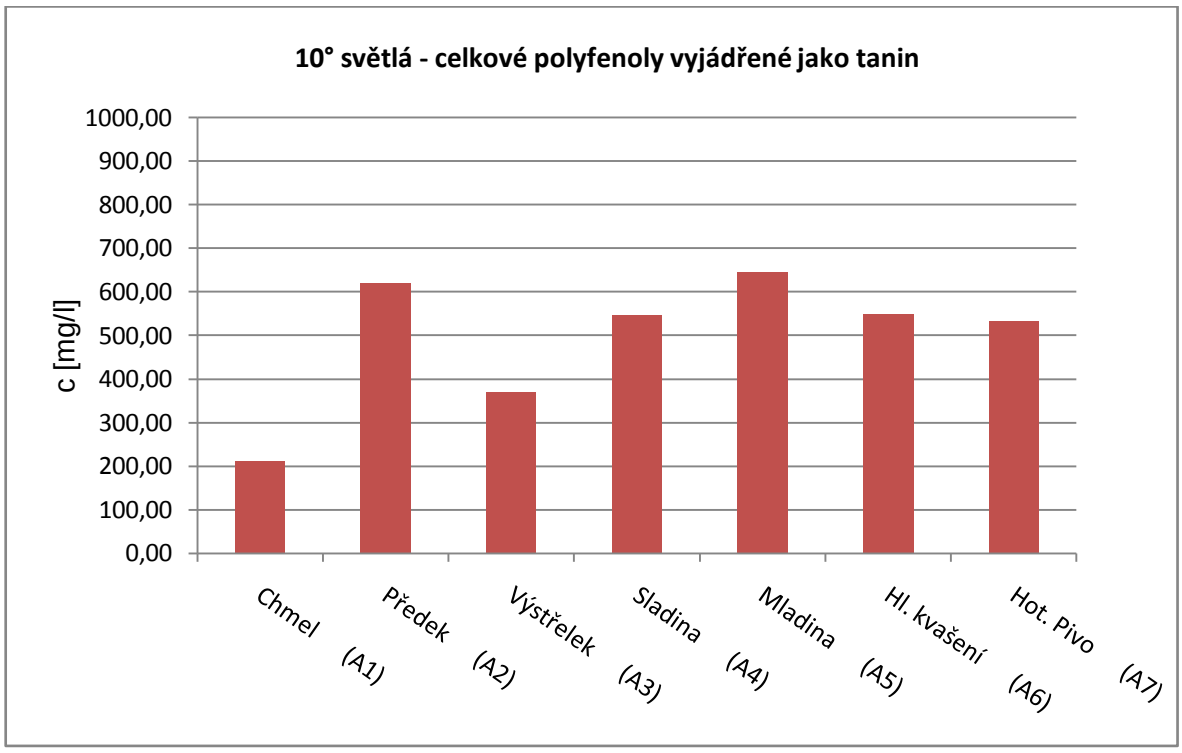

*Obr. 9. Závislost absorbance na koncentraci taninu*

### *Stanovení celkových polyfenolů piva*

Pro stanovení obsahu celkových polyfenolů byly, připraveny a měřeny vzorky čtyř druhů piv (10° světlá, 12° světlá, 13°polotmavá, 12° granát) z různých fází technologického procesu výroby piva (předek, výstřelek, sladina, mladina, hlavní kvašení, ležení). K tomu byly připraveny výluhem vzorky chmele. Celkově bylo měřeno 28 vzorků. Přehled vzorků znázorňuje tabulka. (Tab. 8). Současně s každou novou sérií stanovení byla provedena kalibrace na celkové polyfenoly vyjádřené jako tanin v $mg.l^{-1}$ (obr. 9).

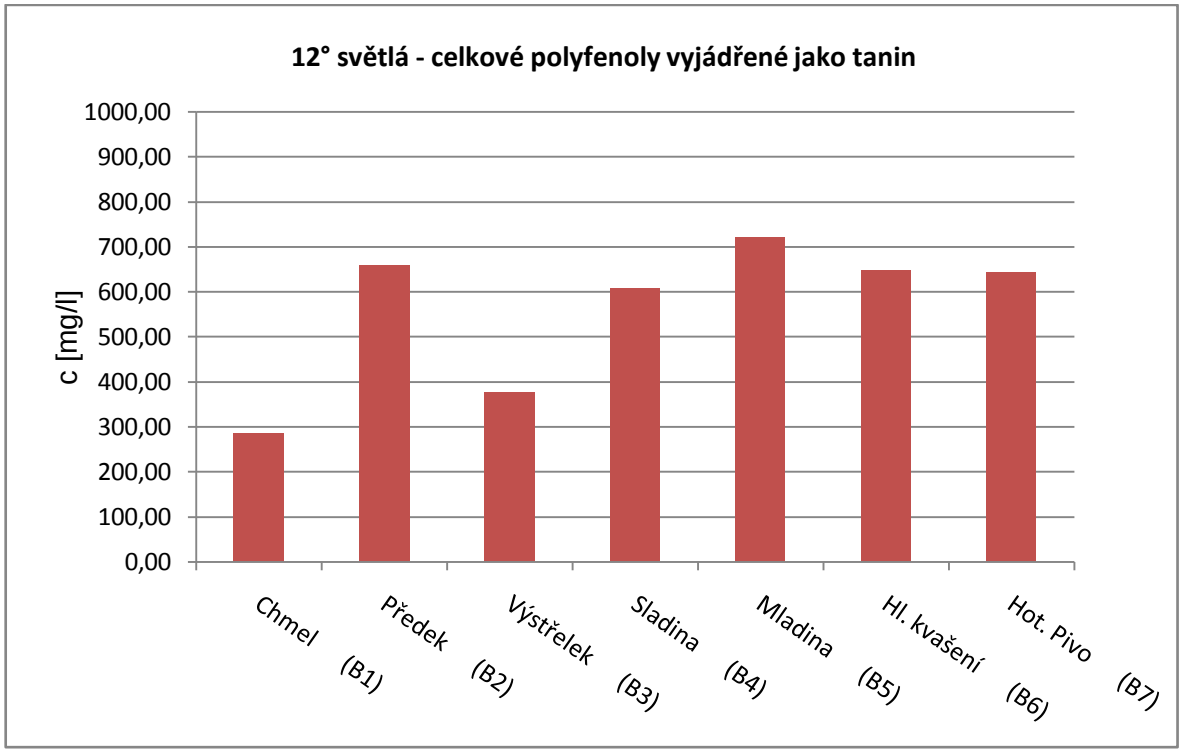
Absorbance studovaných vzorků byla pomocí rovnice regresní kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci taninu vyjádřená jako množství taninu v mg na litr.

Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno v čase t = 120 minut od začátku reakce. Každý vzorek byl paralelně připraven a stanoven třikrát. Z těchto hodnot byly vypočítány podle rovnice regresní křivky celkové polyfenoly vyjádřené jako tanin v $mg.l^{-1}$. Nakonec byla vypočtena průměrná hodnota.



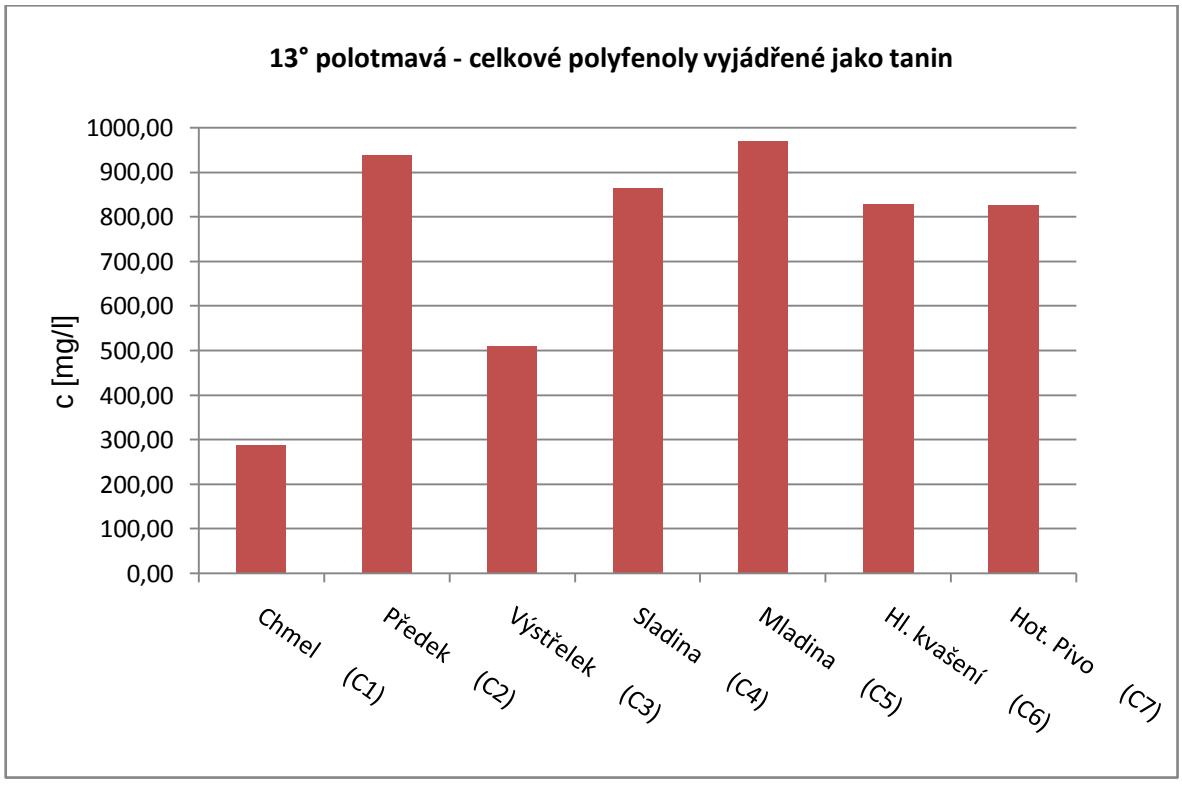

*Obr. 10. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 10° světlá*

Výsledné hodnoty stanovení spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteau jsou graficky znázorněny na obrázku (Obr. 10), kde je patrné, že do 10° světlého piva přechází podstatně více polyfenolů ze sladu než z chmele (A1). Nejvyšší obsah polyfenolů při výrobě má mladina (A5), která obsahuje jak extraktivní látky sladu, tak i extraktivní látky chmele po chmelovaru. Dále je patrné, že obsah celkových polyfenolů se po hlavním kvašení (A6) snížil minimálně a během dokvašování a zrání v ležáckém tanku se téměř nezměnil, jako tomu bylo u celkové antioxidační kapacity, stále dosahuje vyšších hodnot vzhledem k celému průběhu výrobního procesu.



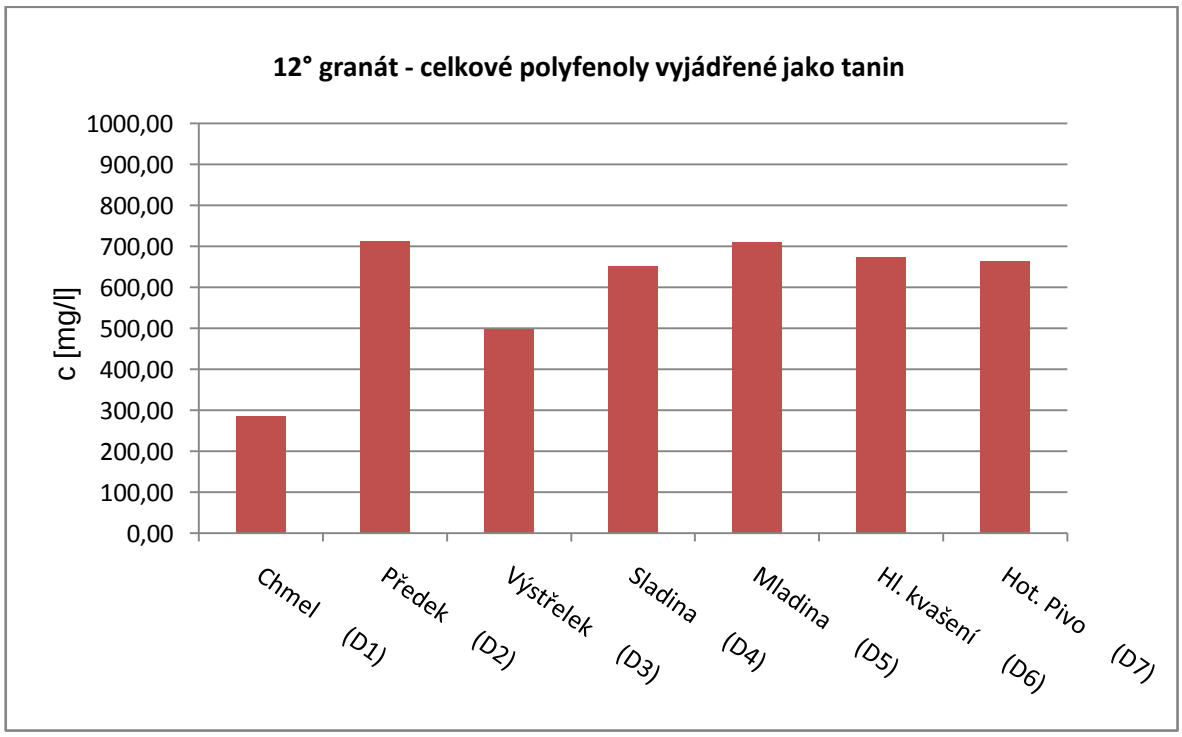

*Obr. 11. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 12° světlá*

.




*Obr. 12. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 13° polotmavá*

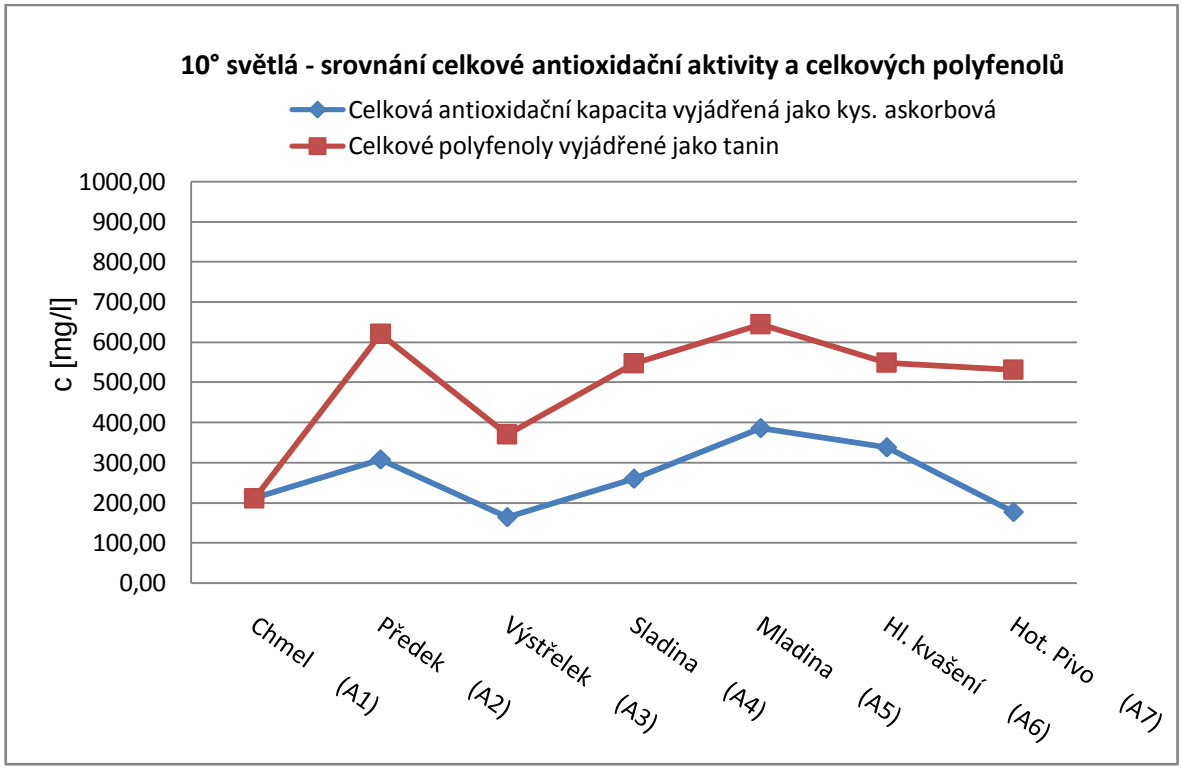
Na obrázku (Obr. 11) jsou graficky znázorněny hodnoty celkových polyfenolů u 12° piva z jednotlivých stupňů výroby piva.



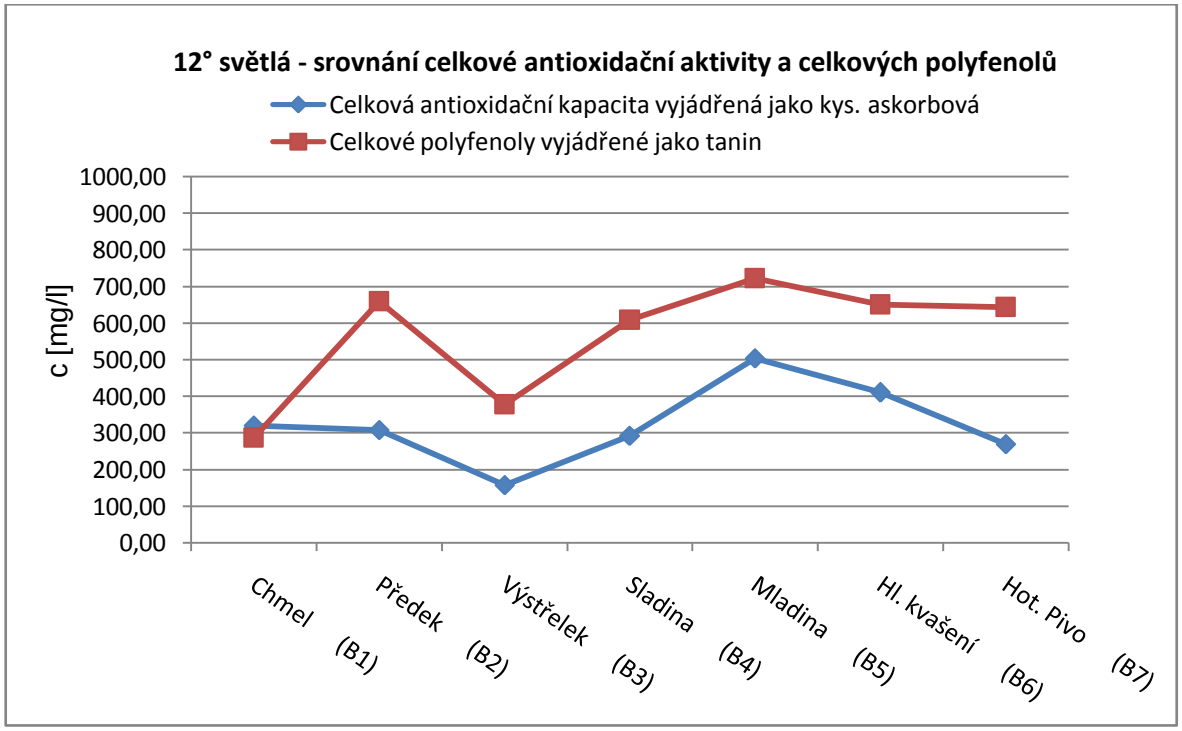

*Obr. 13. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 12° granát*

Výrazně vyšší hodnoty obsahu polyfenolů jsou patrné u 13° polotmavého piva (Obr. 12), Rozdíl hodnot mezi 12° světlým pivem a 13° polotmavým pivem je větší než rozdíl hodnot mezi 10° světlým pivem a 12° světlým pivem. Z tohoto poznatku se může usuzovat že obsah polyfenolů v tmavších a nakuřovaných sladech je vyšší.

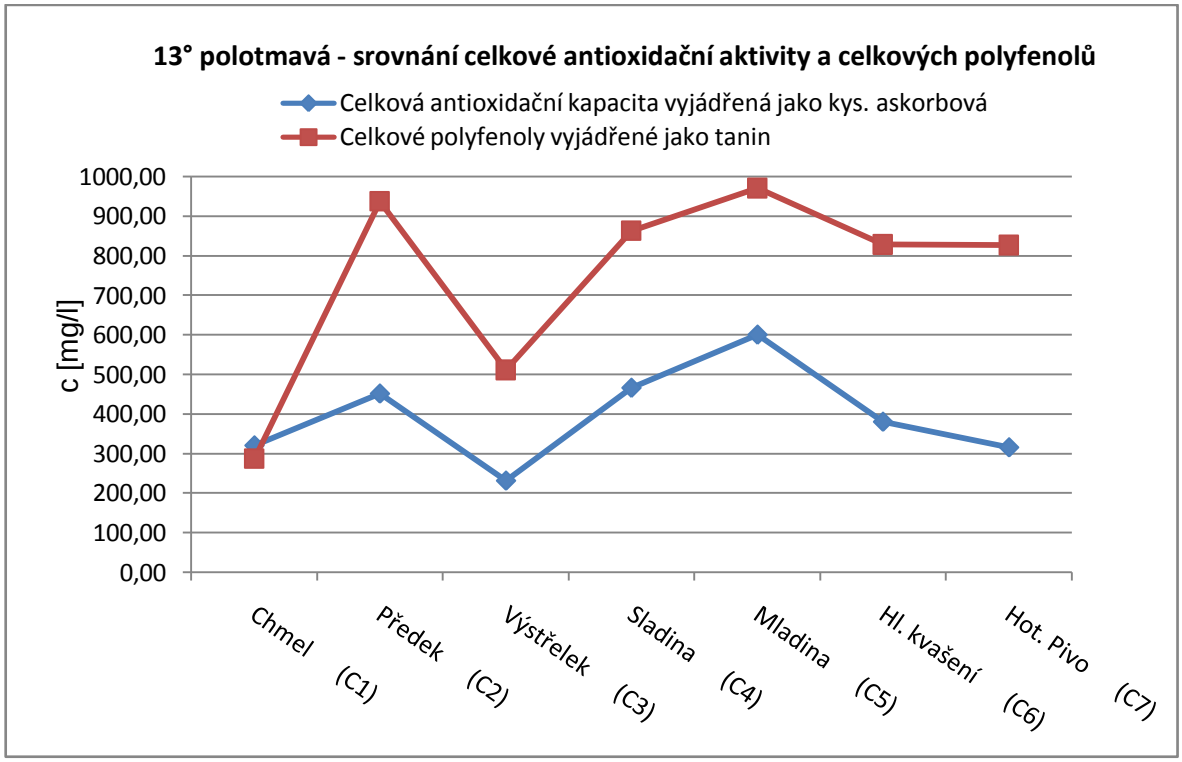
Obsah polyfenolů 12° světlého piva a 12° granát (Obr. 13) se výrazně neliší. Na obsah polyfenolů v pivu má vliv i způsob skladování sladu a chmele a technologický postup. Záleží na stáří a na míře změn, které proběhly již při skladování.



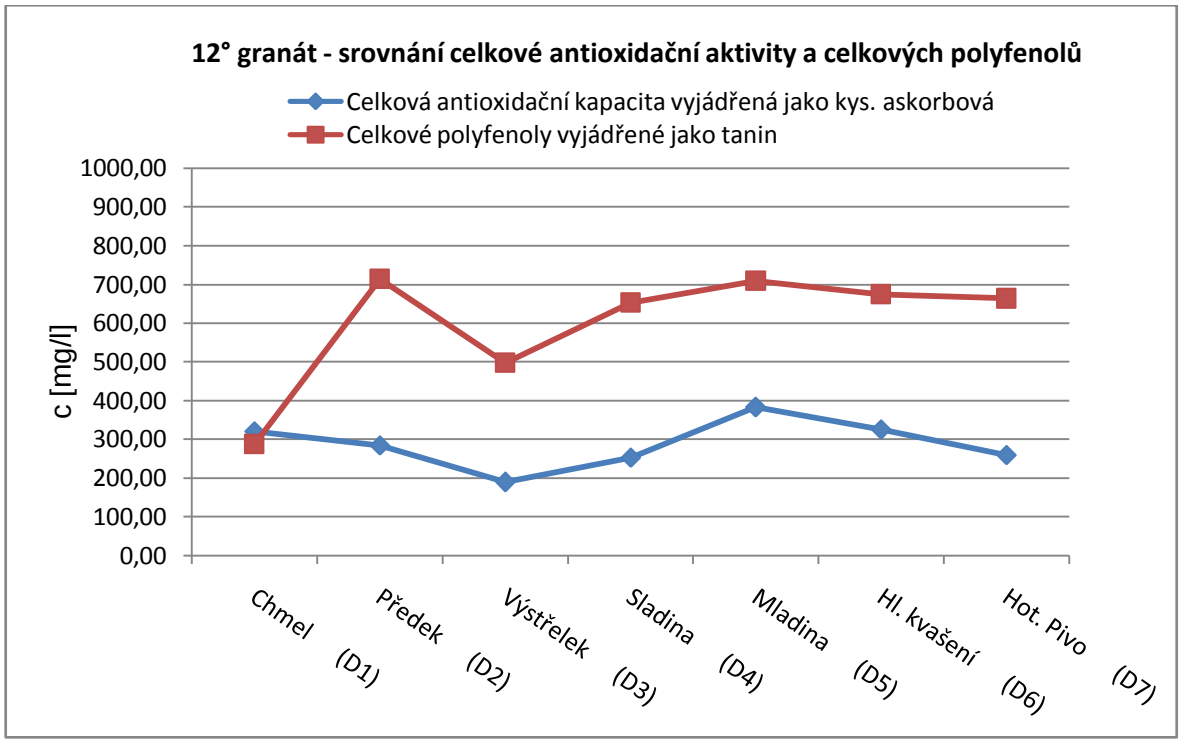

*Obr. 14. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 10° světlá*



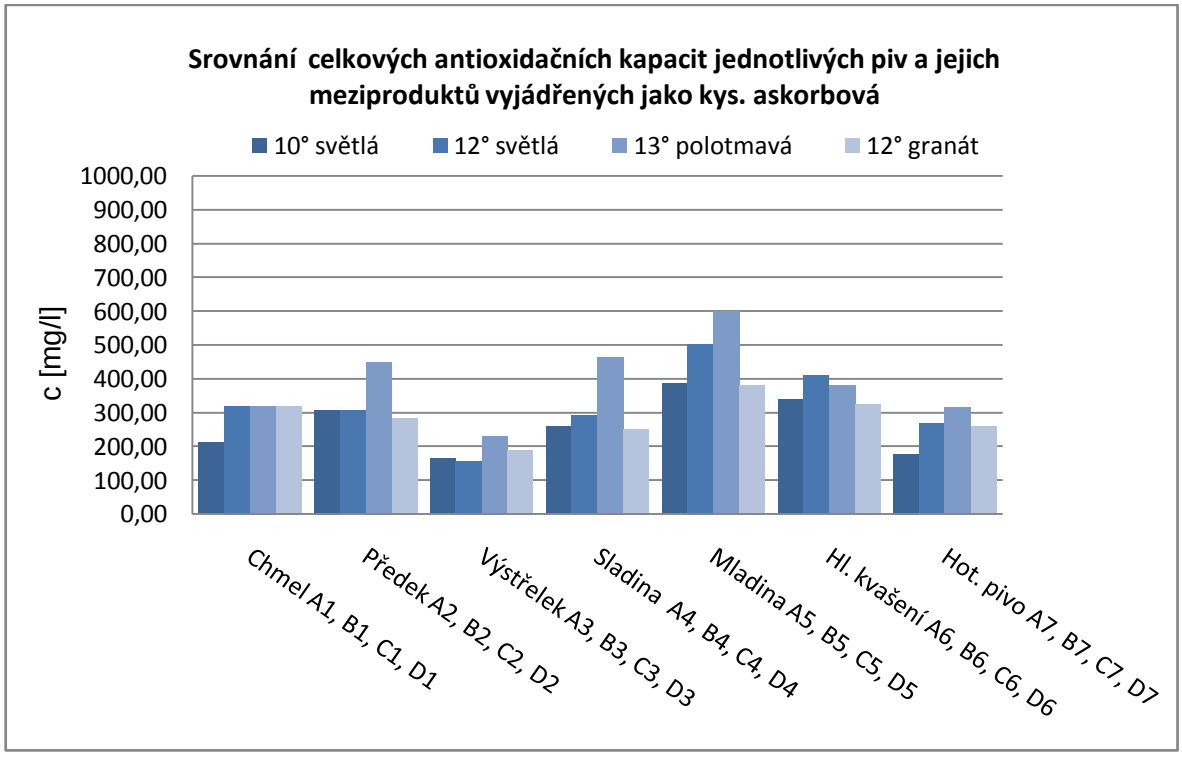

*Obr. 15. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 12° světlá*



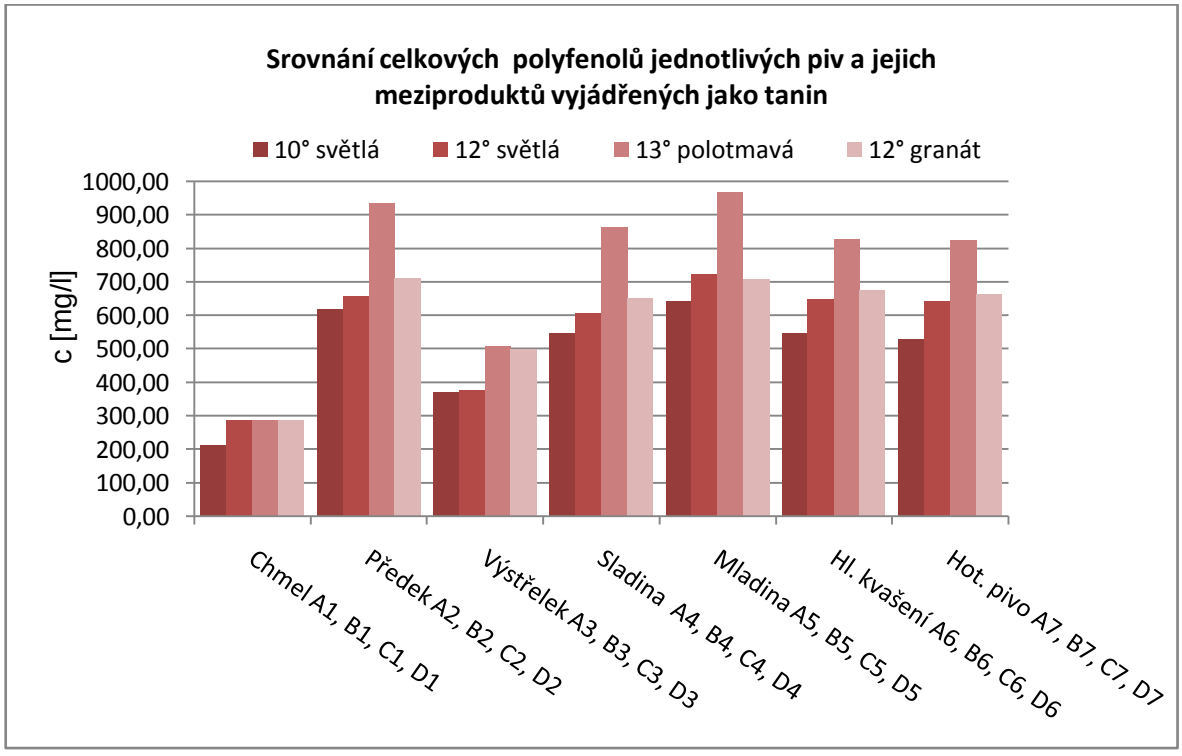

*Obr. 16. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 13° polotmavá*




*Obr. 17. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 12° granát*




*Obr. 18. Srovnání celkových antioxidačních kapacit piv a jejich mezistupňů*




*Obr. 19. Srovnání obsahů celkových polyfenolů jednotlivých piv a jejich mezistupňů*

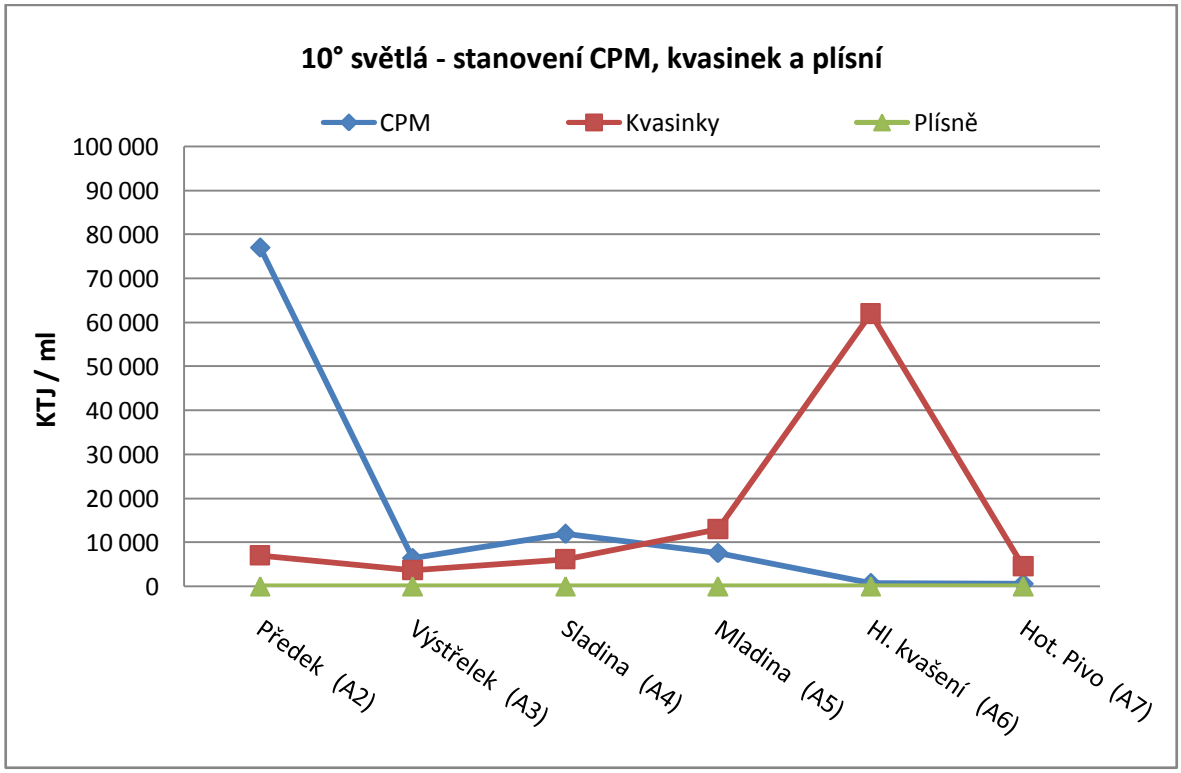
## 6.3 Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní

Pro mikrobiologický rozbor stanovení celkového počtu mikroorganizmů, kvasinek a plísní byly vybrány vzorky sladu, chmele a vzorky čtyř druhů piv (10° světlá, 12° světlá, 13° polotmavá a 12° granát) z různých fází technologického procesu (předek, výstřelek, sladina, mladina, hlavní kvašení a hotové pivo). Po určité době potřebné pro růst mikroorganismů, kvasinek a plísní na živných půdách, se vyhodnotily počty narostených kolonií na miskách podle vzorce (2). V tabulce (Tab. 11) jsou znázorněny průměrné hodnoty mikrobiologického rozboru sladu a chmele. Z tabulky je patrné, že nejvyšší míra mikrobiologické kontaminace přechází do piva se sladem, ta se však se zvyšující se teplotou snižuje.

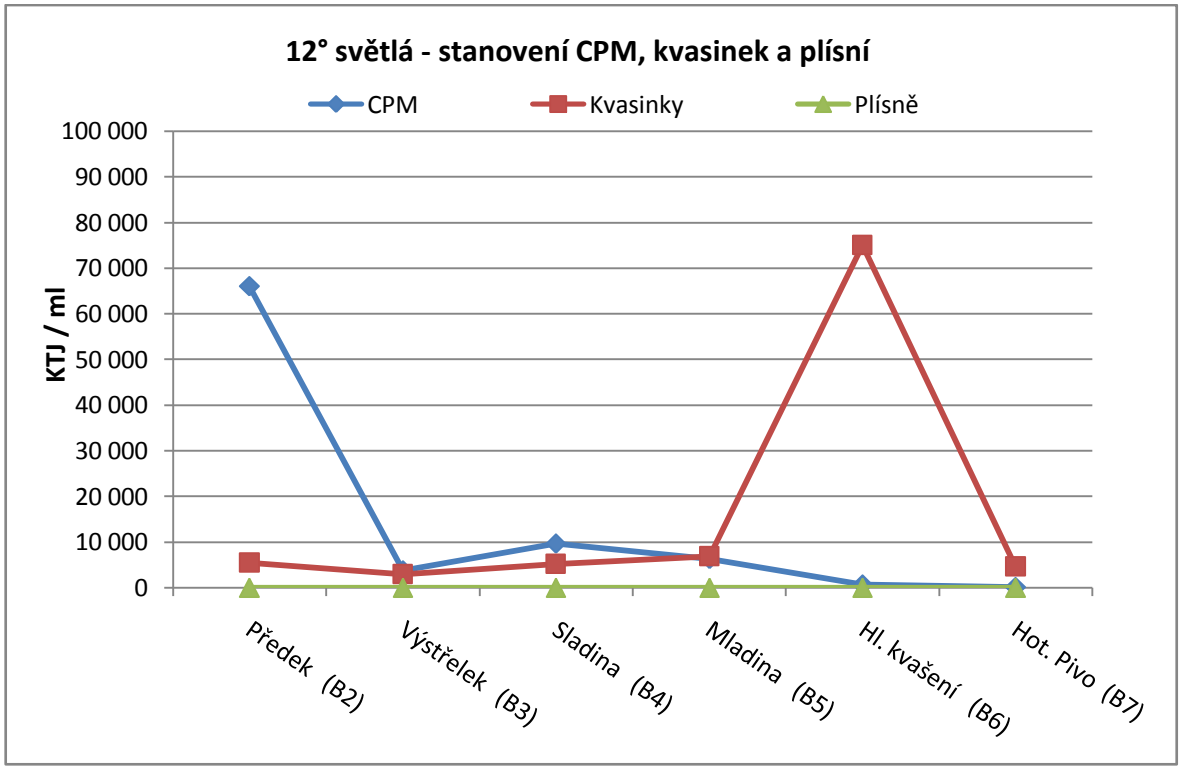
*Tab. 11. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – sladu a chmele*

| Vzorek | CPM [KTJ.g$^{-1}$] | Kvasinky [KTJ.g$^{-1}$] | Plísně [KTJ.g$^{-1}$] |
|---|---|---|---|
| **Slad** | 64 000 | 8 200 000 | 1 200 |
| **Chmel** | 4 300 | 3 000 | 55 |

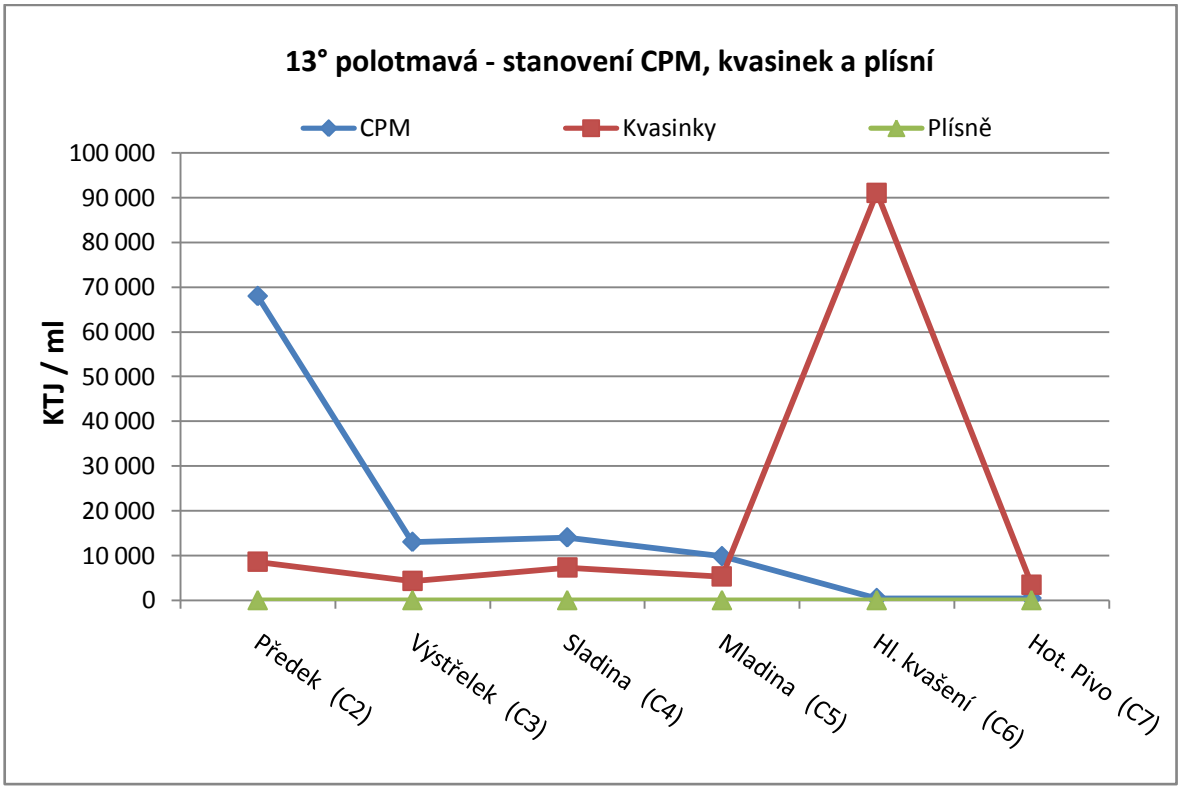
Po uplynutí potřebné doby pro růst mikroorganismů, kvasinek a plísní u vybraných vzorků piv z různých fází výrobního procesu se podle vzorce (2) vyhodnotily počty narostených kolonií na miskách. Vývoj mikrobiologického obrazu jednotlivých piv 10° světlá (Obr. 20), 12° světlá (Obr. 21), 13° polotmavá (Obr. 22) a 12° granát (Obr. 23) ukazuje, že se od sebe výrazně neliší a mají podobný průběh. Rychle se snižující obsah nežádoucích mikroorganizmů, pro které se během rmutování vytváří nepříznivé podmínky (vyšší teplota a nižší pH). Po hlavním kvašení se sníží obsah živin (sacharidy, dusíkaté látky, obsah kyslíku) pro mikroorganizmy a jejich množství se sníží minimum. Tento proces pokračuje i během dokvašování. Ve vzorcích piva je nulový počet plísní. Dále je ve vzorcích piva předpokládaný obsah kvasinek, které dosahují vrcholu po zakvašení a při dokvašování se taky sníží na nízkou úroveň.



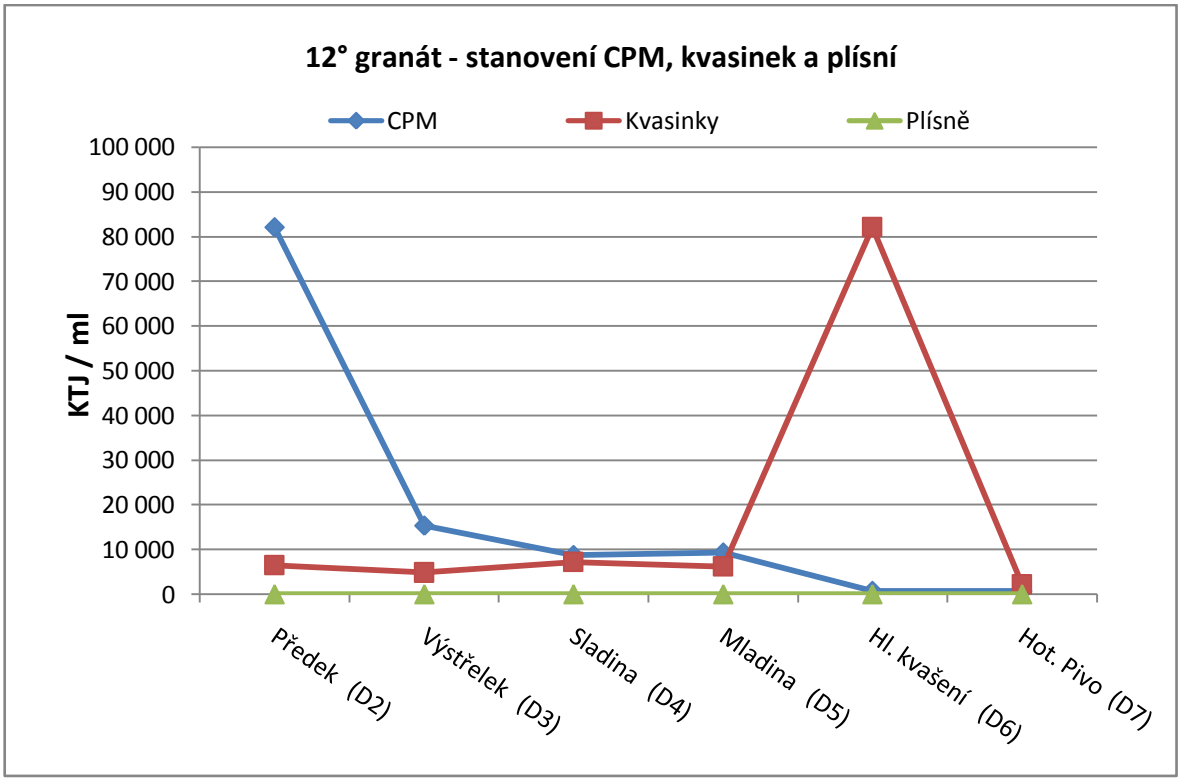

*Obr. 20. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 10° světlá*




*Obr. 21. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 12° světlá*




*Obr. 22. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 13° polotmavá*




*Obr. 23. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 12° granát*

# ZÁVĚR

Suroviny pro výrobu piva jsou bohaté na antioxidační a polyfenolické látky, které přecházejí do varného procesu. Procházejí různými změnami během varného procesu a dostávají se až do hotového piva. Cílem této práce bylo stanovit celkovou antioxidační kapacitu a celkové polyfenoly vybraných vzorků piv (10° světlá, 12° světlá, 13° polotmavá a 12° granát) z různých fází technologického procesu (předek, výstřelek, sladina, mladina, hlavní kvašení a hotové pivo) a vzorek chmele. Dále doplnit chemické analýzy jednoduchými mikrobiologickými rozbory.

U analyzovaných vzorků byla stanovena celková antioxidační kapacita metodou DPPH spektrofotometricky. Metoda je založena na reakci syntetického radikálu s antioxidanty ve vzorcích, kde se spektrofotometricky stanovuje úbytek absorbance. Výsledné hodnoty jsou kvantitativně přepočteny na kyselinu askorbovou v $mg.l^{-1}$. Nejvyšších hodnot u vybraných vzorků dosahovala mladina, do které přecházely antioxidační látky jak sladu, tak i chmele po chmelovaru. Po hlavním kvašení ve spilce a dokvašování v ležáckých tancích se celková antioxidační kapacita postupně snižovala.

Pro stanovení celkových polyfenolů byla použita metoda Folin- Ciocalteauovým činidlem se spektrofotometrickým stanovením. Principem této metody je spektrofotometrické stanovení barevných produktů reakce hydroxylových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin-Ciocalteau. Výsledné hodnoty jsou kvantitativně přepočteny na tanin v $mg.l^{-1}$. Nejvyšších hodnot dosahovala opět mladina. Obsah celkových polyfenolů se však po hlavním kvašení ve spilce a po dokvašování v ležáckých tancích snížil nepatrně oproti celkové antioxidační kapacitě. Největší podíl antioxidačních a polyfenolických látek přecházejících do piva pochází ze sladu.

U všech vzorků byly provedeny jednoduché mikrobiologické rozbory na celkový počet mikroorganizmů, kvasinek a plísní. Použity byly dva druhy agaru. Agar PCA pro stanovení celkového počtu mikroorganizmů a agar PDA pro stanovení kvasinek a plísní. Nejvyšší míru mikrobiologické kontaminace přechází do piva se sladem, ta se však se zvyšující se teplotou snižuje. Po hlavním kvašení, kdy se snižuje pH a extrakt se mění na alkohol a dokvašování, kdy se pivo sytí oxidem uhličitým, se obsah nežádoucích mikroorganizmů snižuje na minimum.

Obsah polyfenolických antioxidačních látek surovin pro výrobu piva je závislý na mnoha faktorech jako jsou vybraná odrůda chmele a sladu, vliv faktorů na růst rostliny, podmínky při zpracování a skladování, zvolené technologii výroby atd.

Využití těchto poznatků změny antioxidační kapacity a změny obsahu celkových polyfenolů během technologického procesu umožní přizpůsobit výrobní proces tak, aby ve finálním výrobku byl zachován co nejvyšší obsah antioxidačních a polyfenolických látek, které jsou důležité jak pro samotnou výrobu, tak i pro zdraví člověka. Dále se uplatní při konstrukci nových technologií a zavádění nových technologických procesů výroby piva.

# SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] RYCHTERA, M.: Bioinženýrství kvasných procesů. 1. vyd. Praha: SNTL, 1985, 154 s.

[2] BASAŘOVÁ, G., ŠAVEL, J., BASAŘ, P., LEJSEK, T.: Pivovarství – teorie a praxe výroby piva, VSCHT Praha, 1. Vydání, 904 s.

[3] CHLÁDEK, L.: Pivovarnictví. 1.vyd. Praha: Grada, 2007, 207 s., ISBN 978-80-247-1616-9.

[4] KOSAŘ, K.: Technologie výroby sladu a piva, 1. Vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. 398 s., ISBN 80-902658-6-3.

[5] HLAVÁČEK, F., LHOTSKÝ, A.: Pivovarství. 2. Vyd., Praha: SNTL, 1972. 540 s.

[6] Analitica-Microbiologica-EBC: European Brewery Convention: EBC Analytica-Microbiologica 2005. 2. Vydání Nürnberg: Fachverlag Hans Carl. [CD-ROM], ISBN 3-418-00780-5.

[7] BASAŘOVÁ, G., VERNEROVÁ, J., ŠEVČÍK, L., JANOUŠEK, J.: Vliv kmene kvasnic, teploty, tlaku a způsobu zakvašování na tvorbu oxidu siřičitého. Kvasný Prům. 1977, 43(6), 164-167.

[8] THIELE, F., BACK, W.: Influence of yeast vitality and fermentation parameters on the formativ of yeast metabolities. Eur.Brew.Conv.: Proc. 31st Congress, Venice 2007 [CD-ROM], příspěvek 34, 309-322 Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2007. ISBN 978-90-70143-24-4.

[9] JENKINS, C., WOOD, D. A., GILL, T., SPEERS, A.: Impact of malted barley quality and wort composition on the occurrence of premature yeast floculation. Eur.Brew.Conv.: Proc. 30th Congress, Prague 2005 [CD ROM], příspěvek 40, 354-358. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl 2005. ISBN 90-70 143-23-2/ISBN 978-90-70 143-23-7.

[10] BALLING, C. J. N: Die Gärungschemie wissenschaftlich begründet, 3. Vydání, Verlag von Friedrich Tempsky, Prag 1865.

[11] MOLL, M.: Beer & Coolers, English ed. Andover Hampshire: Intercept LTD, 1994, 495p. ISBN 1-898 298-2.

[12] BAMFORTH, C. W.: The science and understanding of the flavon stability of beer: a critical assessment. Brauwelt Int. 1999, 17, 98-110.

[13] BASAŘOVÁ, G., ČEPIČKA, J.: Sladařství a pivovarství, 2. vyd. Praha: SNTL, 1985. 256 p.

[14] ŠAVEL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1980. 184 s. ISBN 04-822-80.

[15] SPICHER, G.: Schimmelpilze an Getreide und ihre Bedeutung für die Qualität unter besonderer Berücksichtigung der Braugerste. Monatsschr. Brauwiss. 1989, 42(2), 66-75.

[16] MALÍŘ, F., PSOTA, V., ROUBAL, T., SEVERA, J., MAREČEK, J., HUBÍK, K.: Plísně a mykotoxiny v cereáliích a pivovarských surovinách, zásady odběru vzorků ke stanovení mykotoxinů. Kvasný Prům. 2001, 47(6), 172-173.

[17] LIN, Y.: Detection wild yeast in the brewery efficiency of differential media. J. Inst. Brew. 1975, 81(5), 410-417.

[18] MARTIN, C. P., SIEBERT, K. J.: Evaluation of multinitrogen source media for wild yeast detection in brewing culture yeast. J. Am. Soc. Brew., Chem. 1992, 50(4), 134-138.

[19] SAKAMOTO, K., KONINGS, W.: Beer spoilage bakteria and hop resistence. International Journal of Food Microbiology, 2003. Vol. 89.p.105-124.

[20] JESPERSEN, L., JAKOBSEN, M.: Specific spoilage organismus in breweries and laboratory media for their detection. Internacional Journal of Food Microbiology, 1996. Vol. 33.p. 139-155, ISSN 0168-1605.

[21] O´SULLIVAN, T. F., WALSH, Y., O´MAHONY, A., FITZGERALD, G. F., SINDEREN VAN, D.: A komparative study of malthouse and brewhouse microflora. J. Inst. Brew. 1999, 105(1), 55-61.

[22] SMITH, N. A., SMITH, P.: The role of *Bacillus* spp. In N-nitrosamine formativ during wort production. J. Inst. Brew. 1992, 98(5), 409-414.

[23] CALDERBANK, J., HAMMOND, J. R. M.: Influence of nitrate and bacterial contamination on the formativ of apparent total N-nitrosocompounds (ATNC) during fermentation. J. Inst. Brew. 1989, 95(3), 277-281.

[24] MAGNUS, C. A., INGLEDEW, W. M., CASEY, G. P.: High-Gravity Brewing: influence of high-ethanol beer on the viability of contaminating brewing bakteria. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1986, 44(4), 158-160.

[25] RYCHTERA, M.: Bioinženýrství kvasných procesů. 1.vyd. Praha: SNTL, 1985, 154 s.

[26] ČEPIČKA, J., KARABÍN, M.: Polyfenolové látky piva - přirozené antioxidanty. Chemické listy, 2002, roč. 96, č. 2, s. 90-95. ISSN 1213-7103-009-2770.

[27] BLASA, M., CANDIRACCI, M., ACCORSI, A., PIACENTINI, M. P., PIATTI, E.: Honey flavonoids as protection agents against oxidative demage to human red blood cells, Food Chemistry 104, p. 1635-1640,2007.

[28] ČÍŽKOVÁ, H., DOSTÁLEK, P., FIALA, J., KOLOUCHOVÁ, I.: Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva. Chemické listy, 2006, roč. 100, č. 7, str. 478-485. ISSN 1213-7103-009-2770.

[29] WILHELMSON, A., VAINIKKA, M., HOME, S.: Studies on the survival of amylose-lipid complexes under mashing conditions. Eur. Brew. Conv.: Proc. 26th, Maastricht 1997, 291-298, příspěvek 35. Oxford: IRL Press 1997. 771 p. ISBN 019 963 690 7.

[30] NARZISS, L.: Die Bierbrauerei, Vol. 2: Die Technologie der Würzebereitung, 6. Auflage. Stuttgart: F. Enke Verlag, 1985. 385 p. ISBN 3-432-85006-9.

[31] KOLBACH, P.: Zur Kontrolle der Maischarbeit, Monatsschr. Brauerei 1959, 12, 77-1.

[32] HULÍN, P., DOSTÁLEK, P., HOCHEL, I.: Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. Chem. Listy 2008, 102, 327-337.

[33] MASÁK, J.: Biochemické principy filtrovatelnosti piva. Doktorská disertační práce, VŠCHT Praha, 1998, 172 p.

[34] VELÍŠEK, J.:Chemie potravin. Praha: OSSIS, 1999, I. svazek 328 s., ISBN 80-902391-3-7. 2. svazek 304 s. 80-902391-4-5. 3.svazek, 342 s. ISBN 80-902391-5-3. Soubor ISBN 80-902391.

[35] BAMFORTH, C. W.: β-Glucanases in malting and brewering: practical aspects. Brew. Dig. 1994, (5), 12-16,21.

[36] AMMES, B. J.: Lipids in malt. J. Inst. Brew. 1984, 90,315-318.

[37] BASAŘOVÁ, G., BLÁHA, M. VESELÝ, P.: Vliv kmene kvasnic na senzorickou stabilitu piva. Kvasný průmysl 2003, 49(1), 3-9.

[38] ŠROGL, J., KOSAŘ, K., MIKIYŠKA, L., BOUŠOVÁ, P.: Changes occurring in polyphenol substances kontent during wort production. Eur. Brew. Conv.: Proc.

26th Congress, Maastricht 1997, 275-282, příspěvek 33. Oxford: IRL Press, 1997. 771 p. ISBN 0 19 963690 7.

[39] BASAŘOVÁ, G. a kol.: Pivovarsko sladařská analytika. Praha: Merkanta, s.r.o., 1. díl, 1992,388 p., 2. díl 1993, 248 p., 3. díl 1993, 199 p.

[40] SHARPE, F. R., LAWS, D. R. J.: The Essentials oil of hops, a review. J. Inst. Brew. 1981, 87 (2), 96-107.

[41] PEPPARD, T. L., LAWS, D. R. J.: Hop derived sulphur compounds and thein effect on beer flavon. Eur. Brew. Conv.: Proc 17th Congress, Berlin (West) 1979, 91-104, příspěvek 7. Rotterdamm: Eur. Brew. Conv., 1979. 880 p. ISBN 90 70143 097.

[42] ALBERTS, B.: Základy buněčné biologie buňky, Espero Publishing, 1997, 630 p., ISBN 80-902906-2-0.

[43] DE RIJKE, E.: Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of chromatogramy A, 2006, no. 1112, p. 31-63.

[44] KLOUDA, P.: Moderní analytické metody. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996, 132 s., ISBN 80-902155-0-5.

[45] TSAO, R., DENG, Z.: Separation procedures for naturely occuring antioxidant phytochemicals. Journal of chromatogramy B, 2004, no. 812, p. 85-99.

[46] CARERI, M., MANGIA, A., MUSCI, M.: Overview of the applications of liquid chromatography – mass spectometry interflacing systems in food analysis: naturely occurring substances in food. Journal of Chromatography A, 1998, no. 794, p. 263-297.

[47] ŠTULÍK, K.: Analytické separační metody, Praha: Karolinum, 2004, 264 s., ISBN 80-246-0852-9.

[48] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. Chem. Listy 2004.

[49] FIDLER, M., KOLÁŘOVÁ, L., HOLČAPEK, M.: Analýza antioxidantů v chmelu a pivu, 2007, Univerzita Pardubice.

[50] CANO, A., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., GARCIA-CANOVAS, F., ACOSTA, M., ARNAO, M. B.: Phytochem. Anal. 9, 196 (1998).

[51] VERHAGEN, J. V., HAENEN, G. R. M. M., BAST, A.: J.Agric. Food Chem. 44, 3733 (1996).

[52] KOLEVA, I., NIEDERLÄNDER, H. A. G., VAN BEEK, T. A.: Anal. Chem. 73, 3373 (2001).

[53] YOKOZAWA, T., CHEN, C. P., DONG, E., TANAKA, T., NONAKA, G. I., NISHIOKA, I.: Biochem. Pharmacol. 56, 231 (1998).

[54] ESPIN, J. C., SOLER-RIVAS, C., WICHERS, H. J.: J. Agric. Food Chem. 48, 648 (2000).

[55] DU TOIT, R., VOLSTEED, Y., APOSTOLIDES, Z.: Toxicology 166, 63 (2001).

[56] SHI, H., NOGUCHI, N., NIKI, E., v knize: Methods in Enzymology, str. 157. Academic Press, London 2001

[57] PEDERSEN, C. B., KYLE, J., JENKINSON, A. MC. E., GARDNER, P. T., MC PHAIL, D. B., DUTHIE, G. G.: Eur. J. Clin. Nutr. 54, 405 (2000).

[58] CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R. L.: J. Agric. Food Chem. 44, 3426 (1996).

[59] CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R. L.: Free Radical Biol. Chem. 22, 749 (1997).

[60] OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R. L.: J. Agric. Food Chem. 49, 4619 (2001).

[61] YOSHIOKA, H., OHASHI, Y., AKABOSHI, M., SENBA, Y.: Free Radical Res. 35, 265 (2001).

[62] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E.: Pharm. Pharmacol. Lett. 10, 27 (2000).

[63] HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., ARUOMA, O.I.: Anal. Biochem. 165, 215 (1987).

[64] TSAI, Ch. H., STERN, A., CHIO, J. F., CHERN, CH. L., LIU, T. Z.: J. Agric. Food Chem. 49, 2137 (2001).

[65] DAPKEVICIUS, A., VAN BEEK, T. A., NIEDERLÄNDER, H. A. G.: J. Chromatogr., A. 912, 73 (2001).

[66] TSUDA, T., WATANABE, M., OHSIMA, K., NORINOBU, S., CHOI, S. W., KAWASAKISHI, S., OSAWA, T.: J. Agric. Food Chem. 42, 2407 (1994).

[67] QUINLAN, G. J., HALLIWEL, B., MOORHOUSE, C. P., GETTERIDGE, J. M. C.: Biochim. Biophys. Acta 962, 126 (1988).

[68] YOKOZAWA, T., DONG, E., LIU, Z. W., SHIMIZU, M.: Phytother. Res. 11, 446 (1997).

[69] MATHIESEN, L., MALTERUD, K. E., SUND, R. B.: Planta Med. 61, 515 (1995).

[70] RAPISARDA, P., TOMAINO, A., CASCIO, R. L., BONINA, F., PASCQUALE, A. D., SAIJA, A.: J. Agric. Food Chem. 47, 4718 (1999).

[71] PRATT, D. E., MILLER, E. E.: J. Am. Oil Chem. Soc. 61, 1064 (1984).

[72] DAGLIA, M., PAPETTI, A., GREGOTTI, C., BERTE, F., GAZZANI, G.: J. Agric. Food Chem. 48, 1449 (2000).

[73] NIELSEN, F., MIKKELSEN, B., NILSEN, J. B., ANDERSEN, H. R., GRANDJEAN, P.: Clin. Chem. 43, 1209 (1997).

[74] OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J., DEEMER, E. K.: J. Agric. Food Chem. 50, 1322 (2002).

[75] RAPTA, P., MIŠÍK, V., STAŠKO, A., VRÁBEL, I.: Free Radical Biol. Med. 18, 901 (1995).

[76] MIKYŠKA, A.,KROFTA, K.: Aplikace moderních metod stanovení antioxidační aktivity k hodnocení kvality chmele a senzorické stability piv, výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Žatec, 2007, 43s.

[77] ZLOCH, J., ČELAKOVSKÝ, A., AUJEZDSKÁ, A.: Stanovení polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu, Ústav hygieny Lékařské fakulty UK, Plzeň, 2004.

# SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|---|---|
| ABTS | 2,2´-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfát). |
| CPM | celkový počet mikroorganismů |
| CE | kapilární elektroforéza |
| CL | chemiluminiscence |
| DPPH | 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil |
| EBC | European Brewery Convention. |
| FRAP | ferric reducting antioxidant potencial |
| GL | plynová chromatografie |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| MS | hmotnostní spektrometr |
| MSPD | disperze matrice na pevné fázi |
| ORAC | oxygen radical absorbance capacity |
| PCA | agarové živné medium pro mikroorganismy - plate count agar |
| PDA | agarové živné médium pro kvasinky a plísně - potato dextrose agar |
| SPE | extrakce pevnou fází |
| SPME | mikroextrakce pevnou fází |
| TLC | chromatografie na tenké vrstvě |
| j. W.K | diastatická mohutnost vyjadřující enzymový potenciál sladu. |
| UV/VIS | ultrafialové a viditelné spektrum |

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Struktura Amylózy……29

Obr. 2. Struktura amylopektinu……31

Obr. 3. Volný radikál DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil)…….57

Obr. 4. Závislost úbytku absorbance na koncentraci kyseliny askorbové…….66

Obr. 5. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 10° světlá… ……66

Obr. 6. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 12° světlá… ……67

Obr. 7. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 13° polotmavá ……68

Obr. 8. Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako kyselina askorbová – 12° granát… ……69

Obr. 9. Závislost absorbance na koncentraci taninu……70

Obr. 10. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 10° světlá ……71

Obr. 11. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 12° světlá……72

Obr. 12. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 13° polotm……72

Obr. 13. Obsah celkových polyfenolů vyjádřených jako tanin – 12° granát……73

Obr. 14. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 10° světlá……74

Obr. 15. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 12° světlá……74

Obr. 16. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 13° polotmavá……75

Obr. 17. Srovnání celkové antioxidační kapacity a obsahu celkových polyfenolů – 12° granát……75

Obr. 18. *Srovnání celkových antioxidačních kapacit piv a jejich mezistupňů* ……76

Obr. 19. Srovnání obsahů celkových polyfenolů jednotlivých piv a jejich mezistupňů……76

Obr. 20. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 10° světlá…..……..……78

Obr. 21. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 12° světlá …….……..78

Obr. 22. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 13° polotmavá……..……...….79

Obr. 23. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – 12° granát ……..…….79

# SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Sacharidy piva..……..24

Tab. 2. Nejvýznamnější vitaminy piva.……..27

Tab. 3. Běžné hodnoty světlého sladu plzeňského typu a tmavého sladu mnichovského typu……...……...…...…….……...30

Tab. 4. Obsah polyfenolů ve frakcích sladového šrotu…...……...36

Tab. 5. Průměrné složení chmele..….....……...36

Tab. 6. Obsah analogů v α-hořké kyselině.....…….38

Tab. 7. Obsah analogů v β-hořké kyselině…….38

Tab. 8. Přehled a značení vzorků……...……56

Tab. 9. Kalibrační roztoky kyseliny askorbové …….59

Tab. 10. Přehled objemů kalibračních roztoků……..……..62

Tab. 11. Stanovení CPM, kvasinek a plísní – sladu a chmele ……...……..77

# SEZNAM PŘÍLOH

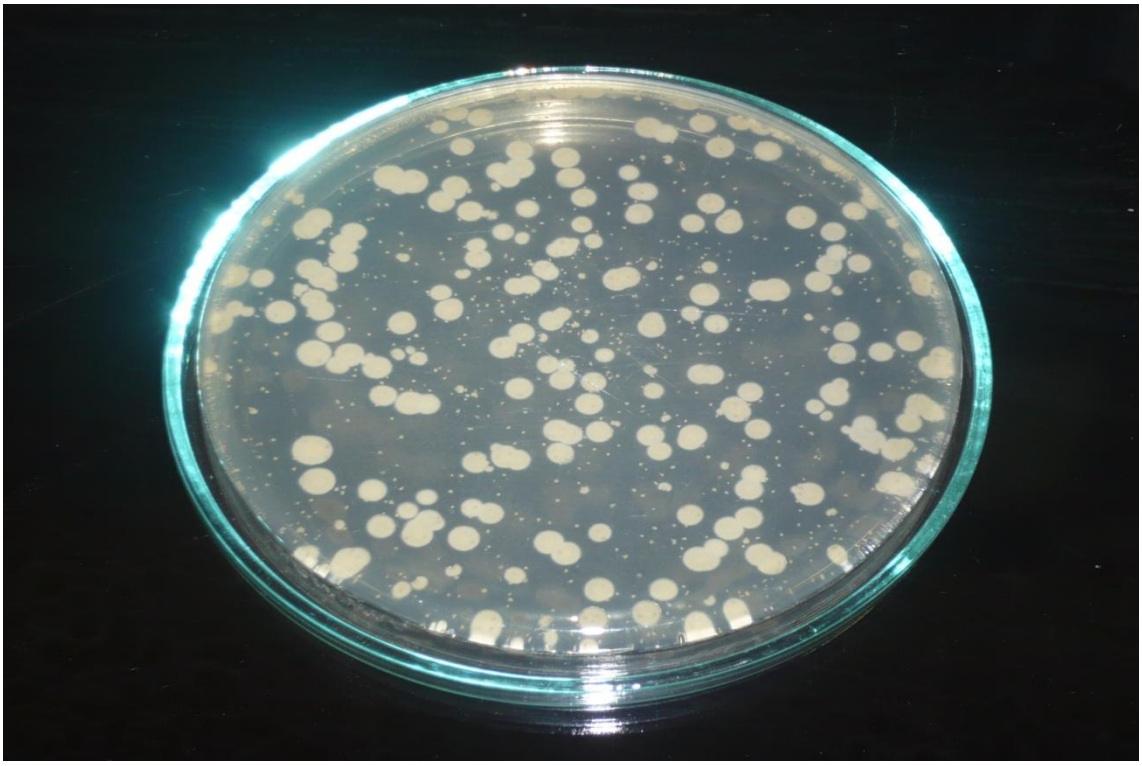
P I Stanovení CPM

P II Stanovení kvasinek a plísní

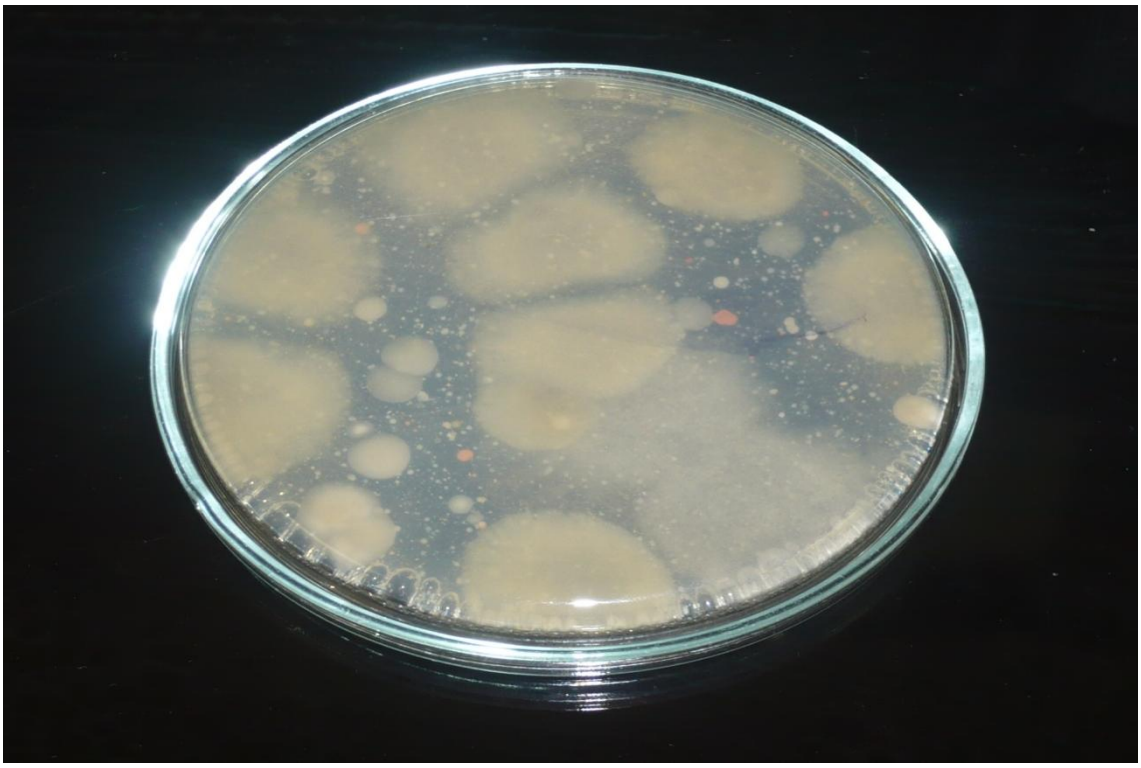
P III Varna pivovaru

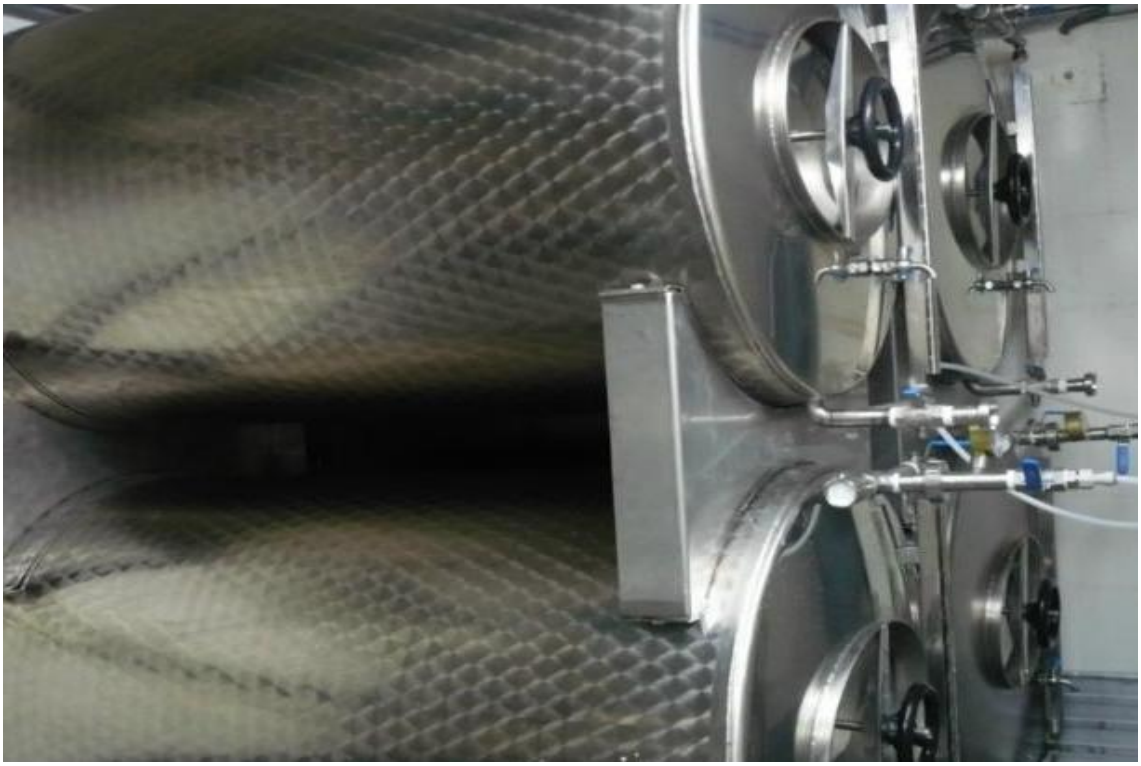
P IV Ležácký sklep

## PŘÍLOHA P I: STANOVENÍ CPM



## PŘÍLOHA P II: STANOVENÍ KVASINEK A PLÍSNÍ



## PŘÍLOHA P III: VARNA PIVOVARU

## PŘÍLOHA P IV: LEŽÁCKÉ TANKY