

Stanovení antioxidační aktivity ječmene během procesu sladování

Bc. Jana Dlapová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana DLAPOVÁ**
Osobní číslo: **T10395**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Sledování antioxidační aktivity ječmene během procesu sladování**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište sladovnický ječmen a popište proces sladování, stručně charakterizujte nejvýznamnější druhy sladů.
2. Provedte literární rešerši chemického složení sladu, soustředte se především na sloučeniny s antioxidační povahou.
3. Popište metody stanovení antioxidační aktivity v zrninách, případně přímo ve sladu.

II. Praktická část

1. Vybranými metodami stanovte antioxidační aktivitu sladu v jednotlivých fázích výroby sladu.
2. Naměřená data porovnejte s odbornou literaturou a vyvodte závěry z Vašich měření.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] **BASAŘOVÁ, G. Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.**

[2] **LEITAO, Céline, Eric MARCHIONI, Martine BERGAENTZLE, Minjie ZHAO, Luc DIDIERJEAN, Behnam TAIDI a Said ENNAHAR. Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011, 59(4), 1249-1255. ISSN 00218561.**

[3] **PAULICKOVA, I.,Jaroslava EHRENBERGERVA, Vlasta FIEDLEROVA, Dana GABROVA a Marie HOLASOVA. Evaluation of Barley Grass as a Potential Source of Some Nutritional Substances. Czech Journal of Food Sciences. 2007, 25(2), 65-72. ISSN 12121800.**

[4] **IGNAT, Ioana, Irina VOLF a Valentin POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry. 2011, 126(4),1821-1835. ISSN 03088146.**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Dlapová Jana

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

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 dne 2. 5. 2012


.....

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 nevydělečně 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 nahlázení 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 vzdělávacímu 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 antioxidantní aktivitou a obsahem polyfenolů v průběhu procesu sladování. Teoretická část popisuje výrobu sladu, látky s antioxidantní povahou a také možnosti, jak polyfenolické látky ve sladu stanovit. V experimentální části byly analyzovány vzorky ječmene a sladu v jednotlivých fázích výroby. Bylo provedeno měření pro stanovení celkové antioxidantní aktivity metodou DPPH a obsahu celkových polyfenolů metodou Folin-Ciocalteauovým činidlem.

Klíčová slova: ječmen, slad, polyfenoly, antioxidantní aktivita, spektrofotometr

ABSTRACT

This thesis deals with the antioxidant activity and polyphenol content during the malting process. The theoretical part describes the production of malt, substances with antioxidant character and ways of polyphenolic substances in the malt to determine. In the experimental part were analyzed barley and malt in various stages of production. Measurements were taken for determination of total antioxidant activity by DPPH and total polyphenol content by Folin-Ciocalteau agent.

Keywords: barley, polyphenols, antioxidant activity, spectrophotometer

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu, Ing. Pavlu Hanuštiakovi za vedení mé diplomové práce a čas, který mi věnoval.

Především chci poděkovat Sladovněm Soufflet ČR, a.s., zejména řediteli prostějovské sladovny, panu Františku Filipkovi, za důvěru, spolupráci a odborné rady, bez kterých by tato práce jen obtížně vznikala. Dále děkuji panu Janu Rozsívalovi, za pomoc při odběru vzorků.

V neposlední řadě děkuji celé své rodině a přátelům za všestrannou podporu v průběhu celého studia.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka. Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VÝROBA SLADU	12
1.1 JARNÍ SLADOVNICKÝ JEČMEN	12
1.1.1 Morfologie a anatomie ječmene	14
1.1.2 Pěstitelské a sladařské vlastnosti	15
1.1.3 Ukazatele sladovnické jakosti (USJ).....	17
1.1.4 Doporučené odrůdy 2011	17
1.2 PROCES SLADOVÁNÍ	20
1.2.1 Máčení ječmene	20
1.2.2 Klíčení ječmene.....	20
1.2.3 Hvozďení ječmene	21
1.2.4 Sladovnictví v ČR	23
1.3 DĚLENÍ SLADŮ	24
1.3.1 Slad český (plzeňský).....	24
1.3.2 Slad bavorský (mnichovský).....	24
1.3.3 Slad vídeňský	24
1.3.4 Speciální slady	24
2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ SLADU	26
2.1 ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ LÁTKY	26
2.2 POLYFENOLOVÉ LÁTKY	29
2.2.1 Zdravotní účinky	30
2.3 SLADOVÉ POLYFENOLY	31
2.3.1 Flavonoidy.....	32
2.3.2 Fenolové kyseliny	35
3 METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	38
3.1 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	38
3.2 STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	39
3.2.1 Metoda TEAC (metoda používající ABTS).....	39
3.2.2 Metoda DPPH	41
3.2.3 Metoda FRAP.....	42
3.2.4 Metoda ORAC	42
3.3 CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLICKÝCH LÁTEK	43
3.3.1 Metoda FCM	43
3.3.2 Metoda EBC.....	44
3.4 SKUPINY POLYFENOLŮ	44
3.4.1 Stanovení anthokyanogenů dle Harrise a Rickettse	44
3.5 JEDNOTLIVÉ POLYFENOLY	44
II PRAKTICKÁ ČÁST	46
4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	47
5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE	48

5.1	VZORKY	48
5.1.1	Příprava vzorků	49
5.2	STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY SPEKTROFOTOMETRICKY METODOU FOLIN-CIOCALTEAUOVÝM ČINIDLEM	50
5.2.1	Princip metody Folin-Ciocalteuovým činidlem	50
5.2.2	Instrumentace	50
5.2.3	Chemikálie	50
5.2.4	Pracovní postup	50
5.3	STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY SPEKTROFOTOMETRICKY METODOU DPPH	51
5.3.1	Princip metody DPPH	51
5.3.2	Instrumentace	51
5.3.3	Chemikálie	52
5.3.4	Pracovní postup	52
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
6.1	METODA FCM	54
6.2	METODA DPPH.....	57
6.3	POROVNÁNÍ METOD.....	61
	ZÁVĚR	63
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	65
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK.....	76
	SEZNAM GRAFŮ	77
	SEZNAM PŘÍLOH.....	78

ÚVOD

Ječmen je jednoletá rostlina patřící do rodu *Hordeum*. Je setá buď na jaře (ječmen jarní), nebo na podzim (ječmen ozimý). Pro výrobu sladu se používá výhradně ječmen jarní, ozimý se uplatňuje zpravidla jako krmivo. Účelem sladování je vyrobit řízeným klíčením ječmene slad, v němž budou obsaženy potřebné enzymy, aromatické a barevné látky nezbytné pro výrobu mladiny a následně určeného druhu piva.

Protože polyfenolům je v potravinářském průmyslu všeobecně věnována stále větší pozornost, je účelné zkoumat z tohoto hlediska také 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, ale také brání procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování. Fenolickým sloučeninám obsaženým obecně v obilovinách, je věnována pozornost hlavně pro jejich antioxidační vlastnosti, které pozitivně působí na lidské zdraví. Mohou se podílet na ochraně před škodlivým působením reaktivních forem kyslíku, a to zejména volných kyslíkových radikálů, které jsou působením antioxidantů zhašeny. Volné radikály jinak napadají tělní buňky a mohou způsobovat vážná onemocnění, včetně kardiovaskulárního a rakoviny.

Slad a sladovnický ječmen obsahuje celou řadu chemických látek s antioxidační aktivitou, je bohatý na fenolové kyseliny a flavonoidy, obsažené hlavně v obalových částech zrna. Mimo jiné obsahuje také kyselinu fytoovou a askorbovou, melanoidiny a některé enzymy, jež se podílí na části z celkové antioxidační aktivity.

Cílem práce bylo zaměřit se na stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH (1,1 difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)-hydrazyl). Dále analýzu doplnit o metodu Folin-Ciocalteuovým činidlem, která stanoví celkový počet polyfenolických látek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝROBA SLADU

Slad je jednou ze základních surovin pro výrobu piva. Jeho kvalita ovlivňuje proces technologie výroby piva a má stěžejní význam i v docílení požadovaného chemického složení, organoleptických vlastností a koloidní stability finálního výrobku. [1]

1.1 Jarní sladovnický ječmen

Ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L.) je nejdůležitější surovinou pro pivovarský průmysl. V ČR se ječmen pěstuje od roku 1227, v této době se používal ale převážně pro výrobu krup, chleba a jen jako vedlejší surovina pro výrobu piva. [1] Koncem 19. a počátkem 20. století získaly původní české odrůdy sladovnických ječmenů pro své vynikající vlastnosti významné postavení. Po pšenici přináší ječmen české rostlinné výrobě největší hrubé tržby a předstihuje řepku. Z hlediska ekonomiky, kde se spojují jeho vysoké ceny a poměrně nízké náklady, je po máku, bramborách a cukrovce plodinou s nejvyšší rentabilitou. [2]

Obr. 1: *Hordeum vulgare* L. [3]



Pro sladovnický ječmen jsou nejvhodnější úrodné černozemě, degradované černozemě a hnědozemě. Včasný výsev porostu je důležitý pro dosažení pěstitelského cíle. S opožděním výsevu dochází nejen ke snížení výnosu, ale klesá i podíl předního zrna a zhoršuje se sladovnická jakost. Sladovou hodnotu ječmene mohou ovlivnit i pěstitelská opatření, například hubení chorob a hnojení. Jedná se zejména o fosfor, který zabezpečuje nízký obsah bílkovin, vyšší extrakt, vyšší enzymatickou aktivitu a méně pevné stěny buněk, což je důležité pro rozluštění. Zásoba fosforu v půdě by se měla pohybovat okolo hodnoty 90

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Draslík pozitivně ovlivňuje podíl předního zrna, hmotnost tisíce zrn a obsah bílkovin. Literatura uvádí zásobu draslíku v půdě $230 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a hořčíku $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. [5] Nejvíce problematickým prvkem je dusík, proto je velmi vhodné stanovit N_{min} před setím. Celková dávka dusíku by neměla přesáhnout $50 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, v obilnářské a bramborářské výrobní oblasti $70 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Při volbě hnojiv dáváme při předseťovém hnojení i při dohnojení přednost formám kapalným (DAM 390). Dobrý přístup živin můžeme ječmeni zajistit především volbou správné předplodiny. Nejčastěji se publikuje, že by předplodinou měly být organicky hnojené okopaniny jako je cukrovka, kukuřice, či brambory. [6] Vedle půdních podmínek se významně na sladovnické kvalitě a výnosu projeví i klimatické podmínky, zvláště aktuální průběh počasí v daném ročníku. Průběh počasí se přisuzuje nejméně 2/3 podíl na výsledku daného roku. [2]

Rozsah osevních ploch této plodiny, zejména v důsledku rozšiřování polí osetých řepkou nebo kukuřicí, v posledních letech klesá. V roce 2011 byla sklizňová plocha 271 972 ha. Oproti roku 2010 to znamenalo pokles o 6 746 ha (tj. o 2,5 %). Naopak výrazně lepší byly výnosy. V roce 2011 se z jednoho hektaru sklídilo 4,95 tun, zatímco v předešlém roce to bylo jen 3,91 tun. [7]

Tab. 1: Sklizeň ječmene jarního v roce 2010 a 2011 podle krajů [7]

Území, kraj	Plocha v hektarech		Výnos v t/ha		Sklizeň v tunách	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011
Česká republika	278 718	271 972	3,91	4,95	1 088 670	1 345 940
Hl. m. Praha	1 786	1 975	4,57	5,59	8 170	11 032
Středočeský	52 461	53 498	4,11	5,06	215 365	270 769
Jihočeský	22 544	19 174	3,46	4,65	78 005	89 135
Plzeňský	14 741	13 508	3,5	4,64	44 617	62 621
Karlovarský	2 181	3 542	3,47	4,66	7 572	16 504
Ústecký	18 092	20 718	4,18	5,06	75 638	104 893
Liberecký	2 920	3 243	3,56	4,6	10 387	14 919
Královéhradecký	8 818	8 894	4	4,93	35 251	43 828
Pardubický	17 410	16 349	3,7	4,81	64 465	78 656
Vysočina	42 736	38 845	3,47	4,67	148 396	181 571
Jihomoravský	38 765	36 888	3,96	4,93	153 525	181 711
Olomoucký	34 827	34 185	4,36	5,37	151 988	183 637
Zlínský	9 323	8 085	4,4	5,37	41 029	43 391
Moravskoslezský	14 114	13 069	3,84	4,84	54 262	63 272

1.1.1 Morfologie a anatomie ječmene

Rostlina ječmene je tvořena kořenovou soustavou, stéblem, listy, květem a plodem.[1]

Kořenová soustava – z našich obilovin tvoří ječmen nejvyšší počet zárodečných kořínků (4-10, nejčastěji 5-6).

Stéblo – je tvořeno ze 4 – 8 článků oddělených koleny a dorůstá až do 130 cm. Spodní článek stébla je kratší a následující je vždy delší.

Listy – jsou postaveny ve dvou řadách nad sebou. Na velikosti plochy listů a stébla je závislý výnos.

Květenství a květ – květenstvím je složený nevětvený klas. U dvouřadého ječmene se vyvine vždy jen prostřední kvítek ze tří kvítků. Kvítek je chráněn na vnější straně vypouklou pluchou a na vnitřní pluškou. Plucha vybíhá v dlouhou osinu. Osiny se z velké části účastní fotosyntézy a transpirace, čímž ovlivňují výnos zrna a dehydrataci obilky ve fázi zrání.

Plod – plodem ječmene je obilka, která je složena ze tří částí: obalu, klíčku a endospermu.

- Obalové vrstvy tvoří na hřbetní straně plucha, na břišní straně pluška, pak následuje oplodí a osemení. Zaujímá 8 – 14 % hmotnosti zrna a chrání klíček a endosperm před nadměrným vysycháním, mechanickým poškozením a mikrobiálním napadením.
- Zárodek je živá část obilky a ze sladařského hlediska má velký význam. Vychází z něho veškeré podněty k tvorbě enzymů, potřebných k hydrolýze složitých zásobních látek důležitých pro klíčení a tvorbu extraktu.
- Endosperm tvoří největší část obilky a skládá se z aleuronové vrstvy a škrobového endospermu. Aleuronová vrstva je umístěna pod osemením a je složena z hranolových buněk uspořádaných v řadách. Tyto buňky obsahují bílkoviny, tuk a částečně i škrobová zrna. Při dosažení podmínek pro zahájení klíčení je aleuronová vrstva aktivována růstovými regulátory (hormony). Vnitřní endosperm tvoří tenkostěnné buňky, ve kterých je uložen škrob. [8]

1.1.2 Pěstitelské a sladařské vlastnosti

U sladovnického ječmene se posuzují nejen pěstitelské vlastnosti, tedy výnos, odolnost, náročnost, ale zejména sladařské vlastnosti, tj. chemické složení a vhodnost pro výrobu sladu. Tyto vlastnosti se rozdělují na fyziologické, mechanické a fyzikálně-chemické. Z fyziologických znaků je důležitá klíčivost a klíčivá energie, které udávají procentuální podíl zrn schopných vyklíčit za stanovených podmínek během 3 až 5 dnů. [9] Z mechanických znaků jsou nejdůležitější objemová hmotnost 1 hl, absolutní hmotnost 1000 zrn, podíl zrn nad sítím 2,5 mm a především odrůdová čistota a homogenita dodávaných partií. Důležitý je i co nejnižší podíl cizích a biologicky poškozených zrn, plesnivých zrn či zrn se zahnědlými špičkami, která mohou být původcem samovolného napěňování piva (tzv. gushing). [11] Zrno vhodné pro výrobu sladu má být zdravé, světle žluté, lesklé, se slámovou vůní. Zeleno-modrá či bílá zrna jsou nedozrálá a mají hodně bílkovin, hnědavé pluchy zase svědčí o opožděné sklizni a napadení houbami. Zatuchlá vůně znamená nízkou klíčivou energii. [8]

Jakost zrna sladovnického ječmene se posuzuje na základě ČSN 46 1100-5, která platí od 1. 1. 2006. Hodnotí se větší počet specifických znaků, které jsou významně ovlivňovány průběhem počasí a agrotechnikou.

V tabulce jsou uvedeny požadavky na ječmen při nákupu, ČSN 46 1100 pro obilí potravinářské, část 5: Ječmen sladovnický.

Tab. 2: Požadavky na ječmen při nákupu [12]

Parametr	Limit (hm. %)
obsah vody	max. 15,0
přepad nad sítím 2,8 mm	min. 85,0
přepad nad sítím 2,5 mm	min. 70,0
příměsí sladařsky nevyužitelné	max. 3,0
zrno mechanicky poškozené	max. 3,0
zrno fyziologicky poškozené	max. 1,0
příměsí sladařsky částečně využitelné	max. 6,0
zahnědlé špičky	max. 3,0
obsah bílkovin	10,0 – 12,0
klíčivost	96,0 – 100

Kosař a Procházka uvádějí následující požadavky na sladovnický ječmen: [1]

- vysoký výnos zrna $6,5 - 7 \text{ tun} \cdot \text{ha}^{-1}$
- počet produktivních odnoží 2 – 2,5
- počet zrn v klasu 18 – 20
- hmotnost 1000 zrn 42 – 46 g
- vhodné biologické vlastnosti
- poměr zrna ve slámě 1:1,5
- výška rostliny 70 – 80 cm
- odolnost proti poléhání
- délka vegetační doby 90 – 105 dnů
- vysoká suchovzdornost
- rezistence proti chorobám
- obsah škrobu 60 – 65 %
- obsah bílkovin 10 – 11 %

Cena zrna ječmene na trhu se řídí množstvím nabídky a poptávky a je dána dohodou mezi obchodními partnery. U sladovnického ječmene může být uplatněn srážkový systém ze základní ceny. Při zhoršených jakostních znacích se sráží určité % z ceny. [5]

1.1.3 Ukazatele sladovnické jakosti (USJ)

Ve výzkumném ústavu sladařském v Brně jsou každoročně sledovány technologické parametry u celého sortimentu odrůd sladovnického ječmene přibližně od 30. let 20. století. Vzorky sledovaných odrůd jsou odebírány vždy z několika státních odrůdových zkušeben. Všechny vzorky jsou mikrosledovány za stejných podmínek. Zrno ječmene, slad a sladina jsou analyzovány podle mezinárodně uznávaných metod (EBC, MEBAK). Pravidelně jsou sledovány technologické parametry: extrakt v sušině sladu, relativní extrakt při 45 °C, Kolbachovo číslo, diastatická mohutnost, dosažitelný stupeň prokvašení, obsah β -glukanů a friabilita. [1]

V rámci USJ se podle Kosaře a Procházky hodnotí tyto znaky: [1]

- Obsah dusíkatých látek v obilce nesladovaného ječmene – optimální hodnoty se pohybují v oblasti 10,7 – 11,2 % v sušině.
- Obsah extraktu v sušině sladu – charakterizuje obsah látek, které přejdou ze sladu uzančným infuzním rmutovacím postupem do roztoku, za optimum jsou považovány hodnoty vyšší než 82 %, jsou registrovány i odrůdy s obsahem 83 %.
- Kolbachovo číslo – poměr rozpustných a celkových dusíkatých látek ve sladu vyjádřený v %, hodnota se pohybuje kolem 40, výrazně vyšší hodnoty jsou nežádoucí.
- Diastatická mohutnost – v současné době všechny sladovnické odrůdy dosahují optimálních hodnot nad 250 j·W·K. (jednotky Windische – Kolbacha).
- Dosažitelný stupeň prokvašení – optimální hodnoty nad 82 %.
- Friabilita (křehkost) – optimální hodnoty kolem 85 %.
- Obsah β -glukanů ve sladině – optimální hodnoty do 150 mg·l⁻¹. Hodnoty nad 200 jsou považovány za nežádoucí. V současné době je registrováno jen několik odrůd, které jsou schopny požadavku na nízký obsah vyhovět.

1.1.4 Doporučené odrůdy 2011

Podobně jako v jiných zemích Evropské unie i v České republice jsou vytvářeny Seznamy doporučených odrůd hlavních polních plodin, jejichž cílem je usnadnit uživatelům orientaci v sortimentu nabízených odrůd a poskytnout jim objektivní a nezávislé informace o odrůdách a jejich vhodnosti pro pěstební podmínky v České republice. Odrůdová skladba se

neustále mění. Aktuální údaje je možno získat v každoročně vydávaných zprávách Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně. [7]

Odrůdy ječmene jsou nejprve hodnoceny v rámci registračního řízení Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ). Po úspěšném ukončení těchto zkoušek může majitel přihlásit odrůdu do zkoušek pro Seznam doporučených odrůd. Nově registrované odrůdy mohou být zařazeny do seznamu jako předběžně doporučené na základě minimálně tříletých zkoušek. Doporučené mohou být odrůdy na základě minimálně zkoušek čtyřletých.

Volba odrůdy je dána především požadavky zpracovatele, pro kterého budoucí produkci pěstujeme. V regionu střední Evropy patří mezi nejpěstovanější a nejvýznamnější odrůdy sladovnického ječmene Malz, Bojos, Kangoo a Radegast. [13]

V současné době je Malz nejvýznamnější a nosnou sladovnickou odrůdou v České republice. V letech 2010 a 2011 byla nejpěstovanější odrůdou jarního ječmene v České a Slovenské republice. Má výběrovou kvalitu a je doporučen Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva. Malz je nosnou odrůdou pro Sladovny Soufflet ČR, a.s., Plzeňský prazdroj, ale i pro řadu dalších tuzemských a zahraničních sladoven a pivovarů. V současné době se Malz vyváží do Německa, Polska, Rakouska, Maďarska a na Slovensko. Významný podíl mají také odrůdy Bojos, Kangoo, Blaník, Radegast, Prestige a Sebastian. Ideální průběh počasí roku 2011 svědčil především odrůdám Bojos a Sebastian. Odrůda Sebastian vyniká vysokým produktivním potenciálem stébel a tento znak si udržuje i při horších půdních podmínkách, samozřejmě za předpokladu včasného a dostatečného hnojení dusíkem. Z víceletých výsledků vyplývá vyšší výnosový potenciál mladších odrůd v porovnání se staršími odrůdami Prestige a Malz.

V roce 2012 bude Malz nejpěstovanější odrůdou jarního ječmene v České a Slovenské republice a v Maďarsku, s možností prodeje na místní trhy, ale i se snadnou možností vývozu. [13]

V tabulce jsou uvedeny některé další doporučené odrůdy pro rok 2011.

Tab. 3: Doporučené sladovnické odrůdy 2011: [11]

Název odrůdy	Odrůdová charakteristika
ADVENT	- výnos předního zrna v ošetřené variantě v obilnářské oblasti vysoký v ostatních oblastech a variantách středně vysoký až nízký
	- rostliny středně vysoké, zrno středně velké až velké
AKSAMIT	- výnos předního zrna v ošetřené variantě v kukuřičné a v řepařské oblasti středně vysoký, v obilnářské a bramborářské vysoký
	- rostliny středně vysoké, zrno malé
AKTIV	- výnos předního zrna v kukuřičné a obilnářské oblasti středně vysoký, v řepařské a bramborářské oblasti středně vysoký až vysoký
	- rostliny středně vysoké až vysoké, náchylné k poléhání, zrno středně velké až velké
BLANÍK	- výnos předního zrna v ošetřené variantě v obilnářské a bramborářské oblasti vysoký, v ostatních oblastech a variantách středně vysoký
	- rostliny středně vysoké až vysoké, zrno středně velké až velké
BOJOS	- výběrová sladovnická kvalita, preferovaná téměř všemi sladovny, doporučena pro výrobu Českého piva
	- rostliny středně vysoké až vysoké, zrno středně velké
KANGOO	- výnos předního zrna v neošetřené variantě ve všech oblastech středně vysoký, v ošetřené variantě ve všech oblastech vysoký
	- rostliny středně vysoké, zrno středně velké až velké
RADEGAST	- výnos předního zrna v neošetřené variantě v obilnářské oblasti nízký, v ostatních oblastech a variantách středně vysoký
	- rostliny středně vysoké až vysoké, zrno středně velké až velké
SEBASTIAN	- výnos předního zrna v neošetřené oblasti v kukuřičné a řepařské oblasti nízký, v ošetřené variantě v obilnářské a bramborářské oblasti vysoký
	- rostliny nízké, zrno středně velké až malé
XANADU	- výnos předního zrna v ošetřené variantě v řepařské, obilnářské a bramborářské oblasti vysoký, v ostatních oblastech a variantách středně vysoký až vysoký
	- rostliny středně vysoké, zrno středně velké

1.2 Proces sladování

Proces výroby ve sladovnách lze z hlediska jednotlivých fází rozdělit na tři úseky, a to máčení, klíčení a hvozďení. [14] Cílem sladování je vyrobit procesem klíčení a hvozďení z ječmene slad, obsahující potřebné enzymy a aromatické látky i barevné látky nezbytné pro výrobu určeného druhu piva.

Před zahájením výroby sladu je nutno zohlednit, že jarní ječmeny nejsou schopny krátce po sklizni poskytnout kvalitní slad. Důvodem je vstup obilky do dormance, kdy obilky špatně a nevyrovnaně klíčí. Sklizený sladovnický ječmen musí tedy nejprve fyziologicky dozrát. Během dozrávání je důležitá výměna vzduchu a přístup kyslíku. Posklizňové dozrávání sladovnických ječmenů trvá 4 až 5 týdnů. [10, 15]

1.2.1 Máčení ječmene

Cílem máčení je zvýšení obsahu vody v ječném zrně z 12 – 15 % na 42 – 48 %. Zvýšení obsahu vody v zrně vede k zahájení enzymatických reakcí a klíčení zrna. Dosažený obsah vody se nazývá stupeň domočení a liší se podle typu vyráběného sladu. Technologicky významným efektem je vyprání ječmene, kdy se z něj vyluhují barevné a hořké látky, kyselina křemičitá a bílkoviny z pluch. Tyto látky jsou nežádoucí, protože zhoršují senzorní vlastnosti piva a podporují tvorbu zákalu v pivu. Samotné máčení probíhá v ocelových náduvnících, většinou mají válcový tvar s kónickým dnem se sklonem 45 °, aby se mohl samočinně vyprázdnit. Namáčecí náduvník se naplní asi do jedné poloviny vodou a ječmen se ze zásobního koše spustí do náduvníku. U všech způsobů máčení je vždy první máčecí voda značně znečištěna, rychle se z ní vyčerpává kyslík a musí být brzy vyměněna.

Nejběžnější je způsob máčení s provzdušňovacími přestávkami. Máčecí voda se podle možností jeden až třikrát vyměňuje. Mezi každým napouštěním se dělá přestávka 4 až 6 hodin, aby se zrno dobře provzdušnilo. [1]

1.2.2 Klíčení ječmene

Klíčení je fyziologický proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjejí zárodky kořínků a listů za využití zásobních látek v endospermu. Současně se mění i vnitřní znaky zrna. Působením enzymů se štěpí rezervní látky a zvyšuje se rozpustnost a luštitelnost endospermu. Z enzymů mají největší technologický význam fosfatasy, cytasy, proteasy a pře-

devším amylasy. Fosfatasy napomáhají k tomu, aby substrát získal kyselou reakci, která je důležitá pro činnost ostatních enzymů. Cytasy pomáhají zpřístupnit zrnka škrobu a molekuly bílkoviny uzavřené v buňkách endospermu. Amylasy se při klíčení aktivují i tvoří. Jejich působením se štěpí rezervní škrob endospermu na maltosu a glukosu, které jsou dále metabolizovány za tvorby energie potřebné pro životní procesy zrna. Škrob je zdrojem energie pro zárodek a během sladování je asi 5 – 6 % škrobu odbouráno na cukry. Ve sladu je z cukrů přítomna glukosa, fruktosa, sacharosa a maltosa. [16]. Během klíčení je asi 35 – 40 % bílkovin převedeno do rozpustné formy, přitom vznikají činnosti peptidas především nízkomolekulární sloučeniny (aminokyseliny a oligopeptidy). Teplota obecně ovlivňuje průběh všech enzymových reakcí. Optimální podmínky pro sladařské klíčení ječmene jsou při 14 až 18 °C v hromadě, důležitý je zejména přístup kyslíku, aby bylo zajištěno intenzivní dýchání zrna. [10] Konečným produktem klíčení je zelený slad, který má mít zdravou vůni, mírně zavadlé kořínky, správně vyvinutou stěelku a má být rozluštěn.

Sladovací zařízení lze rozdělit na klasická a moderní. Do klasických se řadí humna, mezi moderní systémy, pneumatické, patří linka posuvné hromady, například systém Lausmann. [1]

Humnová sladovna – humnová sladovna má většinou několik pater. Mají obvykle humna s chlazením, které je zabudováno v podlaze, což umožňuje větší zatížení humen a lze dodržet příznivější podmínky při klíčení. Vzduch na humnech má vysokou relativní vlhkost, která zamezuje vysychání hromad a předčasnému zavádání zeleného sladu. Nevýhodou humnových sladoven je velký obestavěný prostor a i přes používání mechanizace zde stále převažuje namáhavá ruční práce.

Linka posuvné hromady – je zařízení, kde je denní šarže pomocí obraceče přemísťována od vymáčecího pole k nástěru na hvozdu. Vyráběný slad je kvalitní, ale na úkor výtěžnosti, homogenity a vyššího poškození zrna.

1.2.3 Hvozdnění ječmene

Cílem hvozdnění je snížení obsahu vody ve sladu pod 4 %, zastavení vegetačních pochodů při zachování odpovídající enzymové aktivity a vytvoření chuťových, barevných a oxido-redukčních látek tvořících charakter sladu. Toho se dosáhne řízeným a šetrným sušením při teplotách 60 až 80 °C. Zelený slad má vysoký obsah vody a není na rozdíl od hotového sladu skladovatelný.

Při sušení a hvozdění se z hlediska chemických a biochemických změn tři fáze:

- Růstová fáze – obsah vody na 20 %, teplota do 40 °C, zrno je schopné dále klíčit.
- Enzymová fáze – obsah vody poklesl pod 20 %, teplota mezi 40 až 60 °C, zastavení vegetačních pochodů, ale enzymové reakce pokračují. [17]
- Chemická fáze – obsah vody pod 10 %, teploty nad 60 °C, zastaveny enzymové reakce, probíhají enzymové reakce vedoucí k tvorbě barevných a chuťových látek. [10]

Během procesu se mění disperzita u vysokomolekulárních látek a nastává koagulace určitých frakcí, což má vliv na chuť, pěnivost a koloidní stabilitu piva. Důležité jsou změny enzymů odbourávající škrob: obsah α -amylasy se během předsoušení zvyšuje až o 30 %, ale při dotahování klesá na původní hodnotu v zeleném sladu.

K nejdůležitějším reakcím během hvozdění patří tvorba chuťových a barevných látek. Tyto látky tvoří charakter sladu, jeho vůni, chuť a barvu a oxidoredukční schopnosti. Řada chemických reakcí, zvaných Maillardovy reakce, vede od výchozích hexos a aminokyselin přes několik meziproductů až k tvorbě melanoidinů. [17] Bezdušičaté barevné aromatické látky vznikají při hvozdění karamelizací sacharidických složek při termickém štěpení cukrů, enzymovou oxidací za vzniku melaninů a neenzymatickým hnědnutím. [18] Pro tvorbu těchto látek je předpokladem hluboké rozštěpení polysacharidů a bílkovin během klíčení ječmene. Melanoidiny, melaniny, karamelizační produkty i ostatní barevné a aromatické látky mají koloidní charakter a chrání složky koloidních roztoků vůči změnám disperzity. Dále mají tyto látky oxidoredukční vlastnosti, čímž zlepšují koloidní stabilitu a nakonec svým zabarvením vytvářejí typickou barvu sladu a z něho vyrobeného piva.

Na hvozdění navazuje odkličování sladu, při němž se slad zbaví kořínků (sladový květ), poškozených zrn a prachu. Odklíčený slad je automaticky vážen, a uskladňován do manipulačního sila a teprve podle analytických rozborů je uskladněn do sil, kde se nechá 4 až 6 týdnů odležet. Přitom se mírně zvýší vlhkost sladu, dochází ke zvláčenění pluchy a fyzikálněchemickým změnám v endospermu, které pak usnadňují zpracování v pivovare. [1]

Před expedicí je nutno slad zbavit zbytků prachu, nečistot a oloupaných pluch. Čištění sladu se provádí na leštičce. Slad je dle požadavků odběratelů expedován volně ložený, pro menší a speciální odběratele pytlovaný. Pytlovaný slad je proti navlhnutí chráněn uvnitř

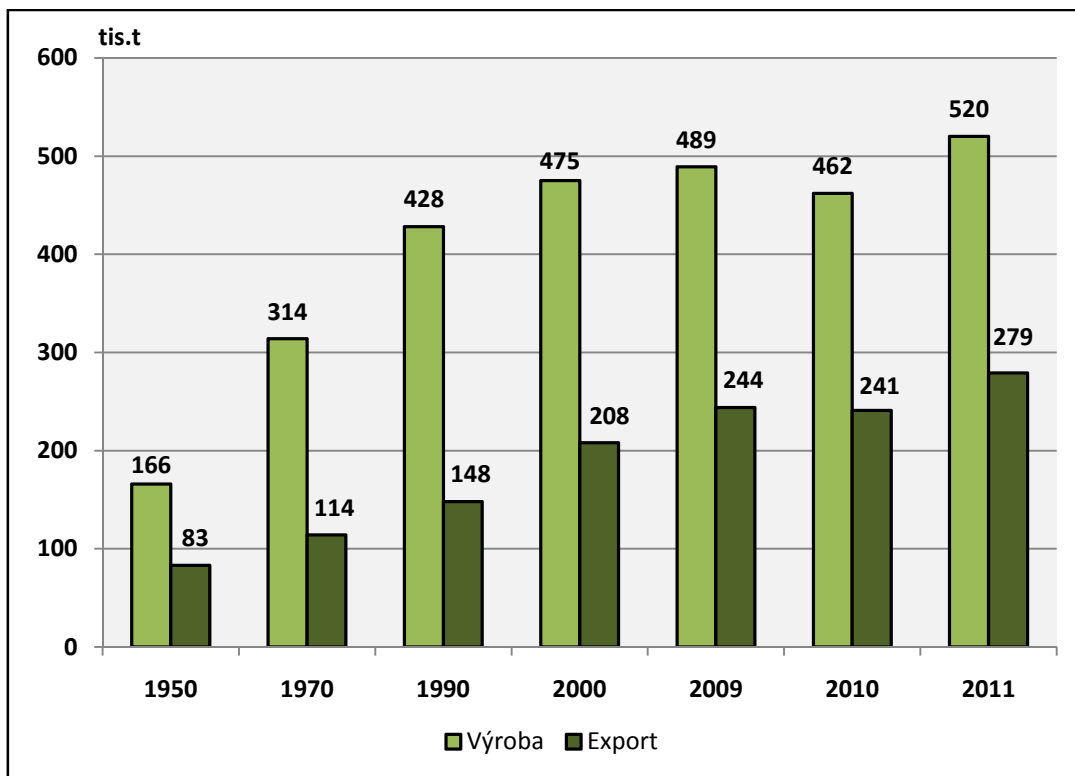
pytle polyetylenovou vložkou. Slad je dopravován auty, speciálními železničními vagony, kontejnery a do zámoří lodní dopravou. [1, 10]

1.2.4 Sladovnictví v ČR

Sladovny v České republice vyrobily v roce 2011 přes 520 000 t sladu, což je o 4,2 % více než v roce 2010. Vývoz sladu představoval v loňském roce více než polovinu jeho tuzemské produkce, do zahraničí mířilo téměř 279 000 tun. Nejvíce českého sladu se vyváží do Polska, druhým nejvýznamnějším odběratelem bylo Rumunsko, za ním následovalo Německo. Český slad se vyváží celkem do 45 zemí. Česko patří mezi šest největších vývozců sladu v rámci Evropské unie. [19]

Největším producentem jsou Sladovny Soufflet ČR, se sladovnamy v Nymburce, Kroměříži, Hodonicích, Prostějově a Litovli, jejichž výroba činila přes 310 000 tun sladu.

Graf. 1: Výroba a vývoz sladu (1950 – 2011) [19, 20]



1.3 Dělení sladů

Slady můžeme dělit podle několika kritérií. Nejčastěji se klasifikují podle způsobu výroby a vlastností, podle barvy a také podle druhu použité obilniny.

1.3.1 Slad český (plzeňský)

Vyrábí se z ječmenů s nízkým až středním obsahem bílkovin. Pro výrobu je charakteristické máčení zrna na vlhkost 42 – 45 %. Při hvozdění se předsouší při teplotě 40 – 50 °C po dobu 12 hodin, až do poklesu obsahu vody na 10 %. Poté se dosouší dalších 12 hodin, přičemž posledních 5 hodin se udržuje dotahovací teplota 80 °C. [10]

1.3.2 Slad bavorský (mnichovský)

Bavorský slad se používá k výrobě extraktivnějších piv. Je charakteristický svou barvou, výraznějším aromatem, čehož se dosáhne výrazně hlubším rozluštěním při klíčení. Vyrábí se z ječmene, který má obsah bílkovin 12 % a více. Zrno se máčí na vyšší vlhkost, 46 – 48 %. Je odlišně hvozděn, s cílem ještě podpořit tvorbu melanoidů a je dotahován při teplotách okolo 105 °C. Obsah vody se pohybuje kolem 2 %.

1.3.3 Slad vídeňský

Tvoří přechod mezi sladem českým a bavorským, svými vlastnostmi se však přibližuje sladu českému. Dotahovací teplotu má vyšší než slad český. [10]

1.3.4 Speciální slady

Mezi speciální slady počítáme slady diastatické, karamelové, barvicí a pšeničné. Výroba speciálních sladů činí asi 5 % z celkové produkce v České republice. [1]

Slad diastatický – k výrobě se používá většinou ječmen s vyšším obsahem bílkovin. Ječmen se sladuje s vyšším obsahem vody, 46 – 48 % při nízkých teplotách do 14 °C a při delším vedení hromady 6-8 dní. Slad se hvozdí při nízkých teplotách za maximálního tahu hvozdů. Dotahovací teplota u diastatického sladu nepřesáhne 65 °C, vláha sladu se pohybuje okolo 6 %. Ječmen s vyšším obsahem bílkovin dává předpoklady vyššího obsahu enzymů a tento efekt se ještě navyšuje používáním ječmene s nižší absolutní hmotností zrna. Tak se dosáhne toho, že na jednotku hmotnosti ječmene je více obilek, které při sladování s

vyšším obsahem vody a déle klíčené poskytnou zelený slad s vysokou diastatickou mohutností. Šetrným přesoušením a nedotažením sladu se ochrání amylolytická síla sladu.

Slad karamelový – je charakteristický vysokým obsahem cukrů, aromatických a barevných sloučenin. Surovinou je zelený slad, který se vlhčí na 45 % vody, aby se při zahřívání vytvořilo dostatečné množství vodní páry. [6] Ta je potřebná pro ztekucení a zcukření endospermu při 70 – 75 °C. Následuje proces karamelizace podle typu sladu, pro světlý je teplota 120 - 130 °C, pro polotmavý 160 °C a pro tmavý 180 °C.

Slad barvicí – používá se při výrobě tmavých piv bavorského typu. Slad je enzymaticky inaktivní, veškeré charakteristické vlastnosti jsou dány pouze chemickými reakcemi.

Slad pšeničný – používá se při výrobě speciálních (tzv. bílých) piv, nebo v pekárenství. [1]

2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ SLADU

Analytické ukazatele, běžné pro cereální materiály, (sušina, škrob, bílkoviny) se obvykle stanovují jen ve sladovnickém ječmenu, nikoliv v samotném sladu. Ječmen obsahuje 80 – 88 % sušiny a 12 až 20 % vody. Sušinu tvoří organické dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny a anorganické látky. [21]

Tab. 4: Chemické složení obilky ječmene [1]

	Obilka [%]
SACHARIDY	
škrob	60 – 65
nízkomolekulární sacharidy	
sacharosa	1,2
rafinosa	0,3 – 0,5
maltosa	0,1
glukosa	0,1
fruktosa	0,1
neškrobové polysacharidy	
hemicelulosa:	
β-glukany	3,3 – 4,9
pentosany	9
celulosa	4,7
LIPIDY	3,5
FOSFÁTY	
fytin	0,9
POLYFENOLY	0,1 – 0,6
DUSÍKATÉ LÁTKY	9,5 – 11,9
rozpuštěné dusíkaté látky	1,9
albuminy, globuliny	3,5
hordeiny (prolaminy)	3,4
gluteliny	3,4
MINERÁLNÍ LÁTKY	2

2.1 Anorganické a organické látky

Skupinu organických látek v zrna ječmene představují především sacharidy, které tvoří 80 % hmotnosti ječného zrna. Nejvíce zastoupenou jednotlivou složkou je škrob. Je rezervním polysacharidem a zásobárnou živin pro klíček v době jeho klíčení. Vzniká enzymaticky z jednoduchých sacharidů v procesu asimilace CO₂. [22] Kvalitní odrůdy sladovnických

ječmenů obsahují 62 – 65 % škrobu v sušině. Většina ječmenných škrobů, stejně jako ostatní obilní zrna, obsahují dvě základní složky, a to amylosu a amylopektin.

Nízkomolekulárních sacharidů obsahuje zrno ve srovnání s polysacharidy podstatně méně. V klíčcích jsou zastoupeny především sacharosa a rafinosa. Maltosa, glukosa a fruktosa jsou přítomny hlavně v endospermu. Celkové množství nízkomolekulárních cukrů i poměrné zastoupení jsou závislé na stupni zralosti zrna. Ječmeny obsahují 10 – 14 % neškrobnatých polysacharidů jako jsou celulosy, hemicelulosy a lignin. [21] Hlavní složkou, která plní funkci stavebních látek v buněčných stěnách jsou β -glukany. Obsah β -glukanů ve sladince přímo souvisí s enzymem β -glukanasou, která hraje významnou roli při depolymeraci ječného β -glukanu při sladování. [1] Enzym β -glukanasa se v ječmeni nevyskytuje, aktivuje se až při klíčení. Jeho aktivita se zvyšuje již při máčení, vyšším obsahem vody a vyšší teplotou při klíčení. Obsah β -glukanů v ječném zrne kolísá od 2 % do 11 % v závislosti na odrůdě, a na půdně klimatických podmínkách.

Lipidy jsou obsaženy především v aleuronové vrstvě, v pluchách a asi jedna třetina z celého množství je v klíčku. [23] Při sladování se částečně spotřebují v rámci látkové výměny při dýchání, převážná část však zůstává ve sladovém mlátu.

Fosfáty jsou asi z poloviny tvořeny fytinem. Fytin je ester kyseliny fosforečné a inositolu. Fosfáty mají důležitý fyziologický význam pro klíček. Podílejí se při udržování pH při klíčení, ale i v mladince a v pivu. [1]

Dusíkaté látky také patří mezi významné složky organických látek. Jejich obsah, který je velmi variabilní vlivem vnějších podmínek, do jisté míry určuje, zda je zrno vhodné pro sladovnické účely. Za optimum pro sladovnický ječmen se pokládá obsah dusíkatých látek vyjádřený jako obsah bílkovin ($N \times 6,25$), v rozmezí 10 až 11,5 %. Doporučení ČSN 46 1100-5 pak vychází z rozmezí 10 – 12 %. [24] Vysoký obsah dusíkatých látek v zrne ječmene je nežádoucí, snižuje se extrahovatelnost zrna, dochází k narušení poměru mezi rozpustnými a zásobními bílkovinami. Bílkoviny jsou při klíčení přednostně štěpeny a dodávají hlavní množství rozpustných bílkovin. Celkově lze dusíkaté látky rozdělit do dvou skupin a to jako: [1]

- dusíkaté látky typu bílkovin a jejich štěpných produktů (aminokyseliny, peptidy, peptony, albumosy a pravé bílkoviny – proteiny,

- dusíkaté látky nebílkovinné povahy (některé dusíkaté báze, složky fosfatidů, malé množství amidů a amonných solí).

Významnou úlohu v procesu posklizňového dozrávání ječmene mají aminokyseliny a peptidy s SH - skupinou (glutathion a cystein), které zajišťují indukci dýchacího systému zrna a syntézu proteinů, enzymových komplexů a nových tkání. V procesu sladování se působením proteolytických enzymů endopeptidas a exopeptidas zvyšuje v zrně hladina celkového aminodusíku a volných aminokyselin. Štěpení vysokomolekulárních dusíkatých látek a zvyšování obsahu volných aminokyselin pokračuje i při hvozdění až do tzv. enzymové fáze sušení. Obsah bílkovin nelze zcela ovlivnit výběrem odrůdy, neboť více než 80 % proměnlivosti znaku je dáno agroekologickými podmínkami ročníku. [25]

Ze sladařského hlediska jsou velmi důležité enzymy, přítomné jak v latentní, tak v aktivní formě. Převažují zde hydrolytické enzymy (amylolytické, proteolytické, cytololytické enzymy a fosfatasy). Působení enzymů níže uvedených tříd se projevuje v jednotlivých fázích vývoje zrna a v celém sladařsko-pivovarském procesu v různé míře. Oxidoreduktasy hrají důležitou úlohu při dozrávání, skladování a klíčení ječmene. Transferasy jsou důležité při dozrávání ječmene, v období posklizňového klidu a při klíčení. Hydrolasy mají rozhodující význam v technologii sladování i v dalším procesu výroby piva. Isomerasy mají podobné uplatnění jako lyasy. Podílejí se na metabolismu uhlíku, dusíku, lipidů a polyfenolů. Ligasy ječmene a sladu jsou důležité enzymy při biosyntéze škrobu, bílkovin, aminokyselin, velký význam mají především v růstovém procesu při klíčení ječmene, tvorbě kořínků a stříšky. Aktivita enzymů vzrůstá v procesu sladování. Narůstá již při máčení, dále prudce stoupá až do třetího dne klíčení a pak se již mění zvolna. K poklesu dochází na konci hvozdění. [1]

Anorganické látky (popeloviny) tvoří podstatně menší podíl sušiny než organické látky. Jejich obsah kolísá mezi 2 až 3 %. Množství jednotlivých minerálních látek v rostlině je značně ovlivněno jejím zásobením živinami během růstu i zrání a podmínkami při pěstování. Význam anorganických látek spočívá především v regulaci biosyntézy vysokomolekulárních organických sloučenin (škrobu, bílkovin, nukleových kyselin apod.). Velký význam mají stopové prvky obsažené v ječmeni, např. Zn, Mn, Cu a B, které jsou důležité pro činnost řady enzymů nebo koenzymů. [1]

2.2 Polyfenolové látky

Polyfenoly jsou obecně označovány jako organické fenolické látky s více než jednou hydroxylovou skupinou v molekule. [26] Z chemického hlediska jsou polyfenoly třísloviny s vysokou molekulovou hmotností, ve vodě nebo alkoholu se zpravidla rozpouštějí na roztoky s kyselým pH. S bílkovinami a těžkými kovy dávají nerozpustné sloučeniny. [27] Fenolické látky mají díky své struktuře schopnost tvořit relativně stabilní radikály. Tato skutečnost je zapříčiněna interakcí hydroxylové skupiny a π -elektronů benzenového kruhu. Díky této vlastnosti fenoly mohou mít v organismu důležitou biologickou roli. Působí jako antioxidanty a začleňují se do různých oxidačních procesů, které jsou radikály zprostředkované. Za dobré antioxidanty jsou považovány fenolické sloučeniny, které mají benzenový kruh se dvěma hydroxylovými skupinami substituovaný v poloze *ortho*. Fenolické hydroxylové skupiny mohou být snadno ionizovány, látka pak má vlastnosti slabé kyseliny a je dobrým H-donorem při tvorbě vodíkových vazeb. Z toho pak vyplývá schopnost některých polymerních fenolů, které mají ve struktuře takovýchto donorových skupin velké množství, tvořit stabilní komplexy s jinými molekulami. [28]

Polyfenoly mohou působit třemi mechanismy. [29] Jako:

- lapače kyslíkových volných radikálů, reaktivních forem kyslíku,
- jako inhibitory lipoxxygenas, katalyzujících oxidaci mastných kyselin,
- jako chelatační činidlo omezující přenos kovových iontů, katalyzátorů oxidačních reakcí (železo, měď).

Fenolické látky jsou sloučeniny v přírodě běžné. Jedná se o sloučeniny, které mají ve své struktuře benzenové jádro substituované alespoň jednou hydroxylovou skupinou. Můžeme je nalézt ve všech vegetativních částech rostliny. Obsah fenolických látek v jednotlivých rostlinných částech (např. listy, plody, pecky, semena) se ale významně liší. Odlišnosti ve struktuře a vlastnostech jednotlivých fenolických látek určují sensorické vlastnosti materiálu i jeho vhodnost pro využití v potravinářství a významně ovlivňují kvalitu potravin rostlinného původu. [30] Fenolické látky vykazují antioxidantní vlastnosti, mají antibakteriální účinky a mohou ovlivňovat autoimunitní systém živočišných organismů. [31] Rostlinné fenoly mají důležitou roli v řadě fyziologických procesů. Mohou vystupovat např. jako přenašeče elektronů, strukturní či impregnační látky nebo signální molekuly. Mohou rostlinu chránit před UV zářením nebo se podílet na lákání opylovačů apod. [32] Mezi rostlin-

né fenolické látky řadíme jak strukturně jednoduché molekuly, tak různé makromolekulární polymery. Z jednoduchých fenolických látek jsou to např. kyselina gallová, *p*-hydroxybenzoová, ferulová, kávová a jiné. Mezi složité polyfenolické sloučeniny patří například strukturní polymer lignin, suberin a kutin. Například lignin je komplexním polymerem, na jehož syntéze se jako meziprodukty podílí kyseliny *p*-kumarová, ferulová a sinapová. Strukturu ligninu pak tvoří alkoholy odvozené od těchto hydroxyskořicových kyselin redukcí karboxylové skupiny – *p*-kumaryl alkohol, koniferyl alkohol a sinapylalkohol. [28, 31]

Jedná se o látky velmi různorodé, jednotný systém jejich dělení nebyl zatím vypracován. Obecné třídění podle počtu uhlíků udává Velíšek.

Tab. 5: Hlavní skupiny fenolových sloučenin [33]

Základní skelet	Počet C	Skupina
C ₁	6	jednoduché fenoly, benzochinony
C ₆ – C ₁	7	fenolové kyseliny
C ₆ – C ₂	8	acetofenony, fenylactová kyselina
C ₆ – C ₃	9	skořicové kyseliny, fenypropeny, kumariny, chromony
C ₆ – C ₃	10	naftochinony
C ₆ – C ₁ - C ₆	13	xanthony
C ₆ – C ₂ - C ₆	14	stilbeny, antrachinony
C ₆ – C ₃ - C ₆	15	flavonoidy, izoflavonoidy
(C ₆ – C ₃) ₂	18	ligniny, neolignany
(C ₆ – C ₃ - C ₆) ₂	30	bioflavonoidy
(C ₆ – C ₃ - C ₆) _n	n	flavolany
(C ₆ – C ₃) _n	n	lignin

2.2.1 Zdravotní účinky

Na zdraví člověka mají polyfenoly pozitivní vliv. [33] Polyfenolové látky mají silné antioxidační účinky, organismu neutralizují nebezpečné volné radikály. Ty ohrožují cévy v lidském organismu a jsou rizikovým faktorem také pro buňky, ve kterých mohou vyvolat zhoubné bujení. Snižují tedy riziko rakoviny, poskytují ochranu před srdečními chorobami, protože snižují tvorbu krevních sraženin. [34] Zdroje uvádějí, že rostlinné polyfenoly jsou

v naší potravě nejvýznamnějšími přirozenými potravními antioxidanty hnedka vitamínem C. Polyfenoly, především tedy flavonoidy zlepšují vstřebávání některých vitamínů a minerálních látek. V mnoha experimentálních studiích bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů. [35] Navíc se jim přisuzují účinky antioxidační, antikarcinogenní, antimikrobiální a protizánětlivé.

Ferguson uvádí, že tyto vlastnosti by mohly být přínosem v oblasti prevence onemocnění a ochrany stability genomu. [36] Antikarcinogenní účinky má flavonol katechin, epikatechin a v poslední době zejména epigallokatechin.[37] Katechinu jsou připisovány také účinky protisklerotické a schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Kladné zdravotní účinky vykazuje zejména flavonol kvercetin a jeho glykosidy. [35]

Resorpce polyfenolů probíhá v tenkém a tlustém střevě ve formě glykosidů nebo esterů. Metabolismus je po přestupu přes střevní stěnu podobný metabolismu léčiv, kdy fenolická látka se váže na glukuronovou kyselinu nebo glycin, nebo podléhá methylaci. Další reakce následně probíhají v játrech. Teprve až konjugované polyfenoly se váží na povrch LDL částic a zabraňují tak jejich oxidaci. [38]

2.3 Sladové polyfenoly

Polyfenolové látky sladu i chmele mají vliv na antioxidační aktivitu a senzorickou stabilitu piva. Nacházejí se zejména v obalových částech zrna a v aleuronové vrstvě, jsou tedy vně endospermu. Jejich množství se pohybuje od 0,1 do 0,6 % sušiny, záleží to však na odrůdě a místě pěstění. V literatuře se uvádí, že přibližně 70 – 80 % polyfenolů piva pochází ze sladu, 20 – 30 % připadá na chmelové polyfenoly. [39] Zrno ječmene je tvořeno přibližně z 80 % flavanolů, 19 % flavonolů, 5 % fenolových kyselin a 2 % apolárních sloučenin. Polyfenolové látky ječmene jsou vázány v buněčných stěnách s proteiny a polysacharidy.

Fenolové sloučeniny byly v cereáliích nalezeny jak ve volné, tak i vázané formě. Obvykle volné fenolové sloučeniny jsou proanthokyanidiny nebo flavonoidy, zatímco vázané sloučeniny jsou esterově vázané do polymerů buněčné stěny. Z vázaných polymerů je nejvíce zastoupena kyselina ferulová. [40]

Ječmen představuje potenciál pro ve vodě rozpustné polyfenolové antioxidanty i další redukující látky. V průběhu klíčení ječmene dochází enzymovou činností k uvolňování polyfenolů, zastoupení jednotlivých frakcí vodou extrahovatelných polyfenolů v ječmeni a sla-

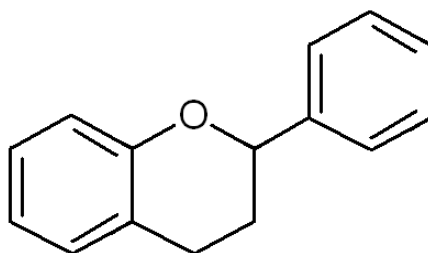
du je rozdílné. Proto je z pivovarského hlediska důležité sledování obsahu a vlastností látek, které přecházejí ze sladu do roztoku v průběhu rmutování. Dle specifikace analytických parametrů ležácké pivo s označením „České pivo“ musí obsahovat 130 až 230 mg·l⁻¹ celkových polyfenolů. [29] Část polyfenolových látek sladiny je v průběhu chmelovaru, kvašení a zrání piva vyloučena z roztoku, další část je odstraněna koloidní stabilizací piva sorbenty polyfenolů. Obsah rozpustných polyfenolů ve sladu je tak nezanedbatelným faktorem pro kvalitu piva. V ječmeni je většina polyfenolů vázána na cukernou složku. Nejčastěji to bývá D-glukosa, L-rhamnosa, ale může to být i kyselina glukuronová. Přírodní polyfenolické látky pocházející z ječmene, resp. sladu vykazují výrazné antioxidační účinky, které se projevují především v inhibici oxidačních přeměn lipidických složek a tím blokování procesů stárnutí piva. [32]

Dělí se na dvě velké skupiny. Do první skupiny patří flavonoidy, které se dále dělí na flavany, antokyany a flavonoly. Druhou skupinu tvoří fenolické kyseliny zahrnující deriváty hydroxybenzoové kyseliny (kys. salicylová, gentisová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, gallová, vanilinová a syringová) a deriváty skořicové kyseliny (kys. *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová). [41]

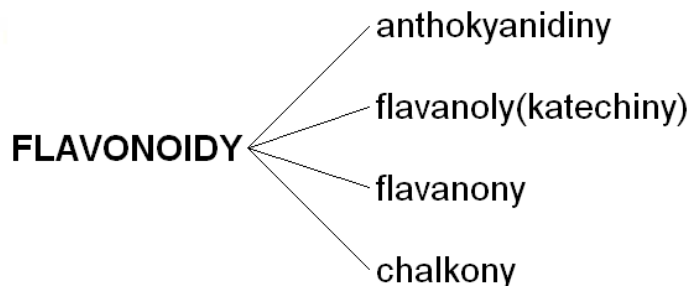
2.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou v přírodě nejrozšířenější skupinou polyfenolů, v současnosti je známo více jak 4000 flavonoidních látek a stále jsou objevovány nové. [33] Jejich struktura je odvozena od heterocyklického flavanu, který se skládá ze dvou benzenových jader spojených pyranem. [29]

Obr. 2: Struktura heterocyklického flavanu

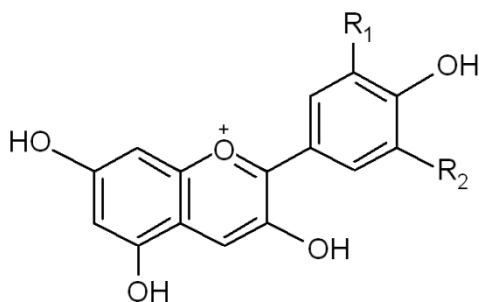


Obr. 3: Dělení flavonoidů [42]



Anthokyanidiny jsou ve vodě rozpustné pigmenty modré, fialové až červené barvy. Volné anthokyanidiny se vyskytují v přírodě jen zřídka, a to pouze jako stopové produkty hydrolyzy antokyanů nebo vzniklé z leukoanthokyanidinů (zvaných též proanthokyanidiny, v pivovarství známých pod názvem anthokyanogeny). Anthokyanogeny mají z hlediska chuti a koloidní stability piva zvláštní význam. Jsou přítomny v aleuronu a jejich nosičem je bílkovina hordein. Při zahřátí v kyselém prostředí se mění na barevné anthokyanidiny. U některých odrůd mohou být přítomny volné kyanidiny (ozimé ječmeny), nebo delfinidiny. Tyto aktivní flavan-3,4-dioly mají však malou molekulu na to, aby reagovaly s proteiny. [1]

Obr. 4: Anthokyanidin [42]



Tab. 6: Anthokyanidin [42]

Anthokyanidin	R ₁	R ₂
pelargonidin	H	H
kyanidin	OH	H
delfinidin	OH	OH
peonidin	OCH ₃	H
petunidin	OCH ₃	OH
malvinidin	OCH ₃	OCH ₃

Leukoanthokyanidiny jsou látky příbuzné delfinidinu a kyanidinu. Jsou to bezbarvé sloučeniny, ale produkty, které z nich vznikají v průběhu enzymového hnědnutí, jsou významnými barvami potravin. Oligomery těchto sloučenin se vyznačují trpkou chutí a nazývají se, jak už bylo výše řečeno, třísloviny neboli taniny. Leukoanthokyanidiny se vyskytují ve formách jako:

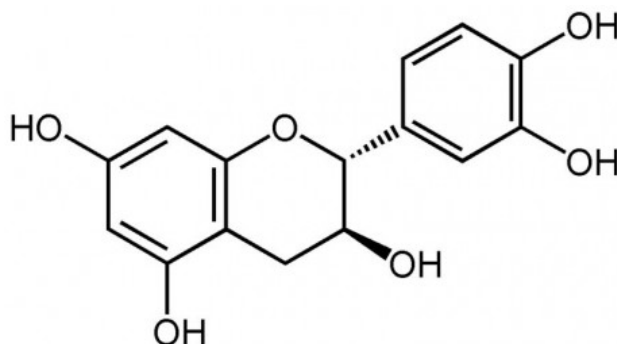
- monomerní glykosidy (anthokyaniny), nebo aglykony (anthokyanidiny)
- biflavonoidní proanthokyanidiny (anthokyanogeny)
- polymerní anthokyaniny
- oxidované a polymerní formy základních flavonoidních složek.

Flavanonová struktura vzniká izomerací chalkonů enzymem chalkonizomerasou a následná oxidace vzniklé struktury vede ke vzniku flavonolů, zatímco redukcí vznikají flavanoly (např. katechiny). Výsledkem flavanolové kondenzace může být syntéza proanthokyanogenů. Vzniklé krátké polymery s méně než 10 jednotkami se označují jako oligomery, zatímco delší řetězce polymerů jsou nazývány taniny. [33]

Kumarinové deriváty, přítomné v ječmeni i sladu, se vyskytují jako volné aglykony nebo glykosidy, obvykle β -D-glykosidy se strukturou odvozenou od laktónů o-hydroxykyselin, zejména o-hydroxyskořicové kyseliny, resp. kumarinu. Tyto látky jsou regulátory klíčení. [44]

Flavan-3-oly, látky odvozené od flavanu, na rozdíl od leukoanthokyanidinů nejsou hydrolyticky dále štěpitelné. Mezi hlavní zástupce se řadí katechin a gallokatechin a jejich stereoisomery epikatechin a epigallokatechin. Jejich významnou schopností je kondenzační schopnost. Produkty, vzniklé kondenzací, jsou nerozpustné ve vodě a mají schopnost srážet bílkoviny (tzv. tříslovinná síla), čehož se využívá v pivovarnictví při chmelovaru. Nejčastěji a v nejvyšších koncentracích vyskytující se dimer je prodelfinidin B3 a prokyanidin B3. Ve sladu je přítomen z flavan-3-olů katechin v množství $25 - 75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, prodelfinidin B3 $186 - 372 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a prokyanidin B3 $130 - 276 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. [40] Mezi hlavní zástupce v ječmeni se řadí flavonoidní proanthokyanidiny, propelargonin, prokyanidin a prodelfinidin. Většina vědců souhlasí s tvrzením, že proanthokyanidiny hrají hlavní roli v tvorbě nebiologických zákalů piva. [39]

Obr. 5: Katechin [42]



Chinony a ubichinony přecházejí do piva z ječmene a sladu jako minoritní složky a jsou spojeny s oxidoredukčními přeměnami. Jako základní chinony byly určeny v ječmeni 2-methoxy-1,4-benzochinon, 2,6-dimethoxy-1,4-benzochinon a 2-methoxychinon.

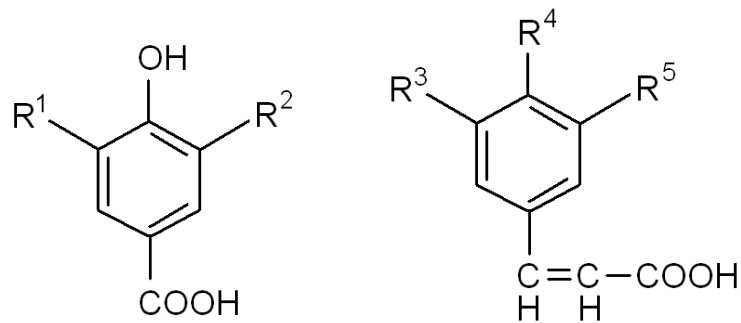
2.3.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny přítomné v ječmeni můžeme rozdělit do dvou skupin. Substituované deriváty kyseliny benzoové a substituované deriváty kyseliny skořicové. Hydroxybenzoová a hydroxyskořicová kyselina jsou také přítomné ve formě glykosidických esterů v ječném zru. [29] Mnohé z nich mají vlastní funkci inhibitorů klíčení, při máčení ječmene dochází k částečnému vyluhování. [1] Ve skutečnosti je antioxidační kapacita díky těmto vázaným sloučeninám asi dvakrát vyšší než aktivita fenolových kyselin ve formě volné. [45]

Kyseliny hydroxyskořicová a hydroxybenzoová jsou známé jako primární antioxidanty působící jako akceptory volných radikálů.

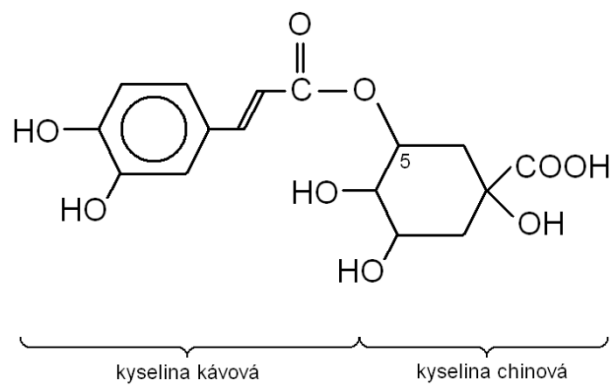
Tab. 7: Deriváty kyseliny *p*-hydroxybenzoové a kyseliny skořicové [32]

deriváty kys. <i>P</i> -hydroxybenzoové	R ₁	R ₂	deriváty kys. skořicové	R ₃	R ₄	R ₅
k. <i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H	k. skořicová	H	H	H
k. protokatechová	OH	H	k. <i>p</i> -kumarová	H	OH	H
k. gallová	OH	OH	k. kávová	H	OH	OH
k. vanilinová	H	OCH ₃	k. ferulová	H	OH	OCH ₃
k. syringová	OCH ₃	OCH ₃	k. sinapová	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obr. 6: Kyselina *p*-hydroxybenzoová a kyselina skořicová [42]

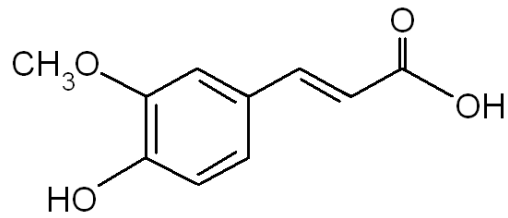
Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová.

Obr. 7: Kyselina chlorogenová [42]



Ferulová kyselina (4-hydroxy-3-methoxyskořicová) patří mezi hlavní vázané nízkomolekulární fenolové kyseliny v zrna ječmene a vyskytuje se především v jeho vnějších vrstvách. V průběhu sladování se její obsah zvyšuje až dvojnásobně. Velký význam má antioxidační aktivita ferulové kyseliny v ječmeni a biochemickém procesu výroby piva. [41]

Obr. 8: Kyselina ferulová [42]



V ječmeni jsou přítomny také tanoidy. Jsou to nízkomolekulární až středně molekulární polyfenolické látky. Omezují koloidní stabilitu piva reakcí s polypeptidy a tvoří s nimi zákal. Obecně se dává do vztahu s intenzitou hořkosti, chuti a plnosti piva. [1]

Fenolové sloučeniny, které dodávají sladu antioxidační schopnost, hrají důležitou úlohu v organoleptické stabilitě piva, a to potlačením oxidačních procesů během výroby a skladování. Odstranění těchto sloučenin pro zlepšení koloidní stability může způsobit zhoršení organoleptické stability piva. Polyfenolické látky ovlivňují nejen celkovou trvanlivost, ale i senzorycké vlastnosti produktu. Obecně se podílejí na chemicko-fyzikální stabilitě piva, na odolnosti proti stárnutí, oxidaci a na formování pěny. [1]

3 METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Pro analýzu polyfenolických látek je nutné vypracovat metody na izolaci polyfenolů a následné analytické stanovení.

Sledovat můžeme:

- celkovou antioxidační aktivitu
- celkový obsah polyfenolických látek
- skupiny polyfenolů
- jednotlivé látky.

Metody vyžadují speciální vybavení a technické dovednosti pro analýzu.

3.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny nebo směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Měly bychom rozlišovat dva pojmy, a to antioxidační kapacita a aktivita. Antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku, zatímco aktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu. [46]

Antioxidační aktivita potravinových složek se vyznačuje svými příznivými biologickými účinky potravin na zdraví člověka. [47] V rostlinných zdrojích bylo identifikováno několik tisíc fytonutrientů, faktorů s mimonutriční aktivitou, které mají vliv na řadu biochemických reakcí. Tyto látky již v malých koncentracích mají schopnost zpomalovat nebo rušit nežádoucí oxidační reakce. Tato aktivita je dána jejich relativně vyšším oxidačně-redukčním potenciálem, schopností rychle odstranit reaktivní formy kyslíku a další volné radikály, schopností chelátově vázat katalyticky aktivní prvky, redukovat meziprodukty řetězových oxidačních změn, nebo stimulovat aktivity endogenních antioxidačních enzymů. Většina antioxidantů přírodního původu je přijímána jako součást složitých směsí, jejichž jednotlivé složky mohou různými mechanismy reagovat s různými radikály. Mezi látky vykazující vysokou antioxidační aktivitu patří právě polyfenolové látky obsažené v ječmeni. [48]

Volné radikály jsou molekuly, které mají ve své valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů. Taková molekula bývá značně nestabilní, a rychle se snaží získat ze svého okolí jiný elektron od páru. Molekula, která ztratila elektron, se stává novým radikálem, rychle

se oxiduje a ztrácí některé své potřebné vlastnosti. Reakce probíhá velmi rychle. Řetězová reakce probíhá tak dlouho, dokud se volný radikál nesetká s antioxidantem, který reakci zpomalí nebo zastaví. [47]

3.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivita, jak již bylo výše řečeno, poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku.

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl některými autory zejména v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity, TAA). Přestože hodnocení antioxidačních vlastností přírodních látek je v oblasti výzkumu věnována široká pozornost, je třeba připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám již v trávicím traktu a jejich účinek v organismu je dále podstatně ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. [35]

Pro měření celkové antioxidační aktivity vzorku, která je prokazatelná v potravinách, i čistých sloučeninách, byla zavedena řada testů. Každá metoda se vztahuje k tvorbě různých radikálních forem, jejich mechanizmy účinku se liší. [49]

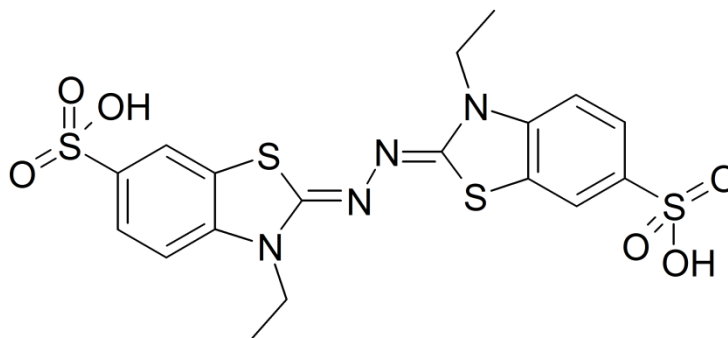
Možností praktického využití výsledků systematického hodnocení TAA potravin rostlinného původu je několik. Mohou být používány jako alternativní kritérium biologické hodnoty potravin, nebo jako srovnávací znak potravin v závislosti na různých podmínkách jejich získávání a úschovy (odrůdy, technologie, způsob skladování, klimatické a agrotechnické podmínky apod.). Souhrnně lze stanovení TAA potravin hodnotit jako snahu standardními postupy určit fyziologicky interpretovatelnou antioxidační účinnost vzorku, a to způsobem, který by byl metodicky, materiálově a instrumentálně dostupný a dostupný k početným sériovým analýzám. Existuje několik metod pro stanovení a vyjádření TAA. [50]

3.2.1 Metoda TEAC (metoda používající ABTS)

Tato metoda patří mezi základní a nejpoužívanější metodu pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA.

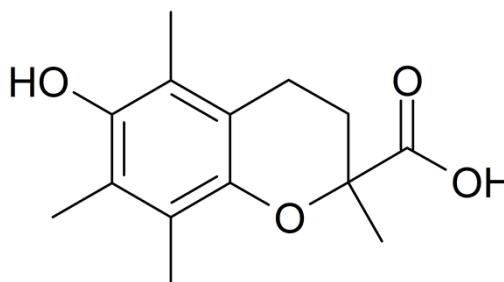
Principem ABTS testu je sledování inaktivace radikálového kationtu $ABTS^{\cdot+}$, který vzniká oxidací ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonátu)).

Obr. 9: ABTS [42]



Aktivačním činidlem, je tady AAHP, tj. 2,2-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid, H_2O_2 v přítomnosti peroxidasy, hexakynoželeznatanu tetradraselného $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ či peroxodisíranu draselného $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. [50] $\text{ABTS}\cdot+$ má silnou absorbanci ve viditelné oblasti 600 – 750 nm, takže antioxidační aktivita může být snadno stanovena spektrofotometricky. $\text{ABTS}\cdot+$ má výraznou modrozelenou barvu a reakcí s antioxidantem se redukuje a odbarvuje. TEAC vyjadřuje počet radikálových kationtů $\text{ABTS}\cdot+$ inaktivovaných jednou molekulou antioxidantu. Metoda je označována také jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je látka rozpustná ve vodě. [35] Omezením této metody je její malá selektivita při reakci s donory vodíkových atomů. Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá a provedení má široké uplatnění, od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu, až po směsné vzorky. Test je vhodný pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů. [51, 52]

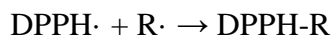
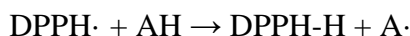
Obr. 10: Trolox [42]



3.2.2 Metoda DPPH

DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) je zkratka pro organickou chemickou sloučeninu. Jedná se o tmavý, barevný, krystalický prášek složený ze stabilních volných radikálových molekul. [53] Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity jak čistých látek, tak i různých směsných vzorků. Radikál DPPH· je v metanolovém roztoku relativně stabilní, zbarvení tohoto roztoku je modrofialové působením železité soli. [35]

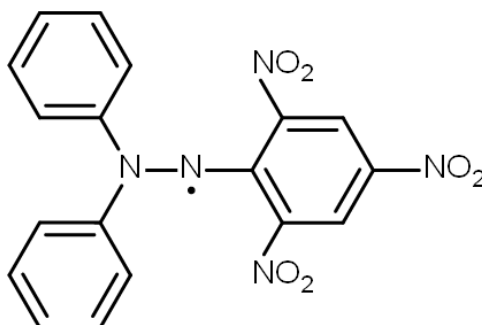
Metoda spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH. [54] Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Po přidání vzorku se radikál zhasí, a tím se roztok odbarvuje. Níže je uvedena reakce radikálové formy DPPH, který je redukován antioxidantem (AH), nebo radikálem (R) a přechází do stabilní formy [46]



Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. [48] Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm.

Antioxidační aktivita může být vyjádřena různými způsoby včetně procentuálního podílu činidla a oxidační inhibice rychlosti. Jednodušší způsob jak prezentovat antioxidační aktivitu je společný referenční standard. [46, 55] Jako standard se používá Trolox, kyselina gallová, epikatechin, nebo kyselina askorbová, která byla použita při měření v této diplomové práci.

Obr. 11: DPPH [42]



3.2.3 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na redukcí železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl_3), které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé). Po redukcí se vytváří barevné produkty, jakým může být např. berlínská modř. Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu $[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ je mírou antioxidační aktivity vzorku. Metoda má své limity, spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH(3,6). [46, 56] Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat. Reakce je nespecifická. V polovině reakce, která má nižší redoxní potenciál, ji bude řídit železnatý iont. [35]

3.2.4 Metoda ORAC

Jde o metodu hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů. Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je založena na schopnosti peroxylového radikálu zhaset fluorescenční barviva. Peroxylové radikály využívané u této metody jsou generovány ve vodném roztoku z hydrochloridu 2,2'-azobis-2-metyl-propanimidamidu. Při absenci inhibitoru radikály snižují fluorescenci barviva fluoresceinu. Smyslem této metody je reakce antioxidantů (fenolických látek) s peroxylovými radikály v přítomnosti fluoresceinu. Antioxidační aktivitu je možno změřit u hydrofilních i lipofilních vzorků. [57, 74]

3.3 Celkový obsah polyfenolických látek

Metody stanovují celkové množství polyfenolů ve vzorku.

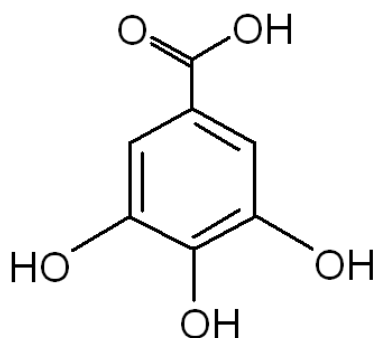
3.3.1 Metoda FCM

Folin-Ciocalteuovo činidlo je zářivě žlutý roztok. Připraví se rozpuštěním 10 g wolframu sodného a 2,5 g molybdenanu sodného v 70 ml vody. Dále se přidává 5 ml 85 % kyseliny fosforečné a 10 ml koncentrované HCl. Pak probíhá zpětný tok (reflex) po dobu 10 hodin. Poté se přidá 15 g síranu litného, 5 ml vody a 1 kapka bromu. Následuje opět zpětný tok 15 min, poté zchlazení na pokojovou teplotu a roztok je přenesen do 100 ml vody. V roztoku vznikají šestimocné komplexy – fosfomolybdenové kyseliny či wolframové kyseliny. [58]

Folin-Ciocalteuovo činidlo je tedy tvořeno směsí kyseliny fosfowolframové ($H_3PW_{12}O_{40}$) a kyseliny fosfomolybdenové ($H_3PMo_{12}O_{40}$), která se po oxidaci fenolů redukuje na směs modrých oxidů wolframu (W_8O_{23}) a molybdenu (Mo_8O_{23}). Tyto modré pigmenty mají maximální absorpci závislou na složení fenolických směsí, také na pH, obvykle se zde přidává uhličitan sodný. Zbarvení roztoku činidla je způsobeno přenosem elektronů k zásaditému pH a redukcí komplexů fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny. Vytvořené modré zbarvení silně absorbuje v oblasti $\lambda = 765$ nm a je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolových sloučenin. [59, 60]

Pro tuto spektrofotometrickou metodu, jinak nazývanou Gallic acid Equivalent (GAE), slouží jako standard kyselina gallová. Výsledná hodnota je přepočítávána na ekvivalentní množství právě této kyseliny. [61]

Obr. 12: Kyselina gallová [42]



3.3.2 Metoda EBC

Celkové polyfenoly jsou v pivovarské praxi stanoveny dle metody EBC (European Brewery Convention), kdy jsou polyfenoly extrahovány dimethylformalamidem nebo acetonem. Polyfenoly reagují s trojmocnými ionty železa v alkalickém prostředí, a dochází k tvorbě červeně zbarveného komplexu. Intenzita vzniklého zbarvení je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. Běžné hodnoty u ječmene a sladu se pohybují od 0,400 – 0,650 % v sušině vzorku. [51]

3.4 Skupiny polyfenolů

Pomocí této metody se stanovují různé skupiny polyfenolů obsažené v ječmeni, jako např. anthokyanogeny.

3.4.1 Stanovení anthokyanogenů dle Harrise a Rickettse

Pro stanovení anthokyanogenů (leukoanthokyanidinů) se v pivovarnictví používá kolorimetrická metoda dle Harrise a Rickettse. Stanovení anthokyanogenů v ječmeni je důležité především pro kontrolu kvality odrůd ječmene. Polyfenoly ze vzorku se absorbují na polyamidový prášek, a následně jsou extrahovány směsí butanol-HCl. Obsah přítomných polyfenolů je stanoven spektrofotometricky na základě změření absorbance červeně zbarveného komplexu oxoniové soli při vlnové délce 550 nm. Závislost obsahu anthokyanogenů na naměřené absorbanci je tabelována a výsledky je možno odečíst z tabulky. [51, 62]

Běžné hodnoty pro sladovnické ječmeny se pohybují od 0,1 do 0,6 % anthokyanogenů v sušině vzorku. [29]

3.5 Jednotlivé polyfenoly

Při stanovení jednotlivých antioxidantů se uplatňují různé typy chromatografie (plynová, kapalinová) s různými typy detekce (fluorescenční, hmotnostní, UV/VIS, elektrochemický). [53]

Základním problémem použití plynové chromatografie (GC) je nízká těkavost fenolových sloučenin. Z tohoto důvodu se její využití omezuje především na stanovení jednoduchých fenolových kyselin a nízkomolekulárních flavonoidů. Hydroxylové skupiny je nutno převést na ethery, případně estery. K derivatizaci bývá nejčastěji použita trialkylsilylová sku-

pina, nejčastěji v podobě trimethylsilylových derivátů. [51] Lepší výsledky byly dosaženy při použití kapalinové chromatografie HPLC, resp. CE s FLD (fluorescenčním), UV/VIS a zejména s DAD (PDA) detektorem. Bylo dosaženo uspokojivé selektivity zejména v případě DAD detektoru (schopnost snímat spektra stanovených látek v celém vlnovém rozsahu), problémem je však nízká citlivost (mez detekce). Je to způsobeno tím, že molekula polyfenolu neobsahuje, kromě hydroxylových skupin a dvojných vazby, žádné významné chromofory, což je molekula odpovědná za absorpci záření. Poměrně solidní výsledků se podařilo docílit v oblasti studia kvality a struktury fenolických látek za pomoci spojení HPLC – MS. Nevýhodou je zde však vysoká cena přístrojů a také potřeba předkoncentrace a dokonalého předčištění vzorku před vlastní analýzou. [51, 64]

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

V rámci teoretické části diplomové práce bylo cílem:

- popsat sladovnický ječmen, proces sladování a stručnou charakteristiku nejvýznamnějších druhů sladů,
- provést literární rešerši chemického složení sladu, především látek s antioxidační povahou,
- popsat metody, jakými lze antioxidační aktivitu stanovit.

Cílem části praktické bylo:

- vhodnými metodami prozkoumat změnu antioxidační aktivity a obsah celkových polyfenolů v jednotlivých fázích výroby sladu,
- výsledky následně zpracovat a porovnat s odbornou literaturou.

5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity 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-Ciocalteuova činidla, které spolu s měřeným vzorkem a uhličitánem sodným reaguje do modrého zbarvení, u kterého se stanoví absorbance.

5.1 Vzorky

Sladovna Soufflet ČR, a.s. (Prostějov) pro potřeby diplomové práce poskytla vzorky ze všech částí technologického procesu. Prostějovská sladovna, sídlo společnosti, kde byla v roce 1869 spuštěna první výrobní kampaň, je vybavena cylindrokónickými náduvníky, které umožňují intenzivní provzdušňování, převrstvování ječmene tlakovým vzduchem a odsávání CO₂. Sladovna je vybavena dvěma klíčícími linkami, kdy každá z nich obsahuje 6 klíčících skříní. Tyto moderní sladovací linky se zařízením od firmy Laussman byly postaveny v roce 1994. Průběh klíčení je regulován chladícím zařízením s možností sprchování a dokrápění. Hvozdění se uskutečňuje na jednolískových hvozdech. [65]

Během technologického procesu sladování byly odebírány vzorky pro stanovení chemických analýz ve třech řadách po 10 kusech, tj. celkem 30 vzorků (A1, A2, A3, ... , B1, B2, B3, ... , C1, C2, C3, ...) Podmínkou byla stejná odrůda, v tomto případě odrůda SEBASTIAN^{CPG}. [11] Pro reprezentativnost výsledků byl odběr vzorku uskutečňován ve stejnou dobu a z několika míst klíčící skříně. Byly odebrány vzorky ječmene z náduvníku, tedy po prvním máčení. Vzorek po druhém máčení byl odebrán už z první klíčící skříně. Postupně následovaly odběry ze všech klíčících skříní. Před samotným odběrem po fázi hvozdění se odebral vzorek i z fáze předsoušení a také odpad, tzv. sladový květ. Každému vzorku byl bezprostředně po jeho odebrání udělen kód, jak uvádí následující tabulka (Tab. 7).

Tab. 8: Místa odběru vzorků odrůdy SEBASTIAN^{CPG}

		VZOREK		
MÁČENÍ	Náduvník	A1	B1	C1
KLÍČENÍ	1. klíčící skříň	A2	B2	C2
	2. klíčící skříň	A3	B3	C3
	3. klíčící skříň	A4	B4	C4
	4. klíčící skříň	A5	B5	C5
	5. klíčící skříň	A6	B6	C6
	6. klíčící skříň	A7	B7	C7
HVOZDĚNÍ	Předsušení	A8	B8	C8
	Hotový slad	A9	B9	C9
SLADOVÝ KVĚT		A10	B10	C10

Odběr proběhl v těchto termínech:

Řada A: 13. 2. 2012 – 20. 2. 2012

Řada B: 14. 2. 2012 – 21. 2. 2012

Řada C: 15. 2. 2012 – 22. 2. 2012

Doba mezi odběrem vzorků a následnou úpravou pro extrakci byla přibližně 2 hodiny. Analýza byla provedena v únoru 2012 na Ústavu technologie a mikrobiologie potravin, Fakultě technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

5.1.1 Příprava vzorků

Z důvodu nestability polyfenolických složek na světle a vzduchu byly vzorky rozemlety na elektrickém mlýnku vždy těsně před extrakcí. Po rozemletí bylo naváženo s přesností 0,01 g 5 g vzorku. Navážený a homogenizovaný vzorek byl kvantitativně převeden do Erlenmayerovy baňky, kde se smíchal s 50 ml metanolu. Extrakce probíhala 24 hodin při pokojové teplotě. Po extrakci byl vzorek přefiltrován přes filtrační papír a získaný filtrát byl následně použit pro jednotlivá stanovení.

5.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteuovým činidlem

5.2.1 Princip metody Folin-Ciocalteuovým činidlem

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

5.2.2 Instrumentace

- UV-VIS spektrofotometru (UV-mini-1240)
- analytické váhy Labicom
- odměrné baňky 10 ml
- mikropipety s nastavitelným objemem 10 – 100 mikrolitru (Biohit proline), 100 - 1000 mikrolitru (Intech)
- syringe filtr (Chromservis)

5.2.3 Chemikálie

- kyselina gallová – standard (Sigma Aldrich Německo)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (PENTA)
- uhličitan sodný bezvodý (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- redestilovaná voda

5.2.4 Pracovní postup

Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů

Pro metodu používající Folin-Ciocalteuovo činidlo byla použita jako standard kyselina gallová. Pro vytvoření zásobního roztoku byla kyselina gallová rozpuštěna v destilované vodě na koncentraci $4000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Do šesti odměrných baněk o obsahu 10 ml byla ze zásobního roztoku ředěním připravena kalibrační řada o koncentracích 50, 100, 200, 400, 600 a $800 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a slepý vzorek. Nejprve se připravil slepý vzorek, který obsahoval 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a 1,5 ml 20 % Na_2CO_3 , a doplnil se po rysku destilovanou vodou. Dále se do odměrných baněk napipetoval roztok kyseliny gallové tak, aby řada obsahovala

koncentrace 50, 100, 200, 400, 600 a 800 mg·l⁻¹. Do každé baňky se poté přidalo 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a 1,5 ml 20 % Na₂CO₃, a doplnilo se destilovanou vodou po rysku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 765 nm proti slepému vzorku. Z naměřených výsledků byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance (%) na koncentraci kyseliny gallové (mg·l⁻¹). Kalibrační křivky byly nutné zhotovovat před každým měřením, protože během práce a skladování Folin-Ciocalteuovo činidla může docházet ke změnám a následným odchylkám při měření.

Vlastní stanovení obsahu celkových polyfenolů

Nejprve byl připraven slepý vzorek (blanc), který obsahoval 0,5 ml Folin-Ciocalteuho činidla a 1,5 ml 20 % Na₂CO₃ a množství bylo doplněno po rysku v 10 ml odměrné baňce. Reakční směs se vzorkem byla připravena z 0,1 ml zfiltrovaného extraktu, 0,5 ml Folin-Ciocalteuho činidla a 1,5 ml 20 % Na₂CO₃. Tato směs byla v 10 ml baňce doplněna destilovanou vodou po rysku. Před samotným měřením na spektrofotometru se vzorek do kyvetky z důvodu zákalu filtroval přes syringe filtr 0,45 μm. Absorbance byla, stejně jako roztoku kyseliny gallové, měřena při vlnové délce 765 nm. Každý vzorek se měřil 2 krát vedle sebe, vše bylo proměřeno 3 krát. Podle kalibrační rovnice regresní křivky se vypočítal obsah celkových polyfenolů jednotlivých vzorků a vyjádřil se jako kyselina gallová v mg v 1 kg vzorku. [50]

5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity spektrofotometricky metodou DPPH

5.3.1 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. Vzájemná reakce má za následek postupné odbarvování reakčního prostředí a postupné snižování absorbance ve stanovovaném roztoku.

5.3.2 Instrumentace

- UV-VIS spektrofotometru (UV-mini-1240)
- analytické váhy Labicom

- odměrné baňky 25 ml
- mikropipety s nastavitelným objemem 10 – 100 mikrolitru (Biohit proline), 100 - 1000 mikrolitru (Intech), 500 – 5000 mikrolitru (Labmate+)

5.3.3 Chemikálie

- DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazil) (Sigma Aldrich Německo)
- kyselina askorbová - standard (Lukeš, s.r.o.)
- metanol (Penta)

5.3.4 Pracovní postup

Příprava zásobního roztoku DPPH

Na analytických vahách se navážilo 24 mg DPPH, kvalitativně převedlo do 100 ml baňky a doplnilo metanolem po rysku. Roztok se promíchal a uchovával při -18°C. Před použitím se vytemperoval na laboratorní teplotu.

Příprava pracovního roztoku DPPH

Odebralo se 10 ml zásobního roztoku DPPH a přidalo se 45 ml metanolu. Pracovní roztok se neuchovával.

Kalibrační křivka kyseliny askorbové pro stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro metodu DPPH byla jako standard použita kyselina askorbová. Byl vytvořen zásobní roztok rozpuštěním této kyseliny v destilované vodě na koncentraci 800 mg·l⁻¹. Do pěti odměrných baněk o objemu 10 ml byla ze zásobního roztoku ředěním připravena kalibrační řada o koncentracích 40, 80, 120, 160 a 200 mg·l⁻¹. Do dalších pěti odměrných baněk o objemu 25 ml se nepipetuje 8,55 ml pracovního roztoku DPPH. Z připravených kalibračních roztoků o koncentraci 40, 80, 120, 160 a 200 mg·l⁻¹ se paralelně odpipetuje 450 μl a přidá do odměrných baněk s pracovním roztokem DPPH. Po 60 minutách, kdy byla reakční směs uchovávána ve tmě, se změří absorbance při vlnové délce 515 nm. Dále se změří absorbance pracovního roztoku DPPH (hodnota A₀), která se zahrnuje do rovnice úbytku absorbance.

$$\text{Úbytek absorbance (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

A_0 = absorbance pracovního roztoku

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

Podle jednotlivých výpočtů úbytků absorbancí se sestaví kalibrační křivka na kyselinu askorbovou.

Vlastní stanovení celkové antioxidační aktivity

Do odměrných baněk o objemu 25 ml se odpipetovalo 8,55 ml pracovního roztoku DPPH a 450 μ l vzorku. Reakční směs se ponechala 60 minut ve tmě. Poté byla měřena absorbance při vlnové délce 515 nm. Podle kalibrační rovnice regresní křivky se vypočítá celková antioxidační aktivita vzorků a vyjádří se jako kyselina askorbová v mg v 1 kg vzorku. Výsledky jsou tedy udávány jako ekvivalentní množství kyseliny askorbové (AAE – Ascorbic Acid Equivalent).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

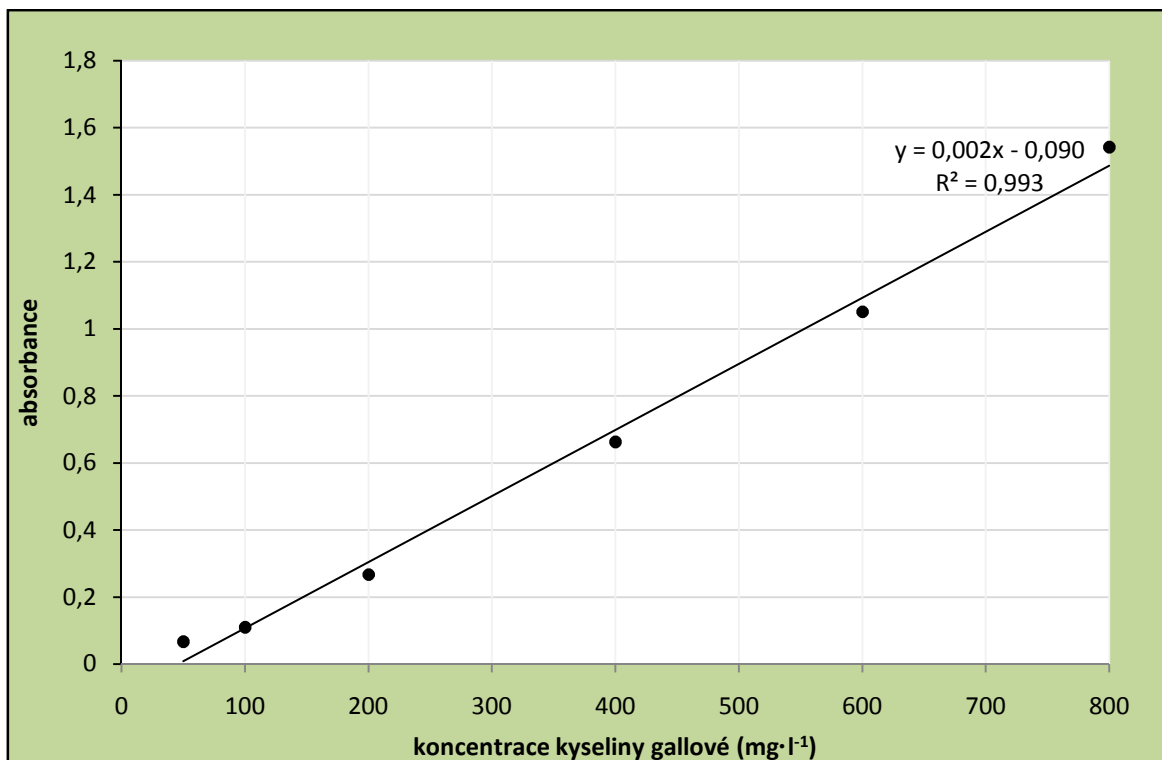
V předchozí kapitole byla popsána metodika a přístrojové vybavení použité při jednotlivých analýzách. Tato část se bude zabývat nejen výčtem získaných výsledků, ale také interpretacemi závěrů, které z nich vyplývají.

6.1 Metoda FCM

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení barevných produktů reakce hydroxylových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin-Ciocalteu. Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje směsi fosfomolybdenu a fosfowolframu, které reagují s fenolickými látkami obsaženými v měřených vzorcích a dochází tak k jejich redukci. Metoda a postupy byly podrobněji popsány v kapitole 5.2.

Kalibrační přímka s hodnotou spolehlivosti 99,38 % je uvedena v grafu (Graf. 2).

Graf. 2: Závislost změny absorbance na množství kyseliny gallové



Pro stanovení obsahu celkových polyfenolů byly připraveny a měřeny vzorky tří po sobě jdoucích řad odrůdy Sebastian z různých fází technologického procesu výroby sladu (náduvník, 6 klíčících skříní, předsoušení, vyhvozděný slad a sladový květ). Celkově bylo tedy měřeno 30 vzorků.

Každý jednotlivý vzorek obsahoval 2 rozdílné navážky a tedy i dvě odlišné extrakce. Každý ze dvou extraktů byl následně 3 krát proměřen. Pro naměřené hodnoty první a druhé extrakce byly z rovnice regrese $y = 0,002x - 0,0901$ kalibrační přímky vypočteny výsledky, vyjádřené v mg kyseliny gallové na 1 kg čerstvých rozemletých vzorků. ($\text{mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$). Byla vypočtena také směrodatná odchylka měření. Hodnota y charakterizuje hodnoty naměřené u vzorků, hodnota x je po výpočtu obsah polyfenolů vyjádřený jako ekvivalent standardu – kyseliny gallové ve vzorku. Nakonec byla vypočtena průměrná hodnota.

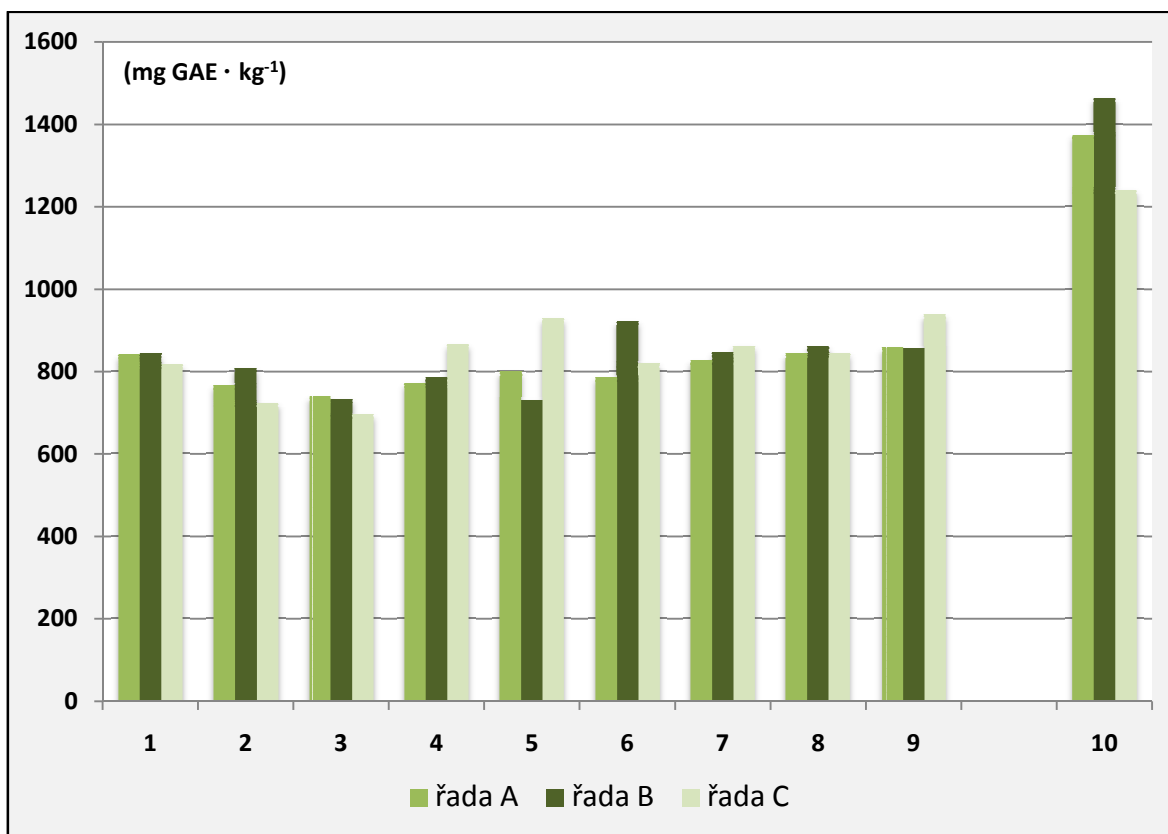
Současně s každou novou sérií stanovení byla provedena kalibrace na celkové polyfenoly vyjádřené jako kyselina gallová v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Graf. 2).

Tab. 9: Průměrné hodnoty stanovení celkového obsahu polyfenolů za použití metody FCM

	A		B		C		prům. x	S.D.
	y_A	x_A	y_B	x_B	y_C	x_C		
1	0,078	840,917	0,079	843,833	0,073	816,333	833,694	12,334
2	0,063	767,167	0,072	808,000	0,055	723,000	766,056	34,710
3	0,058	738,833	0,056	732,583	0,049	696,333	722,583	18,736
4	0,064	771,750	0,067	785,083	0,083	865,083	807,306	41,216
5	0,070	799,250	0,056	731,333	0,096	929,250	819,944	82,114
6	0,067	785,500	0,094	922,167	0,074	820,500	842,722	57,964
7	0,075	826,750	0,079	847,167	0,082	862,167	845,361	14,515
8	0,079	843,833	0,082	861,750	0,079	845,500	850,361	8,082
9	0,082	858,000	0,081	855,083	0,097	937,750	883,611	38,300
10	0,185	1373,833	0,203	1463,000	0,158	1240,500	1359,111	91,430

Výsledné hodnoty stanovení spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteu jsou graficky znázorněny v grafu (Graf. 3).

Graf. 3: Stanovení celkových polyfenolů v jednotlivých fázích výroby za použití metody FCM



Pro stanovení obsahu celkových polyfenolů byly použity vzorky odebrané v průběhu procesu sladování, od nádavníku přes 6 klíčících skříní, až po vyhvozděný slad. Pro reprezentativnost výsledků byly vzorky odebírány v každém technologickém kroku celkem 3x (ve třech řadách). Přesný postup je uveden v kapitole 5.1 (Tab. 7).

Celkové množství polyfenolů závisí na odrůdě, pěstebním místě a ročníku. Čím je vyšší obsah bílkovin, tím nižší bývá obsah polyfenolů. [66] Literatura uvádí, že celkový obsah polyfenolů v ječmeni je $879 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 24,0 \text{ S.D.}$ [66]

Z grafu vyplývá, že celkové množství polyfenolů v průběhu technologických kroků sladování má kolísavý charakter s tendencí mírného nárůstu. Od začátku máčení došlo k mírnému poklesu z $833,694 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1) na $722,583 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ (2), což zname-

nalo pokles o 15%. Od začátku klíčení (3) byl zaznamenán mírný nárůst obsahu polyfenolů až k 6. klíčící skříni (7). Zde hodnoty dosahovaly svého maxima, 845,361 mg GAE·kg⁻¹ (nárůst o 1,4 % od začátku procesu sladování). Hodnota celkového obsahu polyfenolů dosáhla svého maxima, 883,611 mg GAE·kg⁻¹ (9), tedy celkový nárůst od začátku sladování až po vyhovzděný slad byl o 4,5 %. Guido a Moreira uvádí, že během sladařského procesu je znatelné snížení vázaných polyfenolů a naopak dojde ke zvýšení esterifikované frakce. [43]

Polyfenoly se nacházejí zejména v obalových částech zrna a aleuronové vrstvě. [39] To vysvětluje výsledky množství polyfenolů ve sladovém květu, kde byla naměřena hodnota 1359,111 mg GAE·kg⁻¹. Pro analýzu sladového květu byla použita stejná navážka jako u zbývajících vzorků, odebraných v jednotlivých fázích procesu. Výsledky ukazují, že odpad (sladový květ) obsahuje o 53,8 % více celkových polyfenolů než ve vyhovzděném sladu. V obalových vrstvách je obsažena hlavně kyselina ferulová a kumarová. [67]

Fytochemikálie jsou považovány za nejdůležitější zdroj antioxidantů v obilovinách a existují ve volné a vázané formě. Většina volných polyfenolů jsou flavanoly, zatímco vázané fenoly jsou hlavně fenolové kyseliny. Volné formy fenolových složek jsou však obsaženy zřídka ve srovnání s estery, glykosidy a vázanými komplexy. [68]

6.2 Metoda DPPH

Stanovení celkové antioxidační aktivity bylo prováděno metodou DPPH. Radikál DPPH vzniká v roztoku s metanolem. Za přítomnosti antioxidačních látek ve vzorku je tento radikál zhasen díky antioxidantům a dochází k odbarvení původně modrofialového roztoku, jehož absorbance byla měřena spektrofotometricky. Metoda a postupy byly podrobněji popsány v kapitole 5.3.

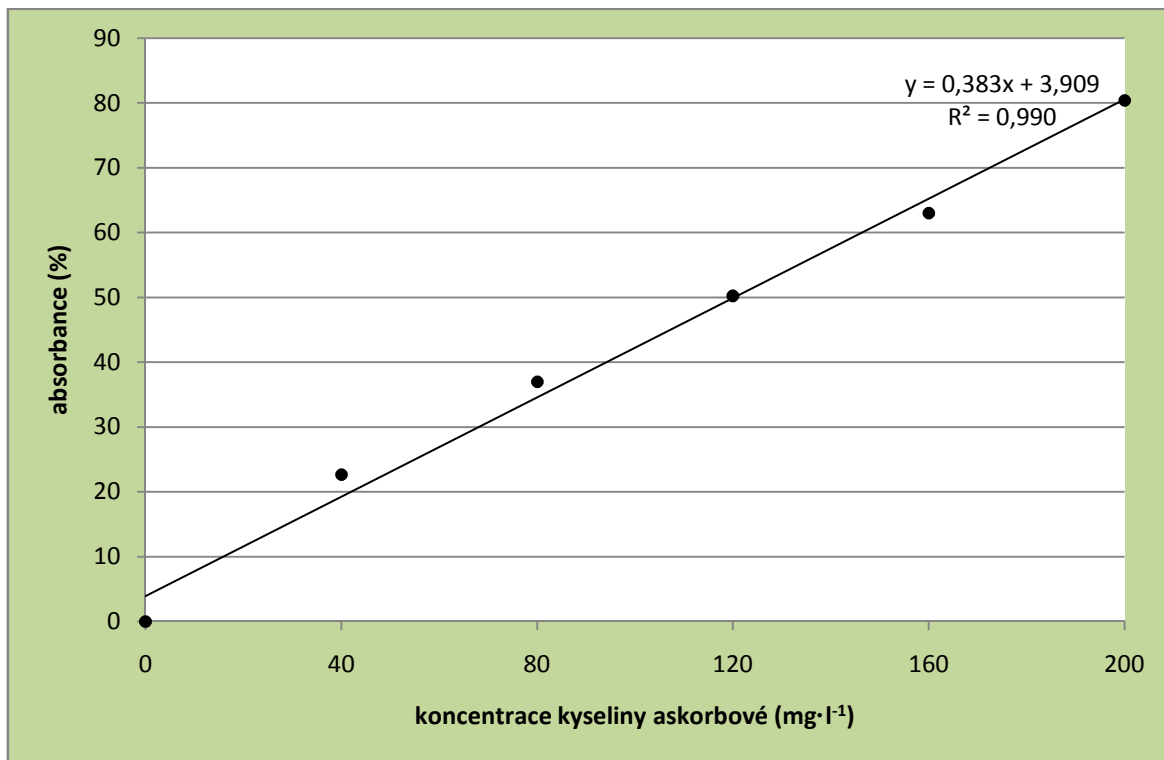
Kalibrační přímka úbytku absorbance na koncentraci kyseliny askorbové s hodnotou spolehlivosti 99,08 % je znázorněna v grafu (Graf. 4).

Úbytek absorbance byl vypočten podle vzorce:

$$\text{Úbytek absorbance (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

Kde A_1 je absorbance vzorku a A_0 je absorbance pracovního roztoku DPPH.

Graf. 4: Závislost úbytku absorbance A na koncentraci kyseliny askorbové za použití metody DPPH



Pro stanovení celkové antioxidační aktivity byly vzorky připraveny a změřeny na spektrofotometru stejným způsobem jako u metody sledující celkový obsah polyfenolů. Každý vzorek byl tedy dvakrát samostatně extrahován a z hodnot z jednotlivých extraktů byly vypočteny hodnoty úbytků absorbancí podle vzorce. Z těchto hodnot byla vypočítána podle rovnice regresní přímky $y = 0,3831x + 3,9091$ celková antioxidační aktivita vyjádřená jako mg kyseliny askorbové na 1 kg čerstvých rozemletých vzorků ($\text{mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$). Byla vypočtena také směrodatná odchylka měření. V rovnici hodnota y vyjadřuje hodnoty naměřené u vzorků, x pak antioxidační aktivitu vyjádřenou jako ekvivalent redukční účinnosti standardu – kyseliny askorbové ve vzorku. Poté byla vypočítána průměrná hodnota.

Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity v jednotlivých fázích výroby řady A, B a C jsou uvedeny v tabulce (Tab. 9).

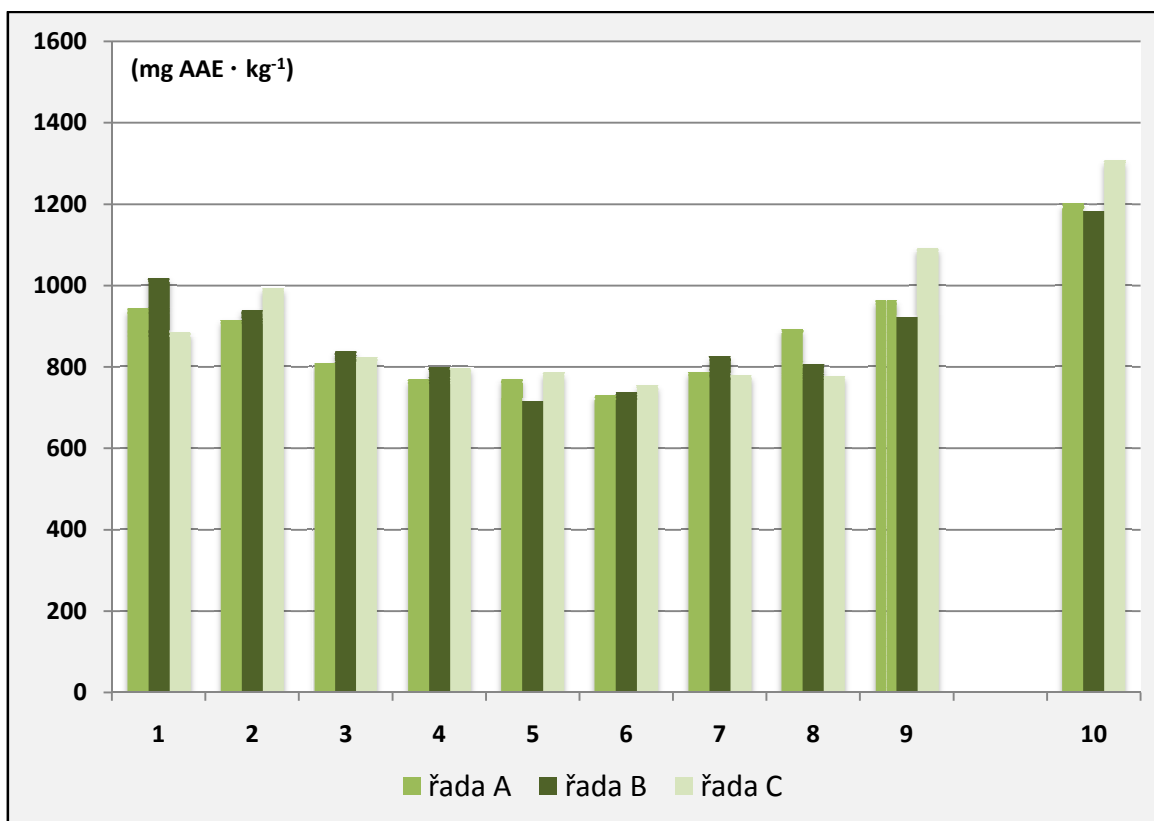
Tab. 10: Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity za použití metody

DPPH

	A		B		C		prům. x	S.D.
	y_A	x_A	y_B	x_B	y_C	x_C		
1	40,010	942,342	42,909	1017,998	37,785	884,255	948,198	60,414
2	38,970	915,202	39,902	939,526	41,990	994,019	949,582	16,442
3	34,872	808,231	36,048	838,910	35,400	822,000	823,047	2,039
4	33,376	769,171	34,520	799,026	34,450	797,209	788,469	28,548
5	33,426	770,487	31,318	715,462	34,013	785,805	757,252	6,569
6	31,901	730,672	32,124	736,480	32,787	753,782	740,311	39,460
7	34,057	786,957	35,521	825,156	33,734	778,508	796,874	18,924
8	38,140	893,518	34,829	807,098	33,710	777,890	826,168	8,741
9	40,769	962,157	39,195	921,064	45,756	1092,324	991,849	17,647
10	49,924	1201,122	49,225	1182,885	53,991	1307,286	1230,431	1,676

Výsledné hodnoty stanovení spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteu jsou graficky znázorněny v grafu (Graf. 5).

Graf. 5: Stanovení celkové antioxidační v jednotlivých fázích výroby za použití metody DPPH



Antioxidační aktivita byla měřena u stejných vzorků jako u měření celkového obsahu polyfenolů.

Řada polyfenolických látek funguje jako inhibitory klíčení. Při máčení ječmene se částečně vyluhují. [66] Toto je patrné v grafu (Graf. 5), kde v náduvníku (1) je po první vodě hodnota nejvyšší, naměřená hodnota byla $948,198 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Po druhém máčení v první klíčící skříni (2) nastává mírný pokles antioxidační aktivity (o 9 %) s naměřenou hodnotou $949,582 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. V průběhu klíčení (3 – 7) hodnota zprvu klesá (o 40 % vzhledem k ječmeni po první vodě) do svého minima v 6. klíčící skříni ($740,311 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$). Z grafu je patrné, že se vzrůstající vlhkostí klesá antioxidační aktivita zrna.

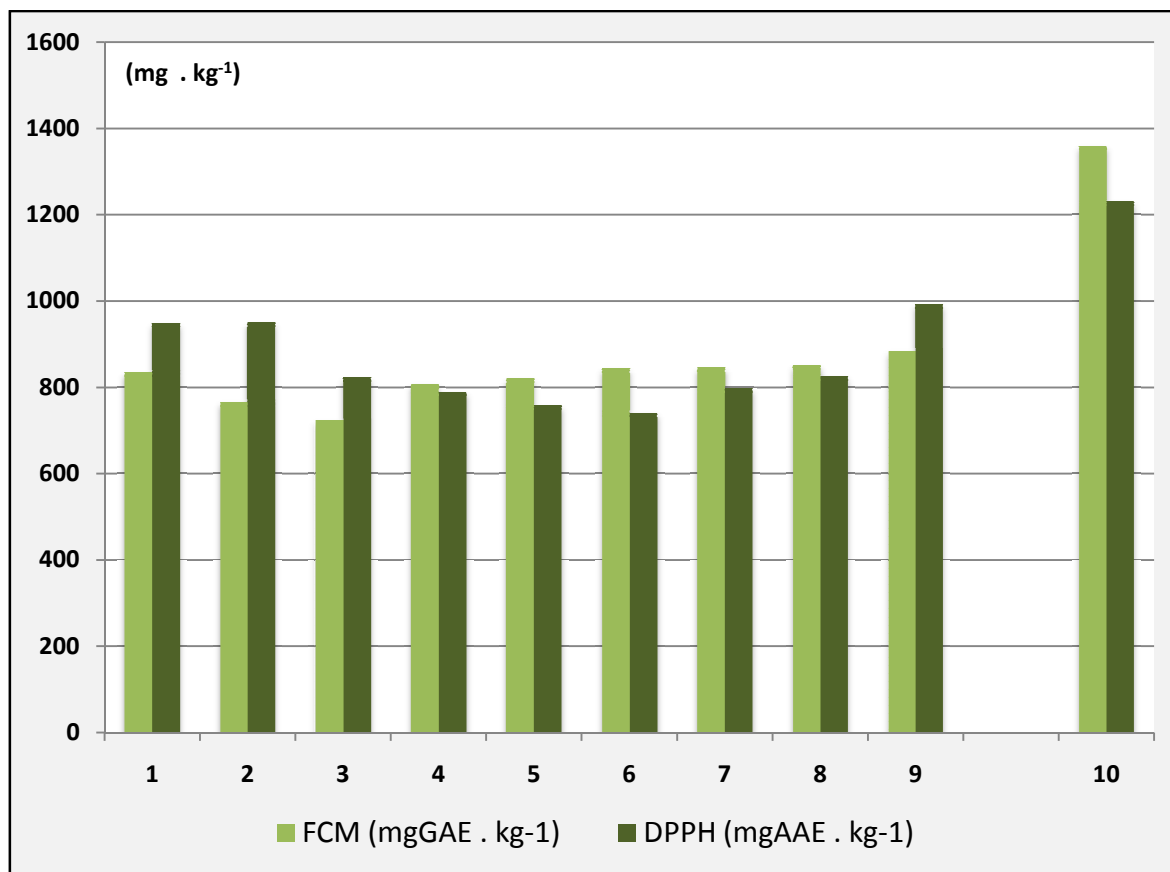
S počátkem předsušování a samotným hvozděním se hodnota antioxidační aktivity navýšila. Hodnota po hvozdění byla $991,849 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ vzorku, což je navýšení o 4,6 %. Tuto změnu uvádí ve svém článku také Guido a Moreira [43], kteří říkají, že antioxidační aktivita sušiny vzorku se obecně zvyšuje v průměru o 6 %. Zvýšení může být způsobeno produkty neenzymatického hnědnutí během sladování, jako jsou produkty Maillardových reakcí, které mohou také sloužit jako antioxidanty, zejména pak melanoidiny.

Většina polyfenolických sloučenin sladu je v nerozpustné vázané formě. [70] Jak již bylo uvedeno v teoretické části (kap. 2.3.2), mezi fenolové kyseliny ječmene a sladu patří deriváty hydroxybenzoové kyseliny (gallová, vanilinová a syringová) a deriváty kyseliny skořicové (kávová, *p*-kumarová a ferulová). [32] Další poznatky zjistil Samaras, při reakci ferulové kyseliny s meziprodukty Maillardových reakcí, které se vytvořily z glukózy a prolinu při teplotě hvozdění, což vede ke zvýšení antioxidační aktivity. Toto zvýšení nebo snížení závisí hlavně na obsahu proanthokyanidinů a na uvolnění fenolů z vázané formy během sladování. [71]

Guido a Moreira také uvádí, že navýšení antioxidační aktivity sladu oproti ječmeni není u všech odrůd pravidlem. To dokazuje například odrůda Amulet, Bojos a také Malz, u kterého bylo naměřeno naopak snížení aktivity o necelých 20 %. [43] V roce 2011 byl právě Malz nejpěstovanější odrůdou jarního ječmene v České a Slovenské republice. Má výběrovou kvalitu a je doporučen Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva. [13] Z toho vyplývá, kvalita není přímo úměrná antioxidační aktivitě ječmene po vyhvozdění.

6.3 Porovnání metod

Graf. 6: Porovnání celkových polyfenolů a antioxidační aktivity v průběhu sladování



Vývoj množství celkových polyfenolů a antioxidační aktivity se v grafu jemně kopíruje s menšími odchylkami, čím se potvrdilo tvrzení z literatury, že antioxidační aktivita je závislá na množství polyfenolických látek v ječmeni. [72] Hodnoty měření vzorku antioxidační aktivity po hvozdění jsou vyšší ve srovnání s celkovým obsahem polyfenolů. Na zvýšení antioxidační aktivity se podílejí tedy nejenom samotné polyfenoly, ale také produkty Maillardových reakcí, melanoidiny.

Obsah celkových polyfenolů v ječmeni ($833,694 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$) po prvním máčení byl nižší, než antioxidační aktivita, která byla $948,198 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. V průběhu klíčení nastala změna, kdy celkový obsah polyfenolů mírně vzrostl na $842,722 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$; naopak antioxidační aktivita klesla na $740,311 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Po hvozdění (9) došlo u obou měřených parametrů k nárůstu, $833,661 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ u polyfenolů a $991,849 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ u

aktivity. V odpadním materiálu, sladovém květu (10), byl sledován markantní nárůst; u celkových polyfenolů na $1359,111 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ a u antioxidační aktivity na $1230,431 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ vzorku.

ZÁVĚR

Suroviny pro výrobu piva jsou bohaté na antioxidační a polyfenolové látky, které přecházejí do varného procesu. Procházejí různými změnami během technologických operací a dostávají se až do hotového výrobku. Polyfenoly jsou důležité pro koloidní stabilitu piva, jeho barvu a mají vliv na charakter hořkosti. Řada fenolových látek je nositelem žádoucích antioxidačních účinků a patří mezi ochranná opatření biologických systémů. Z tohoto hlediska svými vlastnostmi vzbuzují stále větší zájem a pozornost, proto je žádoucí, provádět stále nové studie.

V rámci diplomové práce bylo cílem zkoumat změnu antioxidační aktivity a obsah celkových polyfenolů v průběhu jednotlivých fází výroby sladu (náduvník, 6 klíčících skříní a vyhvozděný slad). Ve všech případech se jednalo o výrobky Sladovny Soufflet ČR, a.s. Vývoj těchto změn byl sledován v praxi běžně používanými metodami instrumentální analýzy.

U analyzovaných vzorků ječmene a sladu byla stanovena antioxidační aktivita metodou DPPH spektrofotometricky. Metoda je založena na reakci syntetického radikálu s antioxidanty ve vzorcích, kde se spektrofotometricky stanovuje úbytek absorbance. Hodnoty vzorků ze začátku procesu sladování, tedy máčení, vykazovaly menší množství antioxidační aktivity než vzorky odebrané v průběhu klíčení. Aktivita měřená u ječmene z náduvníku po prvním máčení byla $948,198 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$, a po druhém máčení z první klíčící skříně byla $949,580 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Začátkem klíčení se hodnoty začaly mírně snižovat od hodnoty $823,047$ až k 5. klíčící skříní, kde byla hodnota $740,311 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ve fázi předsoušení, kdy množství vody je sníženo na 41 %, se hodnota začala zvyšovat. Po hvozďení obsahoval slad 2 % vody a hodnotu antioxidační aktivity $991,848 \text{ mg AAE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Hodnota antioxidační aktivity sladu bylo o 4,6 % větší než aktivita naměřená u ječmene z náduvníku.

Pro stanovení celkových polyfenolů byla použita metoda Folin-Ciocalteuovým činidlem se spektrofotometrickým stanovením. Metoda je založena na stanovení barevných produktů reakce hydroxylových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin-Ciocalteu. Vzorek po prvním máčení, kdy obsahoval 33 % vody, dosahoval hodnoty $833,694 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ vzorku. V průběhu klíčení, kdy obsah vody byl 43 %, vzorek dosahoval hodnot v rozsahu $722,583 - 845,361 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ s tendencí nepatrného vzestupu. Výrazné rozdíly

mezi jednotlivými fázemi klíčení však nebyly pozorovány. Hodnota vyhovzděného sladu mírně stoupla na 883,611 mg GAE·kg⁻¹.

Antioxidační aktivita ani celkový obsah polyfenolů se v průběhu klíčení výrazně neměnil. Po hvozdní došlo k mírnému vzestupu. Literatura uvádí, že obalové vrstvy obsahují největší množství polyfenolických látek. [39] Toto tvrzení se měřením potvrdilo, hodnota antioxidační aktivity sladového květu byla 1230,431 mg AAE·kg⁻¹ a celkový obsah polyfenolů sladového květu byl 1359,111 mg GAE·kg⁻¹.

Obsah polyfenolických látek sladu je sledován z důvodu posouzení kvality vstupní suroviny pro výrobu piva a je závislý na mnoha faktorech, jako jsou vybraná odrůda ječmene, vliv faktorů na růst rostliny, podmínky při zpracování a skladování, zvolené technologii výroby atd.

Využití těchto poznatků změny antioxidační aktivity a změny obsahu celkových polyfenolů během technologického procesu sladování umožní přizpůsobit proces tak, aby ve finálním výrobku byl zachován optimální obsah antioxidačních a polyfenolických látek, které jsou důležité jak pro samotnou výrobu, tak i pro zdraví člověka.

Pro celistvost práce by bylo vhodné obohatit analýzu o měření pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, díky které se zjistí obsahy jednotlivých fenolových sloučenin různých frakcí. Pro spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity bych doporučila měření doplnit metodou ABTS, která vykazuje větší účinnost než metoda DPPH. [73]

Tato práce by mohla být pro Sladovny Soufflet ČR, a.s. přínosná pro porovnání výsledků s Výzkumným ústavem sladařským v Brně, kde jsou tyto analýzy pravidelně prováděny.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOSAŘ, Karel a Stanislav PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [2] ČERNÝ, Ladislav, Marie VÁŇOVÁ a Miroslav ONDERKA. *Jarní sladovnický ječmen: pěstitelský rádce*. Vyd. 1. Praha: Pro katedru rostlinné výroby, FAPPZ, ČZU v Praze vydalo vydavatelství Kurent, 2007, 39 s. Rostlinná výroba. ISBN 978-80-87111-04-8.
- [3] BIOLOGICAL LIBRARY. *BioLib: Hordeum vulgare* [online]. 2011 [cit. 2012-04-28]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id893112>
- [4] BENADA, Jaroslav. *Metodika pěstování jarních obilnin: ječmen jarní, oves, pšenice jarní*. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, 2001, 143 s. ISBN 80-902-5454-3
- [5] Osobní informace od Ing. Antonína Dlapy, AGROFERT Holding a.s., získané dne 2.4.2012
- [6] POLÁK, Bohumil, Marie VÁŇOVÁ a Miroslav ONDERKA. *Základy pěstování sladovnického ječmene: ječmen jarní, oves, pšenice jarní*. 1. vyd. Praha: Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství České republiky, 1993, 27 s. Rostlinná výroba. ISBN 80-710-5042-3.
- [7] ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. *Definitivní údaje o sklizni 2011* [online]. 2012, 14.2.2012 [cit. 2012-04-28]. Dostupné z: <http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/p/2102-12>
- [8] CHLOUPEK, Oldřich, Blanka PROCHÁZKOVÁ a Eva HRUDOVÁ. *Pěstování a kvalita rostlin: pěstitelský rádce*. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005, 178 s. Rostlinná výroba. ISBN 978-80-7157-897-02009.
- [9] BASAŘOVÁ, Gabriela a Jan ČEPIČKA. *Sladařství a pivovarství*. Praha: SNTL, 1985.
- [10] ROP, Otakar a Jan HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [11] HORÁKOVÁ, Vladimíra, Olga DVOŘÁČKOVÁ a Tomáš MEZLÍK. *Seznam doporučených odrůd 2011, Přehled odrůd 2011: pšenice ozimá, pšenice jarní, ječmen jarní, ječmen ozimý, žito ozimé, tritikale ozimé, oves setý pluchatý, hrách polní: tritikale jarní, oves nahý, bob polní, lupina úzkolistá*. 1. vyd. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2011, 237 s. ISBN 978-80-7401-043-9.

- [12] ČSN 46 1100-5. *Obiloviny potravinářské: Ječmen sladovnický*. Praha: Český normalizační institut, 1993.
- [13] Preferované odrůdy jarního ječmene. *Zemědělec: jeden týdeník pro všechny zemědělce*. 2012, č. 6, s. 48. ISSN 1211-3816.
- [14] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [15] FIŠEROVÁ, Helena, Josef PROKEŠ, HELÁNOVÁ a HARTMAN. Kvality sladu v průběhu posklizňového dozrávání ječmene. *Kvasný průmysl : odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie I*. 2010, roč. 56, č. 2. ISSN 0023-5830.
- [16] ZHANG, Guoping a Chengdao LI. *Genetics and improvement of barley malt quality*. Dordrecht: Springer, c2009. Advanced topics in science and technology in China. ISBN 978-3-030-6382-8.
- [17] BY HANS-DIETER BELITZ, Werner Grosch, Marie VÁŇOVÁ a Miroslav ONDERKA. *Jarní sladovnický ječmen: pěstitelský rádce*. 4. vyd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, 39 s. Rostlinná výroba. ISBN 978-3-54-0699-347.
- [18] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [19] ČESKÝ SVAZ PIVOVARŮ A SLADOVEN. *Pivovarství a sladařství v českých zemích*[online]. Praha, 2011 [cit. 2012-04-28]. Dostupné z: <http://www.cspas.cz/pivo.asp?lang=1>
- [20] Srovnání jakosti jarního ječmene sklizně roku 2000 a 2004. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2005, roč. 51, č. 6. ISSN 0023-5830.
- [21] VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ. *Sladařství: Syllabus k předmětu*. Praha, 2011. Dostupné z: http://eso.vscht.cz/cache_data/1163/www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/sladarstvi.pdf
- [22] HARTMAN, Ivo, Josef PROKEŠ, Alena HELÁNOVÁ a Jiří HARTMAN. Vztah mezi obsahem škrobu v ječmeni a extraktem sladu. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2010, roč. 56, 11-12. ISSN 0023-5830.
- [23] PAULÍČKOVÁ, Ivana, EHRENBERGEROVÁ a Vlasta FIEDLEROVÁ. Evaluation of Barley Grass as a Potential Source of Some Nutritional Substances. *Czech Journal of Food Sciences: potravinářské vědy*. Praha: Česká akademie zemědělských věd,

- 2006, roč. 25, č. 2, s. 65-72. ISSN 12121800. Dostupné z:
<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00089.pdf>
- [24] HŘIVNA, Luděk, Tomáš RADOCH, Tomáš GREGOR a Věra ŠOTTNÍKOVÁ. Vliv aplikace N a S na chemické složení zrna ječmene a sladu. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2011, roč. 57, 7-8. ISSN 0023-5830.
- [25] PROKEŠ, Josef. Technologický význam dusíkatých látek v ječmeni a sladu. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha ve spolupř. se Sahn, s. r. o, 2006, roč. 46, č. 10, s. 277-279. ISSN 0023-5830.
- [26] CHINOY, J a N CHINOY. *The role of ascorbic acid in growth, differentiation, and metabolism of plants*. Hingham, MA: Distributors for the U.S. and Canada, Kluwer Boston, 1984, 322 s. ISBN 90-247-2908-4.
- [27] GRYNOVÁ, Lucie, Veronika ŠKEŘÍKOVÁ, Pavel JANDERA, Vladimír KELLNER a Aleš HORNA. NUTRITION & DIAGNOSTIC. *Porovnání výskytu fenolických látek a flavonoidů v českých a zahraničních pivech metodou HPLC s CoulArray detekcí*. Praha, 2003. Dostupné z: http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/1/L_11C.doc
- [28] PARR, Adrian a BOLWELL. Phenols in the plant and in man: The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the science of food and agriculture*. 2000, roč. 80, č. 7, s. 985-1012. ISSN 1097-0010. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSF
- [29] MIKYŠKA, Alexandr, Ivo HARTMAN a Danuše HAŠKOVÁ. Polyfenolové látky a antioxidační vlastnosti odrůd ječmene doporučených pro České pivo. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2011, roč. 57, 7-8. ISSN 0023-5830.
- [30] IGNAT, Ioana, Irina VOLF a Valentin I. POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, roč. 126, č. 4, s. 1821-1835. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016353>
- [31] HELDT, Hans-Walter a Fiona HELDT. *Plant biochemistry and molecular biology*. New York: Oxford University Press, 1997, 522 s. ISBN 01-985-0179-X.

- [32] *Chemické listy: Polyfenolové látky piva - přirozené antioxidanty*. Praha: Chemické listy, 2002, č. 96. ISSN 1213-7103.
- [33] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [34] BAJPAI, Monika, Anurag PANDE, S. K. TEWARI a Dhan PRAKASH. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2005, roč. 56, č. 4, s. 287-291. ISSN 0963-7486. DOI: 10.1080/09637480500146606. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/09637480500146606>
- [35] PAULOVÁ, Hana a Hana BOCHOŘÁKOVÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek IN VITRO. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179. ISSN 1213-7103.
- [36] FERGUSON, Lynnette. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011, roč. 475, 1-2, s. 89-111.
- [37] MODRIANSKÝ, Martin, Kateřina VALENTOVÁ, Veronika PŘIKRYLOVÁ a Dana WALTEROVÁ. Přírodní látky v prevenci onemocnění trávicího traktu. *Chemické listy*. 2003, č. 97, s. 540-547. ISSN 1213-7103.
- [38] KALÁČ, Pavel. Potravní fytoestrogeny a zdraví žen během klimakteria a po něm. *Výživa a potraviny: časopis Společnosti pro výživu*. Praha: Výživaservis s. r. o., 2006, č. 5, s. 137-139. ISSN 1211-846x.
- [39] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Zuzana SKULILOVÁ. Polyfenoly ječmene a sladu a jejich antioxidační vlastnosti. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2010, roč. 56, č. 3. ISSN 0023-5830.
- [40] MCMURROUGH, Ian, David MADIGAN a Malcolm R. SMYTH. Semipreparative Chromatographic Procedure for the Isolation of Dimeric and Trimeric Proanthocyanidins from Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, roč. 44, č. 7, s. 1731-1735. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf960139m. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf960139m>
- [41] BĚLÁKOVÁ, Sylvie, Karolína BENEŠOVÁ, MIKULÍKOVÁ a SVOBODA. Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2010, roč. 56, č. 6. ISSN 0023-5830.

- [42] KOPLÍK, Richard. ÚSTAV CHEMIE A ANALÝZY POTRAVIN. *Rostlinné fenolové látky a flavonoidy*. Vysoká škola chemicko-technologická. Praha, 2010. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>
- [43] MOREIRA, Manuela, Luis GUIDO, Aguires BARROS, Markéta DVOŘÁKOVÁ, Pavel DOSTÁLEK a Zuzana SKULILOVÁ. Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *The Institute of Brewing & Distilling: Journal of the Institute of Brewing*. 2008, roč. 114, č. 1, s. 27-29. ISSN 0046-9750. Dostupné z: <http://www.scientificsocieties.org/jib/papers/2008/G-2008-0303-538.pdf>
- [44] MOŠTEK, Josef. SLADARŠTVÍ, *Biochemie a technologie sladu*. SNTL, Praha 1975. 480 s. 04-815-75.
- [45] ÚSTAV KVASNÉ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ. *Pivovarství a kvasné technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. ISBN 978-80-7080-015-7.
- [46] ŠULC, Miloslav, LACHMAN a ORSÁK. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*. 2007, č. 101, s. 584-591. ISSN 1213-7103.
- [47] HOLEČEK, Václav, Václav MAŠEK, Hana HECOVÁ, Antonín ZICHA a Jan NETOLICKÝ. Volné radikály a antioxidanty ve stomatologii. *Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství: časopis stomatologických společností*. 2008, 108-56, č. 1, s. 20-23. ISSN 1213-0613.
- [48] FIDLER, KOLÁŘOVÁ a HOLČAPEK. Analýza antioxidantů v pivu a chmelu. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2007, č. 103, s. 232-235. ISSN 0009-2770.
- [49] SERPEN, Arda, Edoardo CAPUANO, Vincenzo FOGLIANO a Vural GÖKMEN. A New Procedure To Measure the Antioxidant Activity of Insoluble Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, č. 19, s. 7676-7681. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf071291z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf071291z>
- [50] ZLOCH, ČELAKOVSKÝ a AUJEZDSKÁ. ÚSTAV HYGIENY LÉKAŘSKÉ FAKULTY UK. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu: Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu Danone*. Plzeň, 2004. Dostupné z: <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>

- [51] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Petr HULÍN. Analytické metody stanovení ve sladinách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha ve spolup. se Sahn, s. r. o, 2006, roč. 52, č. 4, s. 111-114. ISSN 0023-5830.
- [52] PIAZZON, Alessandro, Monica FORTE a Mirella NARDINI. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010-10-13, roč. 58, č. 19, s. 10677-10683. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf101975q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf101975q>
- [53] LEITAO, Celine, Eric MARCHIONI, Martine BERGAENTZLE, Minjie ZHAO, Luc DIDIERJEAN, Behnam TAIDI a Said ENNAHAR. Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011-02-23, roč. 59, č. 4, s. 1249-1255. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf104094c. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf104094c>
- [54] LI, Wende, James FRIEL a Trust BETA. An evaluation of the antioxidant properties and aroma quality of infant cereals. *Food Chemistry*. 2010, roč. 121, č. 4, s. 1095-1102. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.01.056. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610001366>
- [55] ROP, Otakar, MLČEK, JURÍKOVÁ, VALŠÍKOVÁ, SOCHOR, ŘEZNÍČEK a KRAMÁŘOVÁ. Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars. *Journal of medicinal plant research*. 2011, roč. 4, č. 22. ISSN 1996-0875.
- [56] OU, Boxin, Dejian HUANG, Maureen HAMPSCH-WOODILL, Judith A. FLANAGAN a Elizabeth K. DEEMER. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, č. 11, s. 3122-3128. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf0116606. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0116606>
- [57] CRONIN, Joseph R. The Biochemistry of Alternative Medicine: Comparing Antioxidant Values with the ORAC Method. *Alternative and Complementary Therapies*.

- 2004, roč. 10, č. 3, s. 167-170. ISSN 1076-2809. DOI: 10.1089/1076280041138289.
Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/1076280041138289>
- [58] FLUKA ANALYTICAL. *Folin-Ciocalteu's phenol reagent*. Buchs / Switzerland, 2012. Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.Par.0001.File.tmp/47641dat.pdf>
- [59] STRATIL, Pavel, Vlastimil KUBÁŇ a Jitka FOJTOVÁ. Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech Journal of Food Sciences: potravinářské vědy*. Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2008, roč. 26, č. 4, s. 242-253. ISSN 1212-1800. Dostupné z: <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/01961.pdf>
- [60] TIAN, Binqiang, Bijun XIE, John SHI, Jia WU, Yan CAI, Tuoming XU, Sophia XUE a Qianchun DENG. Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*. 2010-04-01, roč. 119, č. 3, s. 1195-1200. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.035. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609010292>
- [61] GORJANOVIC, Stanislava Z., Miroslav M. NOVAKOVIC, Nebojsa I. POTKONJAK, Ida LESKOSEK-CUKALOVIC a Desanka Z. SUZnjevic. Application of a Novel Antioxidative Assay in Beer Analysis and Brewing Process Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010-01-27, roč. 58, č. 2, s. 744-751. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf903091n. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf903091n>
- [62] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarsko-sladařská analytika 2*. Praha: Merkanta, 1993.
- [63] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [64] WHITTLE, Nigel, ELDRIDGE a BARTLEY. Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection. *Journal of the Institute of Brewing*. 1999, roč. 105, č. 2, s. 89-99. ISSN 0046-9750 0046-9750 0368-2587. Dostupné z:
http://www.scientificsocieties.com/jib/papers/1999/1999_105_2_089.pdf
- [65] Osobní informace od Františka Filipka, ředitele Sladovny Soufflet, ČR, a.s., Prostějov, získané dne 5.1.2012

- [66] RAGAEI, S., E ABDELAAL a M NOAMAN. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*. 2006, roč. 98, č. 1, s. 32-38. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.039. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605004632>
- [67] SUBBA RAO, M. V. S. S. T. a G. MURALIKRISHNA. Evaluation of the Antioxidant Properties of Free and Bound Phenolic Acids from Native and Malted Finger Millet (*Ragi*, *Eleusine coracana* Indaf-15). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, č. 4, s. 889-892. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf011210d. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf011210d>
- [68] NARDINI, M. Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*. 2004, roč. 84, č. 1, s. 137-143. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00257-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814603002577>
- [69] GOUPY, Pascale, HUGUES, BOIVIN a Marie Josèphe AMIOT. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the science of food and agriculture*. 1999, roč. 79, č. 12, s. 1625-1624. ISSN 0022-5142. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1625::AID-JSF>
- [70] BONOLI, Matteo, Vito VERARDO, Emanuele MARCONI a Maria Fiorenza CABONI. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, roč. 52, č. 16, s. 5195-5200. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf040075c. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf040075c>
- [71] SAMARAS, Thomas S., Michael H. GORDON a Jennifer M. AMES. Antioxidant Properties of Malt Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, roč. 53, č. 12, s. 4938-4945. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf0501600. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0501600>
- [72] HUBÍK a Jan MAREČEK. Kvalita ječmene. Agroweb: Internetový zemědělský portál [online]. 2008, 2011 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <http://stary.agroweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=8505>
- [73] SERPEN, Arda, Vural GÖKMEN, Nicoletta PELLEGRINI a Vincenzo FOGLIANO. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of*

Cereal Science. 2008, roč. 48, č. 3, s. 816-820. ISSN 07335210. DOI:

10.1016/j.jcs.2008.06.002. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521008001008>

- [74] KARABÍN, Pavel DOSTÁLEK a Pavel HOFTA. Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy*. 2006, roč. 100, č. 3, s. 184-189. ISSN 1213-7103.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
AAE	Ascorbic Acid Equivalent
AAHP	2,2-azobis-(2-amidinopropan)dihydrochlorid
ABTS	2,2-azinobis-(3-ethyl-2,3dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
AH	Antioxidant
ČSN	Česká technická norma
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
DAD	Detektor diodového pole
EBC	European brewery convention
ES	Evropské společenství
FCM	Folin-Ciocalteuova metoda
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Gallic Acid Equivalent
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Low density lipoprotein
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
R	Radikál
TAA	Total Antioxidant Activity
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
UV/VIS	Detektor elektromagnetického záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: <i>Hordeum vulgare</i> L. [3].....	12
Obr. 2: Struktura heterocyklického flavanu.....	32
Obr. 3: Dělení flavonoidů [42]	33
Obr. 4: Anthokyanidin [42]	33
Obr. 5: Katechin [42].....	35
Obr. 6: Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová a kyselina skořicová [42].....	36
Obr. 7: Kyselina chlorogenová [42]	36
Obr. 8: Kyselina ferulová [42].....	37
Obr. 9: ABTS [42]	40
Obr. 10: Trolox [42].....	40
Obr. 11: DPPH [42]	42
Obr. 12: Kyselina gallová [42]	43

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Sklizeň ječmene jarního v roce 2010 a 2011 podle krajů [7]	14
Tab. 2: Požadavky na ječmen při nákupu [12]	16
Tab. 3: Doporučené sladovnické odrůdy 2011: [11]	19
Tab. 4: Chemické složení obilky ječmene [1]	26
Tab. 5: Hlavní skupiny fenolových sloučenin [33].....	30
Tab. 6: Anthokynidin [42]	33
Tab. 7: Deriváty kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoové a kyseliny skořicové [32].....	35
Tab. 8: Místa odběru vzorků odrůdy SEBASTIAN ^{CPG}	49
Tab. 9: Průměrné hodnoty stanovení celkového obsahu polyfenolů za použití metody FCM.....	55
Tab. 10: Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity za použití metody DPPH	59

SEZNAM GRAFŮ

Graf. 1: Výroba a vývoz sladu (1950 – 2011) [19, 20].....	23
Graf. 2: Závislost změny absorbance na množství kyseliny gallové.....	54
Graf. 3: Stanovení celkových polyfenolů v jednotlivých fázích výroby za použití metody FCM.....	56
Graf. 4: Závislost úbytku absorbance A na koncentraci kyseliny askorbové za použití metody DPPH.....	58
Graf. 5: Stanovení celkové antioxidační v jednotlivých fázích výroby za použití metody DPPH.....	59
Graf. 6: Porovnání celkových polyfenolů a antioxidační aktivity v průběhu sladování.....	61

SEZNAM PŘÍLOH

- P1** Fotodokumentace ze Sladovny Soufflet ČR, a.s. Prostějov
- P2** Podrobný přehled výsledků celkového množství polyfenolů jednotlivých vzorků
- P3** Podrobný přehled výsledků antioxidační aktivity jednotlivých vzorků

**PŘÍLOHA P 1: FOTODOKUMENTACE ZE SLADOVNY SOUFFLET
ČR, A.S. PROSTĚJOV**

Fotografie 1: Klíčení na humnech



Fotografie 2: Výrobní linka Lausmann



Příloha P2: Podrobný přehled výsledků celkového množství polyfenolů jednotlivých vzorků

ŘADA A							ŘADA B							ŘADA C									
měření vzorků				průměry			měření vzorků				průměry			měření vzorků				průměry					
I.	P1	0,096	0,099	0,110	0,102	0,095	0,078	I.	P1	0,078	0,083	0,089	0,083	0,080	0,079	I.	P1	0,092	0,080	0,086	0,086	0,078	0,073
	P2	0,091	0,085	0,088	0,088				P2	0,083	0,079	0,069	0,077				P2	0,073	0,074	0,061	0,069		
	D1	0,069	0,069	0,068	0,069	0,061			D1	0,083	0,087	0,078	0,083	0,077			D1	0,058	0,069	0,069	0,065	0,069	
	D2	0,050	0,056	0,056	0,054				D2	0,082	0,062	0,071	0,072				D2	0,069	0,073	0,074	0,072		
II.	P1	0,053	0,066	0,072	0,064	0,062	0,063	II.	P1	0,069	0,056	0,065	0,063	0,064	0,072	II.	P1	0,065	0,068	0,050	0,061	0,060	0,055
	P2	0,050	0,065	0,067	0,061				P2	0,068	0,073	0,054	0,065				P2	0,059	0,054	0,066	0,060		
	D1	0,049	0,066	0,066	0,060	0,065			D1	0,086	0,074	0,083	0,081	0,079			D1	0,048	0,040	0,052	0,047	0,049	
	D2	0,064	0,076	0,066	0,069				D2	0,072	0,074	0,084	0,077				D2	0,055	0,044	0,053	0,051		
III.	P1	0,056	0,059	0,062	0,059	0,058	0,058	III.	P1	0,074	0,077	0,053	0,068	0,068	0,056	III.	P1	0,048	0,047	0,055	0,050	0,050	0,049
	P2	0,057	0,050	0,063	0,057				P2	0,080	0,064	0,060	0,068				P2	0,049	0,058	0,041	0,049		
	D1	0,064	0,054	0,066	0,061	0,058			D1	0,052	0,047	0,052	0,050	0,045			D1	0,063	0,053	0,050	0,055	0,049	
	D2	0,057	0,044	0,060	0,054				D2	0,039	0,041	0,038	0,039				D2	0,039	0,042	0,045	0,042		
IV.	P1	0,072	0,060	0,072	0,068	0,061	0,064	IV.	P1	0,053	0,045	0,050	0,049	0,058	0,067	IV.	P1	0,098	0,083	0,090	0,090	0,087	0,083
	P2	0,063	0,054	0,044	0,054				P2	0,072	0,061	0,069	0,067				P2	0,078	0,089	0,081	0,083		
	D1	0,070	0,059	0,059	0,063	0,068			D1	0,076	0,079	0,078	0,078	0,076			D1	0,077	0,073	0,080	0,077	0,079	
	D2	0,077	0,073	0,068	0,073				D2	0,071	0,075	0,074	0,073				D2	0,077	0,089	0,080	0,082		
V.	P1	0,068	0,055	0,065	0,063	0,060	0,070	V.	P1	0,061	0,058	0,060	0,060	0,057	0,056	V.	P1	0,095	0,083	0,067	0,082	0,100	0,096
	P2	0,059	0,063	0,047	0,056				P2	0,055	0,058	0,050	0,054				P2	0,108	0,120	0,124	0,117		
	D1	0,095	0,095	0,078	0,089	0,080			D1	0,058	0,057	0,048	0,054	0,055			D1	0,102	0,083	0,090	0,092	0,092	
	D2	0,078	0,070	0,064	0,071				D2	0,069	0,048	0,052	0,056				D2	0,098	0,098	0,081	0,092		
VI.	P1	0,065	0,053	0,060	0,059	0,057	0,067	VI.	P1	0,106	0,100	0,103	0,103	0,089	0,094	VI.	P1	0,057	0,051	0,067	0,058	0,076	0,074
	P2	0,060	0,050	0,055	0,055				P2	0,083	0,072	0,069	0,075				P2	0,091	0,097	0,090	0,093		
	D1	0,090	0,087	0,073	0,083	0,077			D1	0,120	0,104	0,109	0,111	0,100			D1	0,075	0,066	0,070	0,070	0,073	
	D2	0,072	0,069	0,070	0,070				D2	0,092	0,095	0,079	0,089				D2	0,073	0,080	0,071	0,075		
VII.	P1	0,082	0,086	0,067	0,078	0,075	0,075	VII.	P1	0,069	0,071	0,080	0,073	0,081	0,079	VII.	P1	0,083	0,080	0,068	0,077	0,084	0,082
	P2	0,076	0,074	0,064	0,071				P2	0,086	0,090	0,090	0,089				P2	0,090	0,093	0,091	0,091		
	D1	0,059	0,079	0,082	0,073	0,076			D1	0,077	0,077	0,078	0,077	0,078			D1	0,100	0,069	0,097	0,089	0,081	
	D2	0,070	0,076	0,088	0,078				D2	0,072	0,084	0,078	0,078				D2	0,059	0,060	0,098	0,072		
VIII.	P1	0,078	0,063	0,070	0,070	0,071	0,079	VIII.	P1	0,057	0,048	0,069	0,058	0,070	0,082	VIII.	P1	0,056	0,068	0,070	0,065	0,068	0,079
	P2	0,077	0,068	0,071	0,072				P2	0,041	0,104	0,100	0,082				P2	0,069	0,059	0,088	0,072		
	D1	0,072	0,069	0,070	0,070	0,086			D1	0,084	0,085	0,084	0,084	0,095			D1	0,081	0,075	0,076	0,077	0,090	
	D2	0,102	0,106	0,098	0,102				D2	0,109	0,104	0,102	0,105				D2	0,108	0,098	0,100	0,102		
IX.	P1	0,096	0,084	0,079	0,086	0,087	0,082	IX.	P1	0,088	0,074	0,080	0,081	0,081	0,081	IX.	P1	0,110	0,095	0,095	0,100	0,101	0,097
	P2	0,083	0,090	0,092	0,088				P2	0,081	0,083	0,079	0,081				P2	0,098	0,104	0,103	0,102		
	D1	0,078	0,070	0,077	0,075	0,076			D1	0,082	0,080	0,084	0,082	0,081			D1	0,096	0,090	0,097	0,094	0,094	
	D2	0,071	0,074	0,084	0,076				D2	0,080	0,081	0,079	0,080				D2	0,091	0,093	0,098	0,094		
X.	P1	0,169	0,193	0,203	0,188	0,188	0,185	X.	P1	0,173	0,188	0,184	0,182	0,186	0,203	X.	P1	0,209	0,185	0,201	0,198	0,195	0,158
	P2	0,170	0,197	0,194	0,187				P2	0,197	0,189	0,183	0,190				P2	0,197	0,194	0,185	0,192		
	D1	0,186	0,181	0,174	0,180	0,182			D1	0,227	0,214	0,223	0,221	0,219			D1	0,126	0,110	0,126	0,121	0,121	
	D2	0,181	0,188	0,180	0,183				D2	0,224	0,210	0,218	0,217				D2	0,117	0,126	0,120	0,121		

Příloha 3: Podrobný přehled výsledků antioxidační aktivity jednotlivých vzorků

ŘADA A							ŘADA B							ŘADA C																
měření vzorků					průměry	úb.abs.	prům.	měření vzorků					průměry	úb.abs.	prům.	měření vzorků					průměry	úb.abs.	prům.							
I.	P1	0,754	0,748	0,744	0,748	0,774	38,457	40,010	P1	0,699	0,700	0,704	0,701	0,684	42,346	42,909	P1	0,720	0,740	0,686	0,716	0,775	35,470	37,785						
	P2	0,800	0,799	0,799	0,800				P2	0,667	0,666	0,669	0,667				P2	0,839	0,834	0,830	0,834									
	D1	0,721	0,721	0,721	0,721				0,733	41,563	D1	0,694	0,696				0,698	0,696	0,690	43,472	D1				0,690	0,691	0,691	0,691	0,723	40,099
	D2	0,746	0,744	0,743	0,744				D2	0,682	0,685	0,684	0,684				D2	0,760	0,754	0,755	0,756									
II.	P1	0,784	0,783	0,781	0,783	0,775	37,332	38,970	P1	0,735	0,729	0,732	0,732	0,743	38,066	39,902	P1	0,694	0,695	0,698	0,696	0,701	41,360	41,990						
	P2	0,766	0,767	0,769	0,767				P2	0,755	0,755	0,756	0,755				P2	0,705	0,709	0,707	0,707									
	D1	0,729	0,730	0,733	0,731				0,715	40,609	D1	0,701	0,702				0,697	0,700	0,704	41,739	D1				0,709	0,711	0,714	0,711	0,714	42,620
	D2	0,698	0,698	0,700	0,699				D2	0,663	0,669	0,693	0,708				D2	0,716	0,716	0,718	0,717									
III.	P1	0,786	0,786	0,786	0,786	0,772	34,228	34,872	P1	0,766	0,767	0,763	0,765	0,768	34,721	36,048	P1	0,783	0,779	0,785	0,782	0,780	35,322	35,400						
	P2	0,760	0,755	0,760	0,758				P2	0,773	0,771	0,770	0,771				P2	0,779	0,782	0,776	0,779									
	D1	0,763	0,765	0,770	0,766				0,771	35,517	D1	0,745	0,745				0,745	0,745	0,748	37,374	D1				0,770	0,775	0,778	0,774	0,778	35,478
	D2	0,774	0,776	0,778	0,776				D2	0,748	0,753	0,753	0,751				D2	0,782	0,785	0,781	0,783									
IV.	P1	0,780	0,777	0,781	0,779	0,777	35,838	33,376	P1	0,797	0,796	0,801	0,798	0,788	34,800	34,520	P1	0,782	0,787	0,778	0,785	0,774	35,544	34,450						
	P2	0,771	0,776	0,777	0,775				P2	0,775	0,778	0,780	0,778				P2	0,764	0,764	0,763	0,764									
	D1	0,847	0,846	0,851	0,848				0,827	30,914	D1	0,788	0,797				0,796	0,794	0,794	34,240	D1				0,793	0,796	0,795	0,795		
	D2	0,804	0,803	0,808	0,805				D2	0,793	0,793	0,798	0,795				D2	0,802	0,804	0,803	0,803									
V.	P1	0,803	0,793	0,805	0,800	0,808	33,684	33,426	P1	0,803	0,804	0,807	0,805	0,804	31,477	31,318	P1	0,777	0,779	0,780	0,779	0,782	33,762	34,013						
	P2	0,817	0,820	0,811	0,816				P2	0,802	0,805	0,803	0,803				P2	0,783	0,786	0,786	0,785									
	D1	0,811	0,816	0,814	0,814				0,811	33,169	D1	0,798	0,799				0,800	0,799	0,809	31,160	D1				0,779	0,780	0,784	0,781		
	D2	0,804	0,808	0,815	0,809				D2	0,818	0,822	0,819	0,820				D2	0,786	0,790	0,785	0,787									
VI.	P1	0,833	0,829	0,830	0,831	0,820	32,259	31,901	P1	0,828	0,823	0,824	0,825	0,824	31,142	32,124	P1	0,782	0,783	0,783	0,783	0,776	34,298	32,787						
	P2	0,807	0,810	0,809	0,809				P2	0,826	0,821	0,822	0,823				P2	0,769	0,768	0,768	0,768									
	D1	0,819	0,824	0,820	0,821				0,827	31,543	D1	0,826	0,829				0,846	0,834	0,831	33,105	D1				0,802	0,804	0,803	0,803		
	D2	0,830	0,830	0,836	0,832				D2	0,827	0,826	0,831	0,828				D2	0,815	0,814	0,814	0,814									
VII.	P1	0,790	0,801	0,802	0,798	0,798	33,370	34,057	P1	0,776	0,776	0,784	0,779	0,778	35,208	35,521	P1	0,794	0,780	0,774	0,783	0,783	34,459	33,734						
	P2	0,797	0,796	0,802	0,798				P2	0,778	0,775	0,776	0,776				P2	0,787	0,789	0,774	0,783									
	D1	0,797	0,799	0,800	0,799				0,804	34,744	D1	0,788	0,790				0,789	0,789	0,770	35,833	D1				0,788	0,789	0,790	0,789		
	D2	0,808	0,813	0,808	0,810				D2	0,756	0,742	0,755	0,751				D2	0,800	0,789	0,791	0,793									
VIII.	P1	0,778	0,776	0,777	0,777	0,784	36,391	38,140	P1	0,800	0,799	0,800	0,800	0,796	33,524	34,829	P1	0,800	0,799	0,801	0,800	0,796	33,375	33,710						
	P2	0,790	0,790	0,791	0,790				P2	0,792	0,782	0,800	0,791				P2	0,797	0,784	0,796	0,792									
	D1	0,775	0,637	0,703	0,705				0,739	39,889	D1	0,765	0,766				0,770	0,767	0,764	36,134	D1				0,779	0,780	0,784	0,781		
	D2	0,778	0,779	0,763	0,773				D2	0,761	0,758	0,763	0,761				D2	0,782	0,784	0,787	0,784									
IX.	P1	0,722	0,723	0,747	0,731	0,726	40,341	40,769	P1	0,728	0,734	0,735	0,732	0,734	40,390	39,195	P1	0,668	0,670	0,641	0,660	0,664	45,080	45,756						
	P2	0,725	0,722	0,721	0,722				P2	0,734	0,739	0,737	0,737				P2	0,671	0,668	0,665	0,668									
	D1	0,725	0,724	0,723	0,724				0,724	41,198	D1	0,766	0,764				0,768	0,766	0,766	38,001	D1				0,664	0,640	0,641	0,648		
	D2	0,724	0,725	0,725	0,725				D2	0,765	0,767	0,766	0,766				D2	0,644	0,641	0,668	0,651									
X.	P1	0,599	0,599	0,598	0,599	0,600	51,181	49,924	P1	0,621	0,622	0,622	0,622	0,622	49,431	49,225	P1	0,554	0,558	0,556	0,556	0,555	54,055	53,991						
	P2	0,601	0,598	0,602	0,600				P2	0,621	0,623	0,622	0,622				P2	0,554	0,555	0,555	0,555									
	D1	0,648	0,606	0,627	0,627				0,629	48,667	D1	0,624	0,624				0,625	0,624	0,624	49,020	D1				0,558	0,555	0,559	0,557		
	D2	0,634	0,650	0,610	0,631				D2	0,624	0,625	0,624	0,624				D2	0,560	0,556	0,556	0,558									

pracovní roztok

	měření			průměry	
I.	P	1,301	1,223	1,249	1,258
	D	1,245	1,254	1,263	1,254
II.	P	1,237	1,239	1,234	1,237
	D	1,195	1,204	1,211	1,203
III.	P	1,158	1,184	1,18	1,174
	D	1,193	1,192	1,202	1,196
IV.	P	1,204	1,207	1,222	1,211
	D	1,202	1,195	1,192	1,196
V.	P	1,213	1,22	1,223	1,219
	D	1,221	1,22	1,201	1,214
VI.	P	1,204	1,212	1,214	1,210
	D	1,205	1,211	1,206	1,207
VII.	P	1,192	1,194	1,207	1,198
	D	1,23	1,242	1,225	1,232
VIII.	P	1,223	1,234	1,239	1,232
	D	1,221	1,233	1,235	1,230
IX.	P	1,213	1,213	1,227	1,218
	D	1,235	1,229	1,23	1,231
X.	P	1,231	1,22	1,233	1,228
	D	1,227	1,231	1,219	1,226

	měření			průměry	
I.	P	1,186	1,181	1,193	1,187
	D	1,214	1,222	1,225	1,220
II.	P	1,205	1,189	1,207	1,200
	D	1,204	1,208	1,214	1,209
III.	P	1,176	1,173	1,182	1,177
	D	1,188	1,193	1,203	1,195
IV.	P	1,205	1,2	1,22	1,208
	D	1,203	1,22	1,2	1,208
V.	P	1,163	1,175	1,182	1,173
	D	1,176	1,171	1,18	1,176
VI.	P	1,194	1,194	1,202	1,197
	D	1,23	1,245	1,251	1,242
VII.	P	1,197	1,199	1,204	1,200
	D	1,199	1,198	1,203	1,200
VIII.	P	1,201	1,193	1,196	1,197
	D	1,197	1,2	1,191	1,196
IX.	P	1,229	1,235	1,232	1,232
	D	1,232	1,24	1,234	1,235
X.	P	1,229	1,228	1,232	1,230
	D	1,224	1,221	1,229	1,225

	měření			průměry	
I.	P	1,2	1,202	1,201	1,201
	D	1,205	1,208	1,21	1,208
II.	P	1,189	1,197	1,202	1,196
	D	1,237	1,245	1,251	1,244
III.	P	1,208	1,202	1,21	1,207
	D	1,202	1,207	1,21	1,206
IV.	P	1,193	1,207	1,204	1,201
	D	1,197	1,199	1,2	1,199
V.	P	1,182	1,179	1,18	1,180
	D	1,184	1,197	1,197	1,193
VI.	P	1,175	1,182	1,184	1,180
	D	1,169	1,181	1,18	1,177
VII.	P	1,198	1,201	1,185	1,195
	D	1,183	1,189	1,171	1,181
VIII.	P	1,201	1,195	1,189	1,195
	D	1,187	1,183	1,19	1,187
IX.	P	1,205	1,205	1,216	1,209
	D	1,224	1,217	1,197	1,213
X.	P	1,205	1,205	1,216	1,209
	D	1,207	1,209	1,214	1,210