

Polyfenolické látky v pivu, jejich vlastnosti a možnosti jejich stanovení

Jana Dlapová

Bakalářská práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana DLAPOVÁ**
Osobní číslo: **T06185**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Polyfenolické látky v pivu, jejich vlastnosti
a možnosti jejich stanovení**

Zásady pro vypracování:

- 1. Vyhledejte a popište nejdůležitější polyfenolické látky v pivu.**
- 2. Prostudujte instrumentální možnosti jejich stanovení.**
- 3. Navrhněte metody, které by se daly se současným instrumentálním vybavením použít na UTB.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3, OSSIS, Tábor 1999.

[2] ČEPIČKA, J. a KARABÍN, M. Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty. Chemické listy, 2002, 96, 90–95

[3] HOFTA, P., DOSTÁLEK P. a BASAŘOVÁ G. Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol? Chemické listy, 2004, 98, 825–830

[4] GARCÍA, A. A. et al. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. Journal of Chromatography A, 2004, 1054, 175–180

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2010

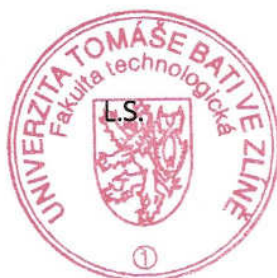
Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2010

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním 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 bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji 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 užit své dílo – 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 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 bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem 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

.....

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

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

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

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

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

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

Práce se zabývá základními surovinami pro výrobu piva. Krátce také popisuje samotnou výrobu. Dále charakterizuje jednotlivé polyfenolické látky v pivu, jejich charakteristiku a dělení. Mimo jiné se zmiňuje o vlivu polyfenolických látek na zdraví člověka. Nakonec uvádí možnosti jak tyto látky v pivu stanovit.

Klíčová slova: pivo, slad, HPLC, xanthohumol, antioxidant

ABSTRACT

The thesis is concerned with the basic ingredients used for the production of beer. It shortly describes the actual process of the production and it also characterizes the particular polyphenol substances in beer, their characteristics and division. Among others, it mentions the influence of polyphenol substances on human health. It concludes with the possibilities of defining these substances in beer.

Key words: beer, malt, HPLC, xanthohumol, antioxidant

Děkuji vedoucímu Ing.Pavlovi Hanuštiakovi za odborné vedení. Jeho cenné rady, informace a poskytnuté materiály mi dopomohly k dokončení mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu ve studiu.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1 TRH S PIVEM	11
2 SUROVINY PRO VÝROBU PIVA	12
2.1 SLAD	12
2.2 CHMEL	14
2.3 VODA	15
3 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA	16
4 POLYFENOLOVÉ LÁTKY	18
4.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI JEDNOTLIVÝCH POLYFENOLŮ.....	19
4.2 SLADOVÉ POLYFENOLY	24
4.2.1 Členění	25
4.3 CHMELOVÉ POLYFENOLY.....	26
4.3.1 Xanthohumol.....	27
4.4 ZDRAVOTNÍ ÚČINKY	28
4.4.1 Pivo jako celek	28
4.4.2 Polyfenoly	28
5 STANOVENÍ POLYFENOLŮ V PIVU	30
5.1 CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA PIVA A MEZIPRODUKTŮ	30
5.2 CELKOVÉ POLYFENOLY	31
5.3 SKUPINY POLYFENOLŮ	31
5.4 JEDNOTLIVÉ LÁTKY	31
5.5 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC).....	32
5.5.1 Chromatografie.....	32
5.5.2 Kapalinová chromatografie	33
5.5.3 Stanovení polyfenolů v chmelu metodou HPLC.....	35
5.5.4 Stanovení xanthohumolu metodou HPLC	36
ZÁVĚR	37
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	41
SEZNAM OBRÁZKŮ	42
SEZNAM TABULEK	43

ÚVOD

Pivo je slabě alkoholický nápoj vyráběný z obilného sladu, vody a chmele pomocí pivovarských kvasinek. Postup přípravy je po staletí stejný, postupně se zdokonalovaly jednotlivé technologické kroky a zařízení. Průkopníky pivovarství byli Sumerové, Babyloňané a zároveň i Egypťané. Prudký rozvoj pivovarnictví nastal ve 13. století v době zakládání měst. Po roce 1295 začíná vaření piva i ve městě, které je dnes dokonce snad i synonymem pro pěnivý mok – v Plzni.

Trh s pivem v dnešní době roste po celém světě, značné oblibě se pivo těší i v České republice. Jeho oblíbenost je dána více faktory, historií, ale i skutečností, že se české pivo považuje díky kvalitním ječmenům a českému chmelu jako jedno z nejlepších na světě, proto je i důležitým exportním artiklem České republiky. Pivo je významným zdrojem mnoha důležitých látek, jako jsou vitaminy, minerální látky, vláknina, aminokyseliny a další. Zdrojem energetické hodnoty piva jsou extrahované složky piva, zejména sacharidy a ethanol. Pivo obsahuje také hořké chmelové látky, které mají dobrý vliv na sekreci žluči, a tím přímo podporuje trávení. Příznivé účinky piva na lidský organismus se mohou projevit jen při jeho střídavé konzumaci, kdy nepřevažují negativní účinky alkoholu. Pivo je snadno stravitelný nápoj, který podporuje zvyšující chuť k jídlu, což může vést při nestřídavé konzumaci pokrmů k nárůstu tělesné hmotnosti.

Mezi kvalitativní složky obsažené v pivu, které mu dávají specifické organoleptické a fyzikálně-chemické vlastnosti, se řadí také polyfenolické látky. Jejich přispění k vlastnostem piva, ale také jejich přesné chemické složení, není dosud plně objasněno a stále je předmětem celosvětového pivařského výzkumu.

Při stanovení polyfenolů je možné sledovat celkovou antioxidační kapacitu, celkové polyfenoly, skupiny polyfenolů a jednotlivé látky. V dnešní době již existují postupy, které využívají metodu vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) např. ve spojení s diodovým detektorem (DAD).

I. TEORETICKÁ ČÁST

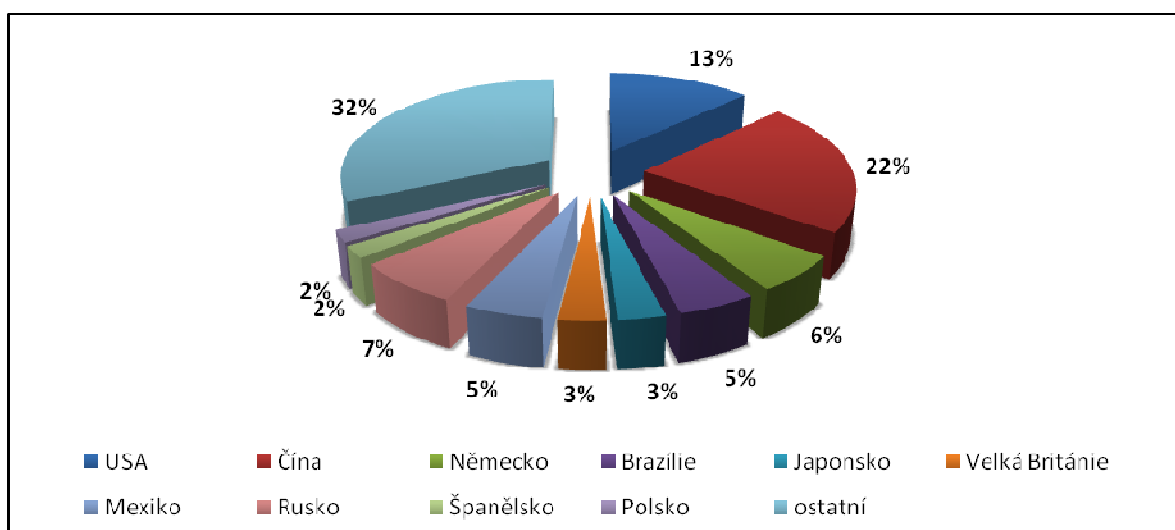
1 TRH S PIVEM

Pivo patří mezi nejstarší kulturní nápoj lidstva. Počátky výroby piva byly v oblasti Mezopotámie, kde Sumerové a Babyloňané již v 7. tisíciletí př.n.l. znali obilné kvašené nápoje. Někteří historikové se však domnívají, že piva se původně začala vařit v Číně, neboť tam je i prapůvodní oblast pro pěstování chmele. Ke značnému rozšíření výroby došlo ve Starém Egyptě, kdy za panování Ptolemaiovské dynastie se pivovarnictví ustavilo jako samostatný průmysl. Celý středověk se nesl ve znamení velkého rozvoje pivovarnictví. Od 12. století přebírají výrobu do rukou výhradně jen muži, tedy sedláci mající tzv. Právo várečné, ale i Mílové právo, udělované městům panovníkem.

V době rozvoje českých měst bylo více než 3000 pivovarů s ročním výstavem 500 tisíc hektolitů piva. Od poloviny 19. století dochází k modernizaci starých pivovarů, především ale vznikají nové. Po roce 1989 nastala privatizace pivovarů. V roce 2006 bylo v České republice činných 71 pivovarů. [1]

Mezi největší celosvětové producenty piva patří Čína, která v roce 2008 vyrobila 395 milionů hektolitů piva, dále pak USA (236 mil. hl), Rusko (119 mil. hl) a Německo (101 mil. hl). Celkově se v roce 2008 ve světě vyprodukovalo 1799 mil. hl piva. Česká republika zaujímala v témže roce osmnácté místo ve světě s roční produkcí cca 20 milionů hektolitů piva. Největšími výrobci piva v České republice jsou firmy Plzeňský Prazdroj, a.s., Pivovary Staropramen, a.s., Heineken Czech a Budvar, n.p. Největšími konzumenty piva jsou obyvatelé Evropy, Asie a Ameriky. [2]

Obr. 1 Graf světové produkce piva ve vybraných zemích v roce 2008 [2]



2 SUROVINY PRO VÝROBU PIVA

Již po staletí patří mezi základní suroviny výroby piva pitná voda, obilný slad a později chmel, aby působením pivovarských kvasnic vznikl lehce alkoholický nápoj. Čechy byly v minulosti proslulé především svými svrchně kvašenými pšeničnými pivy tzv. „bílá piva“, nechyběla však ani tzv. „červená piva“, vařená z ječného sladu. Ta byla ale výrazně dražší a rozvoj výroby tohoto piva se začal rozvíjet až v 17. století. Spodně kvašená piva „plzeňského typu“, která Čechy nejvíce proslavila, jsou známá od poloviny minulého století. Do té doby se dokonce vařila i piva z ova, která byla kořeněna dubovou kůrou, listím a dalšími bylinami. [3]

2.1 Slad

Slad, který je nejpoužívanější surovinou pro naše i světové pivovarnictví, se vyrábí naklíčením a hvozděním sladovnického ječmene ve sladovnách. Pro výrobu sladu se u nás pěstují odrůdy jarního dvouřadého ječmene, který řadíme mezi nejkvalitnější na světě. [4]

V šedesátých letech 20. století ČSSR určovalo světové ceny sladu a bylo jeho hlavním exportérem. Dnes se mezi nejvýznamnější producenty ječmene a sladu řadí Německo, Británie, Francie a Dánsko. Česká republika vyrábí asi 1,3 mil. tun jarního ječmene a z něj se vyprodukuje okolo 450 – 520 tis. tun sladu. [5]

Obr. 2 *Hordeum vulgare* L. [42]



Při sledování kvality ječmene se hodnotí pěstitelské vlastnosti, tedy výnos, odolnost, náročnost, především však sladařské vlastnosti, tj. chemické složení a celková vhodnost pro výrobu sladu. Důležitá je hlavně klíčivost a klíčivá energie, které udávají procentický podíl zrn schopných vyklíčit, dále objemová hmotnost, podíl zrn nad sítím, odrůdová čistota a homogenita. Podíl cizích, biologicky poškozených nebo plesnivých zrn by měl být co nejnižší. [4,8] Tato kategorie se řadí mezi nejproblémovější ukazatele jakosti ječmenů vůbec. Výskyt těchto zrn je otázkou ročníku a úrovně ošetřování porostů v průběhu vegetace. Odmítání sladů s podílem plesnivých zrn ze strany pivovarů má své opodstatnění. Pokud by byl takový slad zpracováván, pivovar se tak vystavuje riziku, že kromě potíží s kvalitou piva budou překročeny i přípustné limity obsahu mykotoxinů v potravině. [7]

Kvalitní odrůdy sladovnických ječmenů obsahují 63 – 64 % škrobu v sušině, obsah bílkovin je v průměru 10,8 %, z ostatních složek můžeme zmínit neškrobové polysacharidy, peptidy, volné aminokyseliny, polyfenolové látky, vitaminy a látky minerální. [4]

Výroba sladu začíná po dozrání obilí v silech (po dobu 4 až 5 týdnů) čištěním od hrubých a jemných nečistot (prach, plevel, kovové části). Prvním krokem samotné výroby je máčení.

Máčením ječmene se zvýší obsah vody v zrně z 12 až 15 % na 42 až 48 %. To je důležité pro zahájení enzymatických reakcí a tím i pro optimální průběh sladařského klíčení. Zároveň se odstraňují směsi lehkých zrn a nečistot. [8]

Následuje klíčení zrn, dochází k anatomickým a biochemickým přeměnám. Jsou potřebné uměle vytvořené podmínky - vhodná teplota (14 až 18 °C), vláh a přístup dostatečného množství kyslíku. Při klíčení je důležité, aby dýchání zrna nepřešlo na anaerobní fermentaci, což by vedlo k usmrcení klíčku a velkým ztrátám z kvasitelných cukrů. Asi po pěti dnech se zelený slad, který má zdravou vůni, mírně zavadlé kořínky a správně vyvinutou stříčku, suší na hvozdech při teplotách 60 až 80 °C, a tím se snižuje obsah vody ve sladu pod 4 %. Dochází k zastavení vegetačních pochodů při zachování enzymové aktivity a vytvoření chuťových, barevných a oxidoredukčních látek, které tvoří charakter sladu.

Různé druhy sladů se od sebe liší hlavně enzymovou aktivitou, kyselostí, barvou a vůní. Nejběžněji vyráběnými slady v České republice jsou světlý slad a bavorský slad. Mezi slady speciální patří karamelový, který se používá pro výrobu tmavých piv, stejně tak i slad barevný. Dále sem řadíme slady diastatické, nakuřované a proteolytické.

V některých zemích se často používají náhražky sladu, tzv. surogáty (velká obliba v USA a Japonsku). Mohou být škrobnaté jako např. rýže, kukuřice či pšenice, která je používána při výrobě speciálních piv v Německu a v Belgii. Mezi cukernaté náhražky se řadí řepný nebo třtinový cukr, v poslední době jsou časté i cukerné sirupy, se kterými se můžeme setkat jak v Americe, tak i ve Francii a Velké Británii. [4,8]

2.2 Chmel

Hlavním produktem chmele využívaným pro výrobu piva jsou samičí hlávky rostlin (*Humulus lupulus* L.) čeledi *Cannabaceae*. Dávají pivu typickou hořkou chuť, výraznou charakteristickou vůni a mají další důležité technologické vlastnosti. Pro výrobu českých piv se používá česká odrůda chmele tzv. Žatecký poloraný červeňák, který se údajně řadí mezi nejkvalitnější chmele na celém světě. V roce 2008 byl pěstován na 4738 ha, tj. 88,8 % z celkové pěstelské plochy. [2] Po očesání chmele se hlávky suší při nižších teplotách, aby se původní obsah vody 72 až 82 % snížil na 8 %. Podle zbarvení chmelové révy se rozlišují odrůdy „červeňáky“ a „zeleňáky“. Chmelové pryskyřice jsou nejdůležitější technologicky významnou složkou, podstatné z nich jsou pryskyřice obsahující α -hořké kyseliny zvané humulony a β -hořké kyseliny zvané lupulony. Vyrovnaný poměr těchto kyselin dává českému pivu vyváženou jemnost v hořkosti. Aromatické vlastnosti piva určují silice chmele, které jsou směsí několika organických látek převážně terpenického charakteru. [8]

Mechanickou úpravou se nahrazuje sušený hlávkový chmel, dodávaný v žocích, chmelem granulovaným. Ten se připravuje z přírodního sušeného chmele, který se slisuje do granulí, tzv. pelet. Další variantou je chmelový extrakt vyráběný extrakcí hlávkového chmele 90 % ethanolem nebo oxidem uhličitým. Ve srovnání s přírodním chmelem představují extrakty surovinu s vyšší koncentrací pivovarsky důležitým složek, hlavně α -hořkých kyselin. Existují i isoextrakty, získané chmelovými procesy (isomerací), nebo také synteticky vyrobené hořké látky, ale jejich širšímu rozšíření brání vysoká cena preparátů a odlišný sensorický charakter. [4,8]

Produkce sušeného chmele v České republice v roce 2008 dosáhla 6753,8 tun, tj. o 19,9 % více než v roce 2007. ÚKZÚZ dává informace o celkové ploše chmelnic v České republice ke dni 30. 4. 2009 5305 ha, oproti roku 2008 se jedná o pokles o 30 ha, tj. o 0,6 %. V roce 2008 bylo celkem vyrobeno 6753,8 tun chmele při hektarovém výnosu 1,27 t / ha. [2]

Tab. 1 Výměra pěstování chmele ve světě (ha) [2]

Země / rok	Plocha v ha						
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ČR	5 968	5 942	5 838	5 672	5 414	5 389	5 335
Německo	18 354	17 563	17 477	17 167	17 170	17 671	18 695
Polsko	2 197	2 172	2 239	2 291	2 291	2 179	2 179
USA	11 862	11 602	11 227	11 924	11 707	12 510	15 884
Čína	5 650	5 670	4 196	3 987	4 422	4 995	7 125
Evropa	36 523	33 985	33 432	32 372	31 672	32 038	33 412
Svět	56 221	53 459	51 103	50 429	49 675	52 550	58 469

2.3 Voda

Voda tvoří v pivu více než 90 % hmotnosti a závisí na ní jak výsledná jakost, tak i chuť piva. Podle technologického postupu se spotřebuje na výrobu 1 tuny sladu 10 až 15 hl vody a na 1 hl vystaveného piva je potřeba dalších 12 až 15 hl vody. [4] Voda z veřejné vodovodní sítě má kvalitu pitné vody a je tedy použitelná i jako voda varní, v případě, že není třeba upravovat její chemické složení pro výrobu určitých druhů piv.

Nejdůležitějším ukazatelem varné vody je její tvrdost, kterou způsobuje obsah hořečnatých a vápenatých solí. Pro výrobu světlých piv je vhodná voda měkká, pro piva tmavá tvrdší voda nevádí. Varní voda nesmí obsahovat chlór a příliš železa, alkalické uhličitany, mangan a dusičnany. [3]

3 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA

Při výrobě piva se rozšrotuje slad a dále se mísí při vystírání s vodou. Ve vzniklé směsi se za zvyšující se teploty vlivem enzymů štěpí škrob v zrně na zkvasitelné cukry, které pak přecházejí do roztoku. Tento proces probíhá ve varně při vyšších teplotách. Rmutování se provádí ve rmutovacím kotli. Společným znakem těchto postupů je pomalé zahřívání dílčích rmutů na cukrotvornou teplotu, poté následuje povaření (dekokce). Po 5 až 6 hodinách se získá rmut, který je přečerpán do scezovací kádě. Tam se odděluje sladový extrakt (sladina) od pevného podílu zcukřeného rmutu tj. mláta přirozenou filtrací. Zfiltrovaný podíl extraktu sladu se nazývá předek. [4]

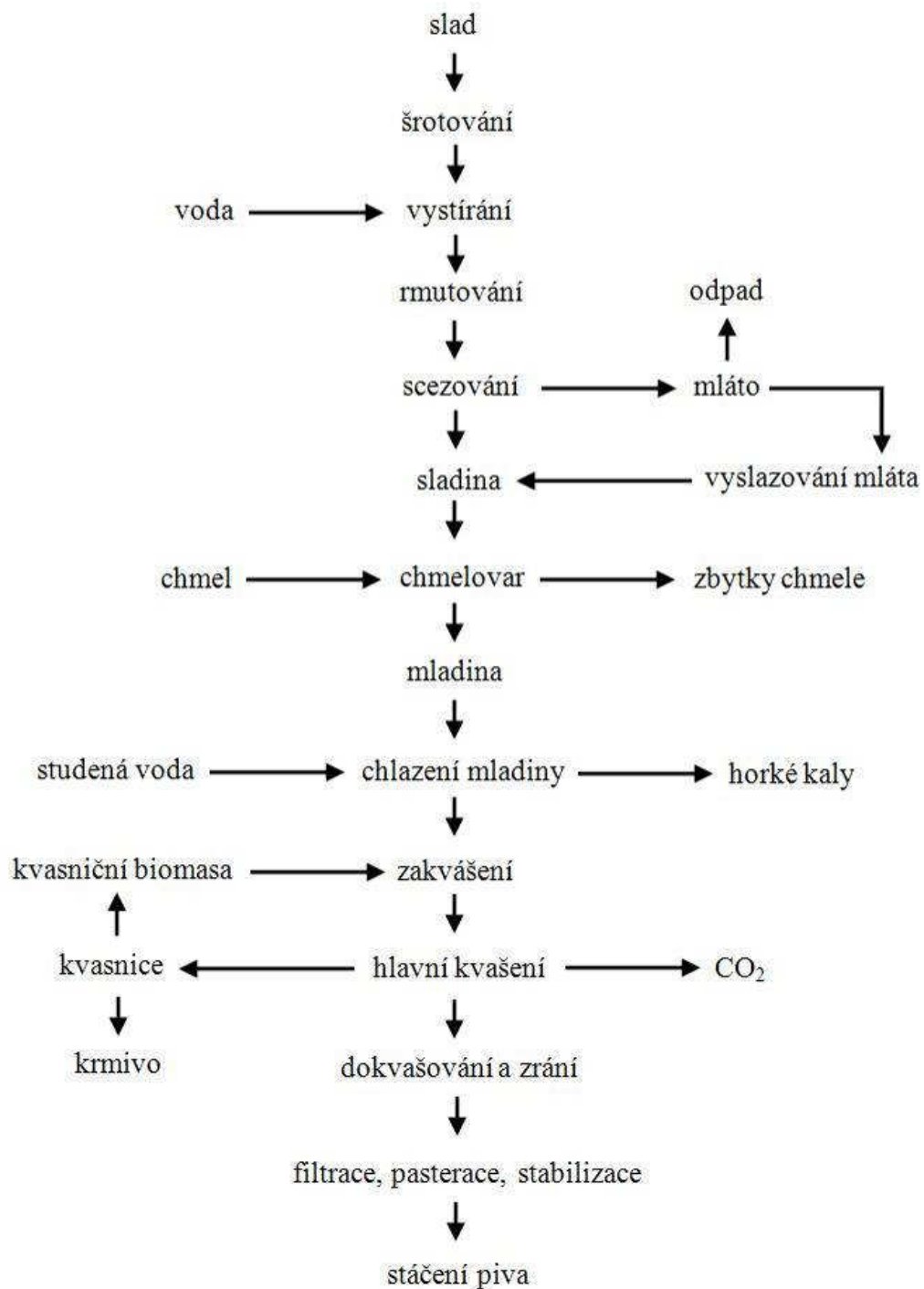
Vyslazování mláta se provádí vodou o teplotě 75 °C z důvodu vyloučení posledních zbytků rozpustného extraktu. Zfiltrovaný roztok extraktu tzv. výstřelek se shromažďuje spolu s předkem v mladinové pánvi.

Sladina se vaří s chmelovými preparáty a dochází k převedení hořkých chmelových látek do mladiny, zároveň vznikají hořké produkty iso- α -hořké kyseliny, probíhají Maillardovy reakce a denaturace sladových bílkovin. [6] Chmelovarem trvajícím 90 až 120 minut za varu se získá produkt mladina. Následuje oddělení zbytků chmele, poté chlazení mladiny na zákvasnou teplotu 5 až 7 °C. Hlavním podílem extraktu jsou sacharidy s převahou maltózy. Její obsah ve světlých mladinách je 70 %, v mladinách pro piva tmavá 60 až 64 %. Pro kvašení mladiny se používají buď svrchní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) při teplotě až 24 °C, nebo spodní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces uvarum*) při teplotě 6 – 12 °C. Kvašení je rozděleno na kvašení hlavní a dokvašovací. Nejmodernější technologie pivovarského kvašení představuje jednofázové kvašení, při které probíhá hlavní kvašení i dokvašování v jedné nádobě, obvykle v cylindrokónických velkoobjemových tancích. [41] Při kvašení se přeměňují zkvasitelné sacharidy na ethanol a oxid uhličitý, současně se v menší míře tvoří i vedlejší produkty – alifatické alkoholy, aldehydy, diketony a mastné kyseliny, které spoluvytváří chuť a aroma piva. Dokvašování a zrání mladého piva se provádí v ležáckém sklepě, kde pivo při teplotách 1 až 3 °C pozvolna dokváší, číří se, zraje a sytí se pod tlakem vznikajícího oxidu uhličitého v uzavřených tancích. U výčepních piv do stupňovitosti 10°, bývá doba ležení 3 týdny, pro speciální exportní piva až několik měsíců. Dokonale vyztřelé pivo se musí filtrovat, nejčastěji na křemelinových a deskových filtrech. Pro zvýšení biologické stability se provádí pasterace z důvodu odstranění

prekurzorů zákalů piva. Stabilizace se aplikuje u exportních piv, kdy je nezbytné zaručit několikaměsíční trvanlivost.

Konečnou fází úpravy je stáčení piva do transportních obalů. [4,6]

Obr. 3 Schéma výroby piva [6]



4 POLYFENOLOVÉ LÁTKY

Polyfenoly jsou obecně označovány jako organické fenolické látky s více než jednou hydroxylovou skupinou v molekule. Zdrojem těchto látek jsou ovoce, zelenina, víno, vláknina, chmel, aromatické a léčivé rostliny a další. Rostlinné polyfenoly jsou rozšířeny v různých částech rostlin – v kůře, kořenech i plodech. Jsou charakteristické řadou společných vlastností. V přírodě chrání rostliny před oxidačním stresem, dodávají charakteristické zbarvení, plodům vůni i chuť. Trpce svíravá chuť polyfenolů a schopnost některých inhibovat trávicí enzymy omezuje konzumaci těchto rostlin herbivorům, což může být jeden z možných obranných mechanismů rostliny. [10,11]

Do piva se dostávají ze surovin, tedy z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových preparátů. Tyto sloučeniny ovlivňují nejen celkovou trvanlivost, ale i senzorycké vlastnosti produktu. Obecně se podílejí na chemicko-fyzikální stabilitě piva, na odolnosti proti jeho stárnutí, oxidaci a na formování pěny. [11]

Důležitou složkou chmele jsou třísloviny, které představují 20 – 30 % všech polyfenolů piva. Mluví se o předpokladu, že ovlivňují charakter hořkosti a v posledních letech se zdůrazňuje jejich pozitivní antioxidační účinek. [8]

Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g, což odpovídá vyššímu příjmu než u antioxidačních vitamínů. V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů. [12]

Výskyt polyfenolových sloučenin a jejich chování v pivu je ovlivněn mnoha faktory, mezi které řadíme původ a skladbu surovin a především jejich technologické zpracování v jednotlivých stupních výrobního procesu ve sladovně a v pivovaru. [13]

Některé polyfenoly jsou však také toxické, prokarcinogenní, jiné jsou naopak zdraví prospěšné pro svou estrogenní aktivitu. [24]

Tab. 2 Obsahy jednotlivých polyfenolových látek v pivu plzeňského typu [29]

Fenolické sloučeniny	mg/l
Polyfenoly celkově	172
Anthokyanogeny	46
Katechin	5 - 55
Epikatechin	9 - 24
Rutin	1 - 6
Quercetin	5 - 125
Quercetrin	1
Kyselina chlorogenová	2 - 20
Kyselina chinová	1 - 5
Kyselina para-kumarová	1 - 7
Kyselina ferulová	2 - 21
Kyselina sinapová	1 - 20
Kampferol	5 - 20
Myricetrin	1
Kyselina gallová	5 - 29
Kyselina para-hydroxybenzoová	5 - 20

Některé typy polyfenolových látek (tanoidy) omezují koloidní stabilitu piva reakcí s polypeptidy a tvoří s nimi zákal. Jiné zase zvyšují senzoričnou stabilitu, neboť působí jako antioxidanty. Jejich redukce zvyšuje koloidní stabilitu piva. [15]

4.1 Struktura a vlastnosti jednotlivých polyfenolů

Z chemického hlediska jde o široký soubor látek fenolické povahy. Vzhledem k jejich různorodosti však zatím nebyl vypracován jednotný systém jejich dělení, který by byl pivovarskými odborníky všeobecně přijat.

Velíšek udává obecné třídění podle počtu uhlíků do 9 hlavních skupin. [16]

Tab. 3 Hlavní skupiny fenolových sloučenin

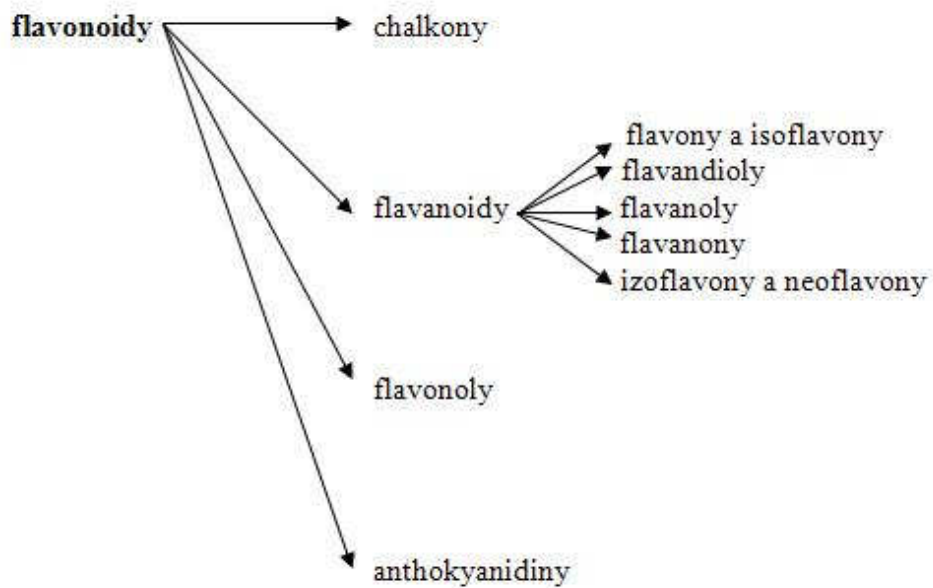
Základní skelet	Počet C	Skupina
C_1	6	jednoduché fenoly, benzochinony
$C_6 - C_1$	7	fenolové kyseliny
$C_6 - C_2$	8	acetofenony, fenylactová kyselina
$C_6 - C_3$	9	skořicové kyseliny, fenypropeny, kumariny, chromony
$C_6 - C_4$	10	naftochinony
$C_6 - C_1 - C_6$	13	xanthony
$C_6 - C_2 - C_6$	14	stilbeny, 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

Kellner a spol. používá jiné dělení, a to z hlediska hlavních zástupců polyfenolů piva. [17]

- flavonoidy
- kumarinové deriváty
- chinony, ubichinony
- štěpné produkty testinových kyselin
- deriváty kyseliny chlorgenové
- volné fenolové kyseliny

Nejvíce zastoupenou skupinou těchto látek jsou flavonoidy. Ty dále dělíme z pivovarského hlediska do čtyř základních podskupin. [10]

Obr. 4 Dělení flavonoidů

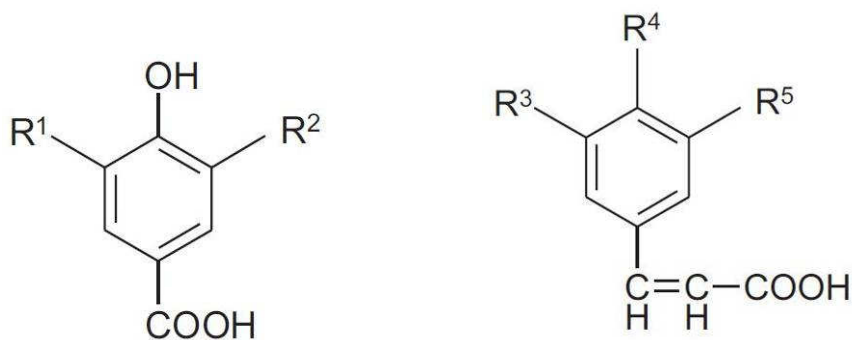


Také Ros zavedl jednoduché rozdělení polyfenolů na dvě hlavní skupiny [18]:

- 1) složky o nízké molekulové hmotnosti tedy fenolické kyseliny, které zahrnují:
 - a) deriváty kys. benzoové (kys. salicylová, gentisová, gallová, syringová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilinová)
 - b) deriváty kys. skořicové (kys. kávová, sinapová, ferulová, *p*-kumanová)
- 2) složky o vyšší molekulové hmotnosti tedy skupina flavonoidů, které se dále dělí na:
 - a) flavany
 - b) antokyany
 - c) flavonoly

Tab. 4 Deriváty kyseliny *p*-hydroxybenzoové a kyseliny skořicové [10]

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

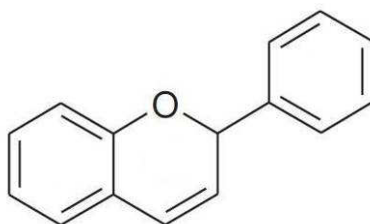
Obr. 5 Kyselina *p*-hydroxybenzoová a kyselina skořicová [10]

Kyseliny ferulová, kávová a sinapová byly přítomny v pivu hlavně jako formy vázané, zatímco *p*-hydroxybenzoová a *p*-kumarová byly přítomny převážně jako volné formy. [19]

Fenolové kyseliny vázané na buněčné stěny klíčícího ječmene patří mezi velmi zajímavé antioxidanty pív. Ve skutečnosti je antioxidační kapacita díky těmto vázaným sloučeninám přibližně dvakrát vyšší než aktivita fenolových kyselin volných. [20]

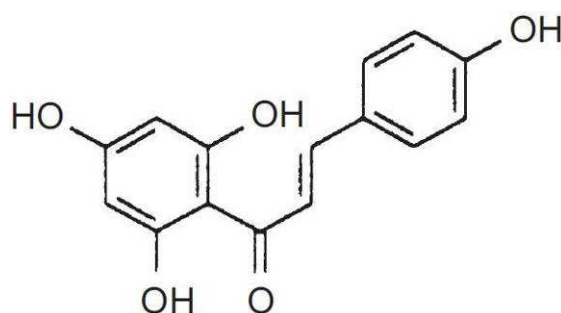
Flavonoidy mají velký význam z hlediska zákalů, jejich struktura je odvozena od heterocyklického flavanu. Barva flavonoidů se liší podle prostředí, v neutrálním a kyselém prostředí jsou bezbarvé, v alkalickém žluté až žlutooranžové barvy. Z chmele se do piva dostávají také prenylované flavonoidy, z nichž 80 % tvoří xanthohumol. [10]

Obr. 6 Flavan [10]



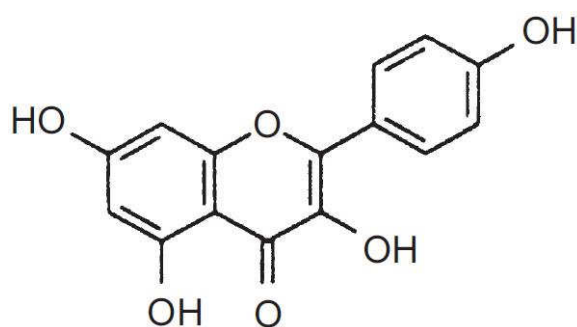
Prekurzory flavonoidů se nazývají chalkony. U nich nedošlo k úplné cyklizaci na flavonoidní skelet. Chalkony jsou v biosyntéze flavonoidů prvními intermediátory, které vznikají reakcí mezi kys. kumarovou a třemi acetátovými jednotkami. Adice geranylu nebo prenylu mohou vést k prenylovaným chalkonům. V přírodě se většinou vyskytují více či méně hydroxylovány. [10]

Obr. 7 Chalkon [10]

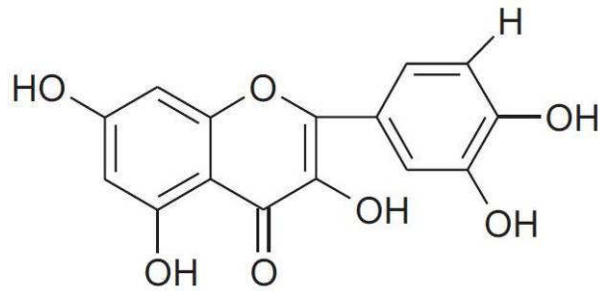


Mezi flavonoly patří barvivo kvercetin, který se vyskytuje hojně v přírodě např. také v chmelu. Má oranžově hnědou barvu a je aglykonem několika glykosidů, např. rutinu a kvercetrinu. Dále sem patří katechin, epikatechin a proanthokyanidiny.

Obr. 8 Flavonol [10]

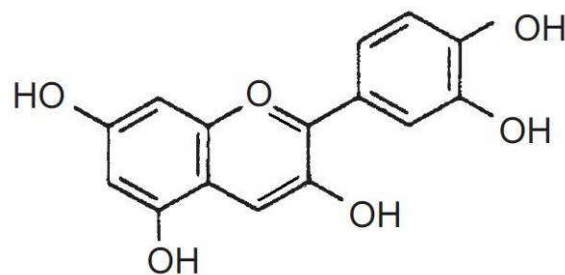


Obr. 9 Kvercetin [11]



Anthokyaniny zodpovídají za barvu rostlin a jsou významnými rostlinnými pigmenty. Podle hodnoty pH mohou být zbarveny od červené až po modrou. Anthokyanidin je aglykonová část anthokyanů. Jako cukr zde vystupuje glukosa nebo galaktosa. [21]

Obr. 10 Anthokyanidin [10]



4.2 Sladové polyfenoly

Ječné polyfenoly se nacházejí především v obalových částech zrna a v aleuronové vrstvě. Množství těchto látek se pohybuje od 0,1 do 0,6 % sušiny, v úvahu musí být však brána odrůda i místo pěstění. Většinou při vyšším obsahu bílkovin se setkáme s nižším obsahem polyfenolů.

V obilce najdeme jednoduché polyfenolové kyseliny a to ve formě volné i vázané: syringová, ferulová, vanilinová, *p*-hydroxybenzoová. Častější je její výskyt ve formě glykosidů nebo esterů, např. kyselin chlorogenové, kávové, isoferulové, skořicové apod. Mnohé z nich splňují funkci inhibitorů klíčení a při máčení ječmene dochází k částečnému vyluhování. [8]

4.2.1 Členění

Mezi hlavní skupiny patří:

1) deriváty 5,7 dihydroxyflavanu

- leukoanthokyanidiny
 - ve formách:
 - » monomerní glykosidy (anthokyaniny)
 - » biflavonoidní proanthokyanidiny (anthokyanogeny)
 - » polymerní anthokyaniny
 - » oxidované a polymerní formy základních flavonoidních složek
- katechiny
 - molekuly katechinů mezi sebou kondenzují a produkty mají tzv. tříslovinou sílu, což je schopnost srážení bílkovin, který je v pivovarnictví velmi důležitá.
- kumarinové deriváty
 - tyto látky jsou regulátory klíčení

2) deriváty kyseliny chlorgenové

- enzymatickou hydrolýzou kyseliny chlorgenové vzniká např. kyselina kávová

3) aromatické kyseliny a štěpné produkty testinových kyselin

- jde o deriváty kyseliny benzoové a skořicové

4) chinony

5) ubichinony [22]

V ječmeni je většina polyfenolů vázána na cukernou složku. Bývá to nejčastěji D-glukosa, L-rhamnosa, ale může to být i kyselina glukuronová.

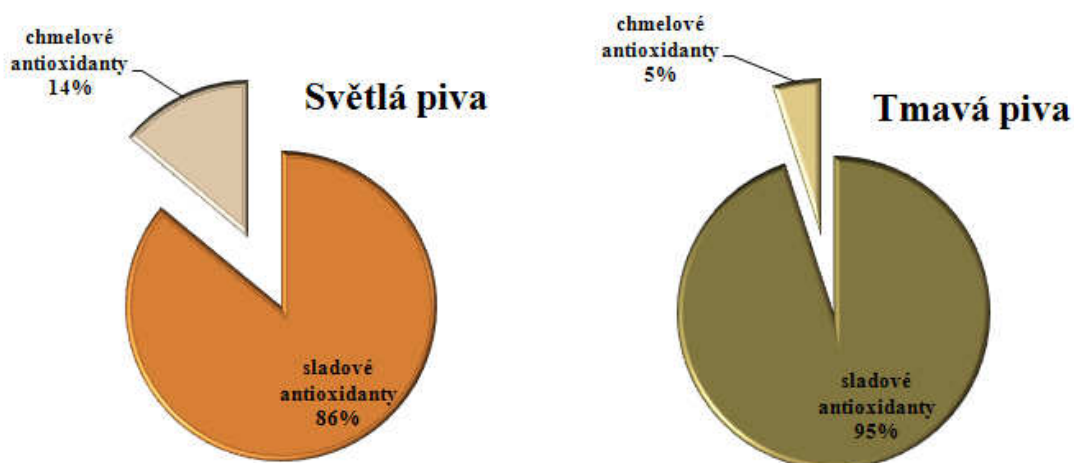
Anthokyanogeny, podskupina polyfenolů, je v aleuronu vázána na bílkovinu hordein. Zahřátím v kyselém prostředí, tedy při rmutování, se mění na barevné anthokyanidiny a tím se podílí na barvě piva. [23]

4.3 Chmelové polyfenoly

Dosud bylo metodou HPLC v chmelu, mladíně a pivu nalezeno a izolováno více než sto polyfenolických látek. Jsou důležité pro koloidní stabilitu piva, jeho barvu, podílí se na vylučování hořkých kalů a mají vliv i na charakter hořkosti. [11]

Chmel se na obsahu polyfenolů v pivu podílí asi z jedné pětiny a slad ze čtyř pětin. [8] Tuto informaci také uvádí Racek a je demonstrována v grafu pro obsah antioxidantů v tmavých a světlých pivech. [24]

Obr. 11 Podíl sladových a chmelových antioxidantů ve světlých a tmavých pivech [24]



Na antioxidační aktivitu piva mají daleko vyšší vliv chmelové polyfenoly než sladové, důvodem je vaření piva a termostabilita polyfenolů. Bylo prokázáno, že řada polyfenolových látek chmele má podobné antioxidační účinky jako některé vitaminy či syntetické antioxidanty. Mezi nejdůležitější polyfenolové látky chmele patří katechin, epikatechin, kyselina ellagová, kyselina gallová, kyselina ferulová a rutin. [25]

Flavonoidy, nejvíce zastoupená skupina polyfenolových složek chmele v pivu, se rozdělují do čtyř skupin:

- 1) chalkony
- 2) flavanoly
- 3) flavonoly
- 4) anthokyanidiny

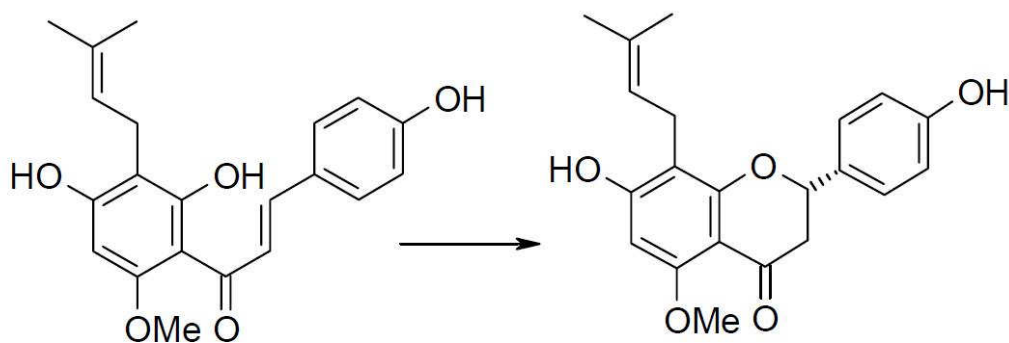
4.3.1 Xanthohumol

Poměrně velké množství flavonoidů s prenylovaným substituentem na kruhu A obsahují chmelové hlávky. Více než 80 % z nich tvoří xanthohumol, který přechází do piva v isomerované formě jako isoxanthohumol, a nachází se v sušině chmele v množství 0,2 až 1,1 hm. %. Pokud bychom se bavili o odrůdě Žatecký poloraný červeňák, který tvoří 93 % z veškerých ploch osázených chmelem, bylo by to 0,33 hm. % xanthohumolu v sušině. [2] Xanthohumol je krystalická látka, žluto-oranžové barvy, nepolárního charakteru a díky jeho povaze je možné ho řadit mezi polyfenoly i mezi chmelové pryskyřice. Jeho obsah, spolu s obsahem ostatních prenylflavonoidů, závisí na odrůdě a stresových faktorech, ale i na skladování. [35]

Nepolární xanthohumol tvoří výjimku mezi většinou flavonoidů, rozpustných v horké vodě. Nachází se spolu s pryskyřicemi a oleji v lupulinových žlázkách, avšak ne v listenech chmelových šištic. Jeho primární biotransformace probíhá v játrech a střevní mikroflóře. Xanthohumol inhibuje přeměnu diacylglycerolů na triacylglyceroly, které při vyšší hladině zvyšují riziko obezity, ztučnění jater, aterosklerózy a cukrovky. [11] Stevens tvrdí, že xanthohumol je významná složka chmele s chemo-preventivním účinkem na rozvoji nádorů. Zatím byl prokázán jeho účinek proti buňkám, které způsobují rakovinu prsu, tlustého střeva a prostaty. [26]

V průběhu chmelovaru se prenylflavonoidy chmele dostávají do piva, dochází také k četným změnám, jako je kvašení, filtrace a stabilizace, K nejznámější reakci se řadí isomerace xanthohumolu na isoxanthohumol. [11]

Obr. 12 Isomerační přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol během chmelovaru [11]



4.4 Zdravotní účinky

4.4.1 Pivo jako celek

O příznivých zdravotních účincích piva se psalo již ve středověkých knihách. Aseptické vlastnosti chmele byly prezentovány již od 12. století, v 15. století byl kladen důraz na vliv kvasnic, od 19. století především na obsah vitaminů a ve 20. století byly připravovány doplňkové preparáty s příznivým vlivem na trávení a celkový stav organismu. [3]

Kellner upozorňuje na pozitivní vliv piva jako celku na lidské zdraví. Díky obsahu vody (cca 92 %) brání dehydrataci organismu, k níž jinak dochází při pití jiných alkoholických nápojů. [17]

V pivu je důležitý obsah vitaminů, a to hlavně vitaminů skupiny B, dále obsah kys. panto-tenové a biotinu. Při konzumaci 1 litru piva je denní potřeba jednotlivých vitaminů kryta asi z 10 až 50 %. Dále obsahuje zinek, který je třeba při tvorbě inzulínu, také k ochraně proti kožním chorobám. Fluor chrání proti zubnímu kazu, křemík, který brzdí absorpci hliníku v těle, působí preventivně proti vzniku Alzheimerovy choroby. [17]

Obsah alkoholu v pivu je sporný. Odpůrci alkoholu pivo často degradují až na škodlivý nápoj. Obsah ethanolu je však nízký vzhledem k ostatním prospěšným látkám. Pokud je alkohol konzumovaný v malých dávkách, má dokonce příznivé účinky na zdraví. Podporuje vstřebávání polyfenolů ve střevě a tím zvyšuje antioxidační kapacitu v organismu. [27]

4.4.2 Polyfenoly

Na zdraví člověka mají polyfenoly pozitivní vliv. [28] Rostlinné polyfenoly jsou v naší potravě nejvýznamnějšími přírodními potravními antioxidanty po vitaminu C, v organismu neutralizují nebezpečné volné radikály. Ty totiž ohrožují naše cévy a jsou rizikovým faktorem i pro buňky, ve kterých mohou vyvolat zhoubné bujení. V organismu dochází k určité rovnováze mezi prooxidanty a antioxidanty (1:3), kterou je potřebné dodržet. Pokud se rovnováha poruší směrem k prooxidantům, vznikne oxidační stres, který může být spouštěčem různých chorob jako je aterosklerosa, diabetes, Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba, či vznik karcinomů. Prooxidanty mohou v organismu vznikat endogenně, nebo exogenně (kouření, radiace). [27]

Souhrnně mají polyfenoly široké spektrum účinků příznivých na lidské zdraví, mezi které můžeme zařadit účinky antioxidantní, antimutagenní, antikarcinogenní, antimikrobiální a protizánětlivé. Tyto vlastnosti by mohly být přínosem v oblasti prevence onemocnění a ochrany stability genomu. [14]

Pokud jsou antioxidantní fenolické komponenty stále přijímány pravidelnou spotřebou nápojů obsahujících tyto látky, snižují trombotické jevy, a tím přispívají ke zlepšení aterosklerózy a snížení výskytu onemocnění a úmrtnosti na nemoci cévní soustavy. [10] Mnoho fenolických látek se řadí mezi fytoestrogeny, které mají analogické působení jako ženské hormony estrogenery. Ženy chrání před vznikem závažných chorob, jako je osteoporóza, karcinom prsu či dělohy, oslabují také průvodní jevy klimakteria (návaly horka, pocení, nespavost, migrény). Pitím piva lze tyto příznaky určitým způsobem zmírnit, protože chmel je také zdroj estrogenů. Estrogenní aktivita se připisuje především rostlinám z čeledi bobovité *Fabaceae*, zejména sóji (*Glycine max*). Studie zaměřené na toto téma vycházejí ze skutečnosti, že země východní Asie jsou podle statistik na spodní příčce žebříčku výskytu chorob už zmíněných, rakoviny prsu, osteoporózy a srdečně cévních onemocnění. Příčinou budou zřejmě do jídelníčku zařazené produkty ze sóji. [34] S estrogenní aktivitou úzce souvisí i schopnost xanthohumolu inhibovat resorpci vápníku z kostí a působit tak proti osteoporóze. Právě proti této nemoci byl v USA preparát obsahující účinné látky patentován. [10] Estradiol, endogenní estrogen savců je nepostradatelný pro reprodukci a normální vývoj organismu, současně je však dáván do souvislosti s rakovinou konečníku, mléčných žláz a asi také prostaty. [21]

Průběh resorpce polyfenolů probíhá v tenkém a tlustém střevě ve formě glykosidů či esterů. Metabolismus je po přestupu přes střevní stěnu podobný metabolismu léčiv, kdy fenolická látka se váže na glukuronovou kyselinu či glycin, nebo podléhá methylaci. Další reakce většinou pak probíhají v játrech. Teprve až konjugované polyfenoly se vážou na povrch LDL částic a zabraňují tak jejich oxidaci. [39]

Z epidemiologické studie v Holandsku, kdy byly sledovány osoby ve věku 65 – 85 roků po dobu pěti let, vyplynulo, že pravidelným příjmem rostlinných polyfenolů je možné snížit u starších lidí riziko úmrtí na srdečně cévní onemocnění. [27]

5 STANOVENÍ POLYFENOLŮ V PIVU

Stanovením polyfenolů v pivu se zabývá mnoho vědeckých prací. Každá však používá jiné přístroje, uplatňuje jinou metodiku a jiné podmínky pro stanovení. Pro analýzu polyfenolických látek je nutné vypracovat metody na izolaci polyfenolů a následné analytické stanovení. Metody je možno rozdělit podle toho, co chceme stanovovat.

Můžeme sledovat:

- celkovou antioxidační kapacitu
- celkové polyfenoly
- skupiny polyfenolů
- jednotlivé látky

Metody mohou být použity jako srovnávací metody pro určení závislosti různých podmínek při jejich zisku a skladování. Celá problematika polyfenolů, ještě není úplně prozkoumána, obzvláště vliv na koloidní stabilitu piva a jeho organoleptické vlastnosti. V současné době stále probíhá intenzivní výzkum jak v českých, tak i ve světových vědeckých pracovištích. [40]

5.1 Celková antioxidační kapacita piva a meziproduktů

Celková antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku.

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Tato chemická metoda je založena na principu redoxní reakce, kde se využívá schopnost antioxidantů redukovat téměř bezbarvé železité komplexy, které po redukci vytváří modré komplexy. Metoda má svá omezení, která spočívá v tom, že měření probíhá při velmi nízké hodnotě pH a navíc nejsou zachyceny polyfenolické látky, které mají nízkou reakční rychlost s železitými komplex. [31]

Chemiluminiscence

Při této fyzikální metodě se stanovuje intenzita oxidace lipidů. Metoda je založena na reakci luminolu s peroxidem vodíku v přítomnosti zesilovače, což je v tomto případě 1,1,4,7,7-diethyltriaminpentaoctová kyselina, která luminiskuje. Přítomnost antioxidantu je způsobena zhasením luminiscence a snížením intenzity signálu. [28]

5.2 Celkové polyfenoly

Metoda stanovuje celkové množství všech polyfenolů ve vzorku.

Stanovení celkových polyfenolů dle EBC (European Brewery Convention)

Celkové polyfenoly jsou v pivovarské praxi stanoveny dle metody EBC, kdy jsou polyfenoly extrahovány dimethylformalidem nebo acetonem a následně je spektrofotometricky měřena absorbance vzniklého komplexu polyfenolů se železitými ionty při vlnové délce 600 nm. [9]

5.3 Skupiny polyfenolů

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

Stanovení anthokyanogenů dle Harrise a Rickettse

Pro stanovení anthokyanogenů se v pivovarnictví běžně 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-chlorovodíkové kyseliny. Vzniklé oxoniové soli se měří při 550 nm spektrofotometricky. [35]

Stanovení flavonoidů

Celkové množství flavonoidů lze v pivu stanovit pomocí metody, která je založena na vzniku barevného komplexu s chromanem p-dimethyl-aminocinnaldehydem. Absorbance je měřena při vlnové délce 640 nm. [24]

5.4 Jednotlivé látky

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

5.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

5.5.1 Chromatografie

Při této důležité analytické metodě se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Ten se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní pohyblivá. Pomocí pohybu mobilní fáze je vzorek unášen přes fázi stacionární. Na konec stacionární fáze se dříve dostávají složky méně zadržované, což je principem separace. [32]

Tab. 5 Rozdělení chromatografických metod [32]

Rozdělení chromatografických metod		
podle skupenství mobilní fáze	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography - LC)	mobilní fází je kapalina
	plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC)	mobilní fází je plyn
podle uspořádání stacionární fáze	kolonová chromatografie	stacionární fáze je uložena v trubici (koloně)
	papírová chromatografie (Paper chromatography- PC)	stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
	tenkovrstevná chromatografie (Thin Layer Chromatography - TLC)	stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu
podle povahy děje, který převládá při separaci	rozdělovací chromatografie	o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi
	adsorpční chromatografie	o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze
	iontově výměnná chromatografie	o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze
	gelová chromatografie	
	afinitní chromatografie	

5.5.2 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii jako mobilní fáze vystupuje kapalina, stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče, nebo pevný adsorbent. Během separace je analyt rozdělován mezi mobilní a stacionární fází.

Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatogram je přístroj, na kterém se provádí HPLC analýza.

- Čerpadlo

Kapalina je do kolony čerpána pomocí pístových nebo membránových čerpadel. Rozsah průtoku je v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu při tlaku 35 MPa. Materiál čerpadla, což je nejčastěji nerezová ocel, keramika nebo plast, nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. [32]

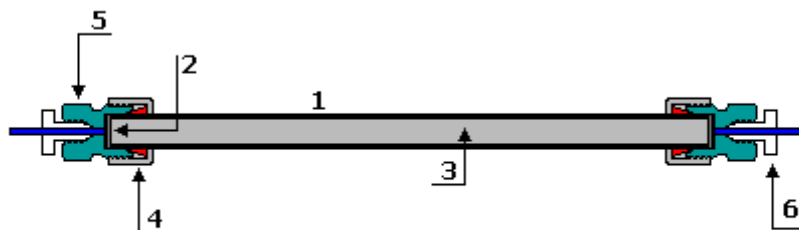
- Dávkovací zařízení

Injekční zařízení musí být zhotovena z inertních materiálů (nerezová ocel, titan) a je ovládáno ručně, ale i automaticky. Přináší však nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku, ale především vnášení stop materiálu injekční stříkačky. V současné době je však tento injekční systém nahrazován obtokovým dávkovacím kohoutem. [32]

- Kolony

Volba vhodné kolony má rozhodující význam, neboť výsledek chromatografické metody je určován kvalitou kolony a její náplní. Účinnost závisí na stacionární fází, délce kolony a na jejím tvaru, také na úpravě vnitřního povrchu kolony a množství spojovacích částí. Pro většinu analýz se používají kolony zhotovené z nerezové oceli nebo ze skla. Kolony jsou poměrně krátké (10 až 25 cm), vnitřní průměr je 4 nebo 5 mm. Běžný průtok mobilní fáze je 1 – 2 ml za minutu. Jako ochrana hlavní kolony jsou používány předklony, které jsou umístěné mezi dávkovacím zařízením a čerpadlem, a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály. [32]

Obr. 13 HPLC kolona [43]



Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6).

- Mobilní fáze

Jako mobilní fáze vystupuje např. voda, methanol, acetonitril, pufrý a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. Mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu. [33]

- Stacionární fáze

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3 - 10 μm) na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C 8 – oktan, C 18 – oktadekan). [33]

- Detektory

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Mezi nejpoužívanější detektory se řadí:

- Fotometrické detektory – měří absorbanci fluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru je nutné, aby byla zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné květy, jíž prochází paprsek.
- Refraktometrický detektor (Refractive Index detektor - RI) – měří rozdíly mezi indexem lomu fluátu a čisté mobilní fáze. Tento typ detektoru je velmi univerzální, avšak není příliš citlivý. Při jeho použití je důležité přísně udržovat konstantní teplotu.
- Fluorescenční detektor – je založen na principu fluorescence, tedy schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a poté vysílat záření o vyšší vlnové délce. Tento detektor je vysoce selektivní. [32]

5.5.3 Stanovení polyfenolů v chmelu metodou HPLC

Až do nedávna byly pro analytický popis polyfenolů k dispozici spíše jen nesespecifické kalorimetrické metody. Nyní už existují postupy, které využívají metodu vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s diodovým detektorem (DAD). Právě takový, HPLC-UV(DAD) se nachází i na fakultě technologické.

Vzorek je extrahován směsí acetonu a vody, poté vyčištěn chloroformem. Extrakce pevných fází je prováděna methylalkoholem a alkalickým methanolem. Obě tyto frakce se poté filtrují přes membránu. Nosným médiem pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii je většinou směs vody a kyseliny mravenčí. (95:5), jako rozpouštědlo A. Pro rozpouštědlo B se doporučuje směs metanolu, acetonitrilu a kyseliny mravenčí (95:5:5). Chromatografie probíhá ve spojení s diodovým detektorem záření (DAD). Ten dovoluje prostřednictvím záznamu spektra zajistit spektrální vrcholky. Porovnáním spektra známých látek se spektrálními vrcholky vzorku piva zajistí přiřazení ke skupinám látek. [13]

5.5.4 Stanovení xanthohumolu metodou HPLC

Tabulka udává různé možnosti jak polyfenol xanthohumol v pivu stanovit metodou HPLC.

Tab. 6 Stanovení xanthohumolu metodou HPLC

	1	2	3
Použitá metoda	HPLC - UV	HPLC - MS	HPLC - DAD
Mobilní fáze	methanol a 0,5 % kys. octová	acetonitril a 0,3 % kys. mravenčí	acetonitril a 1 % kys. mravenčí
Detekce	UV (370 nm)	MS (330 nm)	MD - 1510 UV/VIS (370 nm)
Kolona	ZORBAX Bonus - RP C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m)	PUROSPHER STAR RP - 18e (250 mm x 4 mm, 5 μ m)	Nucleosil 18C (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Průtok (ml · min ⁻¹)	1	1	0,8
Citace	[36]	[37]	[38]

U jednotlivých metod je uveden detektor, typ a délka kolony a mobilní fáze, kterou je možné použít. Lze použít různé typy kolon např. ZORBAX Bonus - RP C18, nebo PUROSPHER STAR RP - 18e. Metodami, jako je HPLC-MS, HPLC-UV (DAD) a HPLC-ECD lze polyfenoly stanovit v laboratořích na Univerzitě Tomáše Bati, Fakultě technologické. MS detekce nabízí větší selektivitu a poskytuje tedy lepší citlivost pro analýzu.

ZÁVĚR

Základními surovinami pro výrobu piva jsou chmel, voda, sladovnický ječmen a pivovarské kvasinky. Produkty chmele, samičí hlávky rostliny chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) čeledi *Cannabaceae*, dávají pivu typickou chuť a charakteristickou vůni. ÚKZÚZ dává informace o celkové ploše chmelnic v ČR v roce 2009 5305 ha. Slad se vyrábí naklíčením a hvozděním sladovnického ječmene v sladovnách. Mezi nejvýznamnější producenty ječmene a sladu se řadí Německo, Británie a Francie, ČR vyrábí asi 1,3 milionů tun jarního ječmene, ze kterého je vyprodukováno okolo 450 – 520 tisíc tun sladu.

Polyfenolické látky jsou důležitá součást sušiny piva. Jedna z nejvýznamnějších skupin polyfenolických látek jsou flavonoidy. Ty mají vliv na antioxidační aktivitu piva, která je v popředí výzkumu z důvodu pozitivního vlivu na zdraví člověka. Souhrnně mají polyfenoly příznivé účinky na zdraví člověka, mezi které se řadí účinky antioxidační, antikarcinogenní a protizánětlivé. Dále se účastní procesů regulace tlaku krve a hladiny glukózy v krvi. Pravidelný příjem antioxidantů snižuje trombotické jevy a tím přispívá ke zlepšení aterosklerózy, snížení výskytu onemocnění a úmrtnosti na nemoci cévní soustavy.

Obsah polyfenolů v pivu je závislý na více faktorech, jako je skladba surovin a jejich technologické zpracování v jednotlivých stupních výrobního procesu. Polyfenoly jsou také důležité pro koloidní stabilitu piva, jeho barvu a mají vliv na charakter hořkosti.

Na analytické stanovení polyfenolických látek v pivu se může nahlížet několika způsoby. Lze sledovat celkovou antioxidační kapacitu, celkové polyfenoly, skupiny polyfenolů a jednotlivé látky. Mezi rychlé metody stanovení jednotlivých polyfenolů, poměrně nenáročné na instrumentaci a chemikálie, patří HPLC s detekcí UV/VIS. Techniky s detekcí hmotnostní jsou finančně náročnější, pro laboratoř hůře dosažitelné, avšak s výbornými detekčními limity.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NOVÁK, J. *Dějiny piva : Od zrození až po konec středověku*. Brno : Computer Press, a.s., 2009. 143 s. ISBN 978-80-251-2019-4
- [2] *Situační a výhledová zpráva chmel, pivo*. Praha : Ministerstvo zemědělství Těšnov, 2009. 65 s. ISBN 978-80-7084-795-4
- [3] VERHOEF, B. *Velká encyklopedie piva*. Praha : REBO Production, 2003. 447 s. ISBN 80-7234-283-5
- [4] ROP, O.; HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4
- [5] ČERNÝ, L. *Jarní sladovnický ječmen : Pěstitelský rádce*. České Budějovice : Kurent, s.r.o., 2007. 39 s. ISBN 978-80-87111-04-8
- [6] Tradiční technologie piva [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivo/tradpiv.html>>.
- [7] Osobní informace od Ing. Antonína Dlapy, AGROFERT Holding a.s., získané dne 13.1.2010.
- [8] KOSAŘ, K.; PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha : Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3
- [9] DVOŘÁKOVÁ, M.; DOSTÁLEK, P.; HULÍN, P. Analytické metody stanovení ve sladínách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl*. 2006, č. 52, s. 111-114.
- [10] ČEPIČKA, J.; KARABÍN, M. Polyfenolové látky piva - přirozené antioxidanty. *Chemické listy*. 2002, č. 96, s. 90-95.
- [11] HOFTA, P.; DOSTÁLEK, P.; BASAŘOVÁ, G. Xanthohumol - Chmelová pryskyřice nebo polyfenol?.. *Chemické listy*. 2004, 2004, č. 98, s. 825-830.
- [12] PAULOVÁ, H.; BOCHOŘÁKOVÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek IN VITRO. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.
- [13] Polyfenoly v žateckém chmelu [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.beer.cz/chmelar/international/polyf.html>>.
- [14] FERGUSON, L. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*. 2001, č. 475, s. 89-111.
- [15] BASAŘOVÁ, G.; HLAVÁČEK, J. *České pivo*. Praha : NUGA, 1999. 128 s. ISBN 8085903-08-3
- [16] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Tábor : OSSIS, 2002. 320 s. ISBN 80-86659-01-1

- [17] KELLNER, V.; ČEJKA, J. Nová moderní metoda stanovení některých fenolic-
kých látek. *Kvasný průmysl*. 2004, č. 7, s. 210.
- [18] Český chmel 2006 [online] Dostupné z WWW:
<www.mze.cz/UserFiles/File/Cesky%20chmel%202006.pdf>.
- [19] NARDINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Phenolic acids from beer are ab-
sorbed and extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutritional Bio-
chemistry*. 2006, č. 17, vydání 1, s. 14-22.
- [20] *Pivovarství a kvasné technologie*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v
Praze, 2007. 36 s. ISBN 978-80-7080-015-7
- [21] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Tábor : OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3
- [22] MOŠTEK, J. *Sladařství, biochemie a technologie sladu*. Praha : SNTL, 1975.
478s.
- [23] KOSAŘ, K. Chmel – bohatý zdroj látek prospěšných pro lidské zdraví. *Potravi-
nářské revue*. 2006, č. 1, s. 28-31.
- [24] RACEK, J. Zdravotní účinky piva z hlediska volných radikálů a antioxi-
dantů. *Kvasný průmysl*. 2001, č. 8, s. 206-208.
- [25] Český chmel 2006 [online]. Dostupné z WWW:
<http://eagri.cz/public/eagri/file/2734/Cesky_chmel_2006.pdf>.
- [26] COLGATE, E.; MIRANDA, C.; STEVENS, J. Xanthohumol, a prenylflavonoid
derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prosta-
te epithelial cells. *Cancer Letters*. 2007, č. 246, s. 201-209.
- [27] Pivo pod mikroskopem [online]. Dostupné z WWW:
<<http://scienceworld.cz/medicina/pivo-pod-mikroskopem-2-2638>>.
- [28] KARABÍN, M.; DOSTÁLEK, P.; HOFTA, P. Přehled metod pro stanovení antio-
xidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy*. 2006, č. 100, s. 184-189.
- [29] Nutriční vlastnosti piva Plzeňského typu podle knihy Beer and Collers [online].
Dostupné z WWW: <<http://pivnistranky.sweb.cz/Hodnoty.htm>>.
- [30] FIDLER, M.; KOLÁŘOVÁ, L. Analýza antioxidantů v chmelu a v pivu. *Chemic-
ké listy*. 2009, č. 103, s. 232-235.
- [31] BASAŘOVÁ, G., et al. *Pivovarsko-sladařská analytika*. Praha : Merkanta, 1993.
965 s.
- [32] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-
07-2

- [33] CHURÁČEK, J., et al. *Analytická separace látek*. Praha : SNTL, 1990. 178 s.
- [34] SLANINA, J.; TÁBORSKÁ, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 239-245.
- [35] STEVENS, J.; PAGE, J. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*. 2004, č. 65, s. 1317-1330.
- [36] CHEN, L., et al. Determination of xanthohumol in beer based on cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2010, č. 81, s. 692-697.
- [37] ČESLOVÁ, L., et al. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2009, č. 1216, s. 7249–7257.
- [38] MAGALHˆAES, P.; GUIDO, L.; CRUZ, J. Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2007, č. 1150, s. 295-301.
- [39] KALAČ, P. Potravní fytoestrogeny a zdraví žen během klimakteria a po něm. *Výživa a potraviny*. 2006, č. 5, s. 137-139.
- [40] GARCÍA, A. et al. Development of a rapid based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography*. 2004, č. 1054, s. 175-180.
- [41] KADLEC, P. et al. *Technologie potravin II*. Praha : VŠCHT, 236. ISBN 978-80-7080-510-7
- [42] Obr. *Hordeum vulgare* L. – ječmen setý [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.biolib.cz/IMG/GAL/BIG/89311.jpg>>.
- [43] Obr. HPLC kolona [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/columnHardware.gif>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein
HDL	Vysokodenzitní lipoprotein
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
PC	Papírová chromatografie
TLC	Tenkovrstevná chromatografie
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
EBC	European Brewery Convention
RI	Refraktometrický detektor
MS	Hmotnostní spektrometr
DAD	Detektor diodového pole
UV/VIS	Detektor elektromagnetického záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Graf světové produkce piva ve vybraných zemích v roce 2008 [2].....	11
Obr. 2 <i>Hordeum vulgare</i> L. [42].....	12
Obr. 3 Schéma výroby piva [6].....	17
Obr. 4 Dělení flavonoidů	21
Obr. 5 Kyselina p-hydroxybenzoová a kyselina skořicová [10]	22
Obr. 6 Flavan [10].....	23
Obr. 7 Chalkon [10].....	23
Obr. 8 Flavonol [10]	23
Obr. 9 Kvercetin [11].....	24
Obr. 10Anthokyanidin [10].....	24
Obr. 11 Podíl sladových a chmelových antioxidantů ve světlých a tmavých pivech [24]	26
Obr. 12 Isomerační přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol během chmelovaru [11]	27
Obr. 13 HPLC kolona [43]	34

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Výměra pěstování chmele ve světě (ha) [2].....	15
Tab. 2 Obsahy jednotlivých polyfenolových látek v pivu plzeňského typu [29].....	19
Tab. 3 Hlavní skupiny fenolových sloučenin.....	20
Tab. 4 Deriváty kyseliny p-hydroxybenzoové a kyseliny skořicové [10].....	22
Tab. 5 Rozdělení chromatografických metod [32]	32
Tab. 6 Stanovení xanthohumolu metodou HPLC	36