

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Zhouf Daniel

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Vliv látek nebílkovinného charakteru na stabilitu a tvorbu pěny piva

Zhouf Daniel

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniel Zhouf**
Osobní číslo: **C14106**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Vliv látek nebiřkoviného charakteru na stabilitu a tvorbu pěny piva**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na pozitivní a negativní vliv látek nebiřkovinného charakteru na tvorbu a stabilitu pěny piva. Zaměřte se také na látky způsobující přepěňování piva. Dále se věnujte analytickým metodám vhodným pro monitorování těchto látek v pivu.
2. Diskutujte jednotlivé metody vhodné pro extrakci a stanovení látek působící na kvalitu pěny piva. Na základě poznatků z literatury zvolte vhodnou metodu pro stanovení obsahu vybrané skupiny látek.
3. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. . Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

28. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji,

že tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.6.2018

Zhouf Daniel

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval Ing. Lence Česlové, Ph.D. za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěla k vypracování, a také za vedení celé bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá pozitivním a negativním vlivem látek nebílkovinného charakteru na tvorbu a stabilitu pěny piva. Dále je práce věnována samovolnému přepěňování piva, tzv. gushingu a zákalu piva.

V experimentální části byla stanovena antioxidační aktivita vybraných vzorků piv pomocí spektrofotometrických technik ABTS a DPPH a celkový obsah fenolických látek pomocí metody dle Folin - Ciocalteu.

Klíčová slova

Pivní pěna, gushing, antioxidační aktivita, fenolické látky

ANNOTATION

This thesis deals with the positive and negative influence of non-proteinaceous compounds on the formation and stability of beer foam. Furthermore, the work is devoted to the spontaneous overfoaming of beer, so called gushing and beer turbidity.

In the experimental part the antioxidant activity of selected beer samples was determined by ABTS and DPPH spectrophotometric techniques and the total content of phenolic substances by means of Folin - Ciocalteu method.

Keywords

Beer foam, burning, antioxidant activity, phenolic substances

OBSAH

Seznam zkratk	10
Úvod	11
1 Pivní pěna	12
1.1 Tvorba pěny a její destrukce	13
2 Faktory ovlivňující pěnivost	14
3 Látky bílkovinného charakteru	15
4 Látky nebílkovinného charakteru pozitivně ovlivňující tvorbu pěny	17
4.1 Hořké kyseliny a jejich význam	17
4.1.1 α - a iso- α -hořké kyseliny	17
4.1.2 Hydrogenované iso- α -hořké kyseliny	18
4.2 Gushing	20
4.2.1 Faktory ovlivňující samovolné přepěnění piva	22
4.2.2 Možnosti potlačení gushingu	22
5 Látky negativně ovlivňující pěnu piva	23
5.1 Polyfenolické látky	24
5.1.1 Chemická struktura přírodních polyfenolů piva	25
5.1.2 Sladové polyfenolické látky	27
5.1.3 Chmelové polyfenoly	27
6 Koloidní zákal piva	28
6.1 Prekurzory zákalu	28
6.1.1 Zákalotvorné polyfenoly	28
6.1.2 Zákalotvorné bílkoviny	29
6.2 Vznik koloidního zákalu	30
6.2.1 Teorie vzniku koloidního zákalu	30
6.2.2 Chladový a trvalý zákal	31
7 Antioxidační aktivita a její stanovení	32
7.1 Metody stanovení	32
7.1.1 Metoda ABTS (metoda TEAC)	32
7.1.2 Metoda DPPH	33
7.1.3 Metoda FRAP	34
7.1.4 Metoda ORAC	34
8 Metody pro stanovení polyfenolů	35
8.1 Metoda pomocí Folin-Ciocalteuova činidla	35
8.2 Kapalinová chromatografie	36

8.3	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	38
9	Experimentální část	39
9.1	Přístroje a zařízení	39
9.2	Chemikálie a vzorky	39
9.3	Pracovní postup	39
9.3.1	Metoda ABTS.....	39
9.3.2	Metoda DPPH.....	40
9.3.3	Metoda pomocí Folin-Ciocalteuova činidla	40
9.4	Výsledky a diskuze.....	41
9.4.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích piva	41
9.4.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH.....	42
10	Závěr.....	44
11	Zdroje	45

SEZNAM ZKRATEK

HMW	vysokomolekulární protein (High Molecular Weight)
LMW	nízkomolekulární protein (Low Molecular Weight)
LTP1	intracelulární přenašeč lipidů (Lipid Transfer Protein)
TAC	celková antioxidační kapacita
TAA	celková antioxidační aktivita
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast
AH	antioxidant
R [•]	radikál
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
UHPLC	ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
DAD	detektor s diodovým polem
MS	hmotnostní spektrometrie
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
ESI	ionizace elektrosprejem
CI	chemická ionizace
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
EI	elektronová ionizace
FRAP	antioxidační účinnost redukující železitý iont (Ferric Reducing Antioxidant Power)
ORAC	kapacita absorpce kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid) – dihydrochlorid
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazylu
ABTS	kyselina 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)

ÚVOD

Pivo je kvašený alkoholický nápoj hořké chuti vyráběný v pivovaru z obilného sladu, vody a chmele pomocí pivovarských kvasinek. Na území Česka se jedná o nejkonzumovanější alkoholický nápoj. Řadí se mezi alkoholické nápoje s relativně nízkým obsahem alkoholu. Kromě alkoholu a vody obsahuje mnoho dalších významných látek mezi které řadíme: sacharidy, bílkoviny, hořké látky chmele, polyfenolické sloučeniny, oxid uhličitý, vitamíny a minerální látky.

Fenolické sloučeniny jsou produktem rostlin a tvoří rozsáhlou kategorii, kterou můžeme dělit do několika skupin, ale i podskupin. Nejdůležitějšími zástupci jsou flavonoidy a fenolové kyseliny. Veškeré fenolické látky se charakterizují svými antioxidačními vlastnostmi. Především u piva, ale také u celé řady šumivých a ovocných nápojů se můžeme setkat s jevem, který se nazývá gushing. Jedná se o jev, který můžeme zpozorovat hned po otevření obalu, dochází k masivnímu přepěnění nápoje (uvolnění oxidu uhličitého).

1 PIVNÍ PĚNA

Pivo jako známý alkoholický nápoj se v žádném případě neobejde bez kvalitní pěny. Zejména u točených piv je pěna prvotním faktorem působící na spotřebitele, vyvolává chuť k jídlu a pivo udržuje čerstvé.

Pro piva vyrobená českými výrobci, tzn. spodně kvašená, je charakteristické, že ihned po načepování vytváří bohatou, hustou a dlouhotrvající pěnu, která zaujímá velký objem. Vlastnosti pивní pěny řadíme mezi kvalitativní a kvantitativní znaky piva. Lze tedy říci, že výrobci se snaží o její nejúspěšnější dosažení a zlepšení, a to již od středověku¹.

Z fyzikálně-chemického hlediska můžeme pивní pěnu vymežit jako disperzi plynu v kapalině, v tomto případě je disperzovanou fází vždy plynná látka. Pro popis pивní pěny se užívá celá řada pojmů: pěnivost, stabilita, kvantita, přilnavost, hustota pěny a v některých případech i charakteristika pěny².

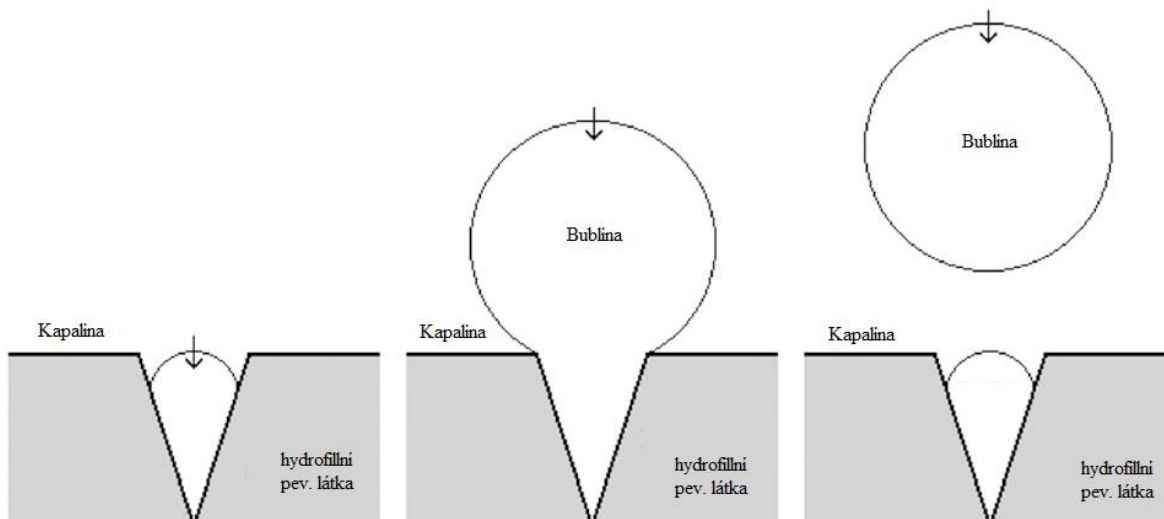
Pěnivost chápeme jako schopnost piva vytvářet pěnu při nalití do sklenice, tato skutečnost je ovlivněna obsahem oxidu uhličitého v pivu. Schopnost pěny ulpět na stěně sklenice charakterizujeme jako přilnavost. Jev můžeme také chápat jako schopnost dvou rozdílných materiálů společně přilnout. Stabilitu pěny definujeme jako čas mezi vznikem pěny a jejím rozpadem, kvantita vyznačuje množství pěny za daných podmínek. Hustota pěny je objem piva, který je zachycen v pění a její hodnota od načepování piva značně klesá².

Znaky nebo charakteristiky jakosti můžeme dělit na skutečné a náhradní. Skutečné znaky se velice obtížně stanovují, zaměřují se pouze na naše smyslové vnímání, pocity. Často se využívá přirovnání např. pivo jako křen, má zlatavou barvu a pěnu jako smetanu. Při pozorování pěny se kombinují různé její vlastnosti, protože konzument vnímá nejenom výšku pěny, ale i její tvar, strukturu a barvu. Náhradní znaky se určují podstatně lépe, velkou výhodou je jejich měřitelnost, která hraje důležitou roli ve výrobě. Mezi tyto znaky patří barva piva (měřená spektrofotometricky) nebo obsah oxidu uhličitého³.

1.1 TVORBA PĚNY A JEJÍ DESTRUKCE

Tvorba pěny a její rozklad je založen a rozdělen do několika fází – tvorba bublin, odvodňování pěny, koalescence a disproportionace². Při tvorbě pивní pěny se nejvíce uplatňuje heterogenní nukleace. Pod tímto pojmem si můžeme představit vytváření bublin u nápojů, které jsou přesyceny oxidem uhličitým v tzv. nukleačních polohách. V tomto případě bublinky nevznikají samovolně, ale vždy se vytvoří již na vzniklé bublině. Například prasklina nebo štěrbina ve stěně nádoby může plnit funkci nukleační polohy^{4, 5}. V této fázi mohou nastat dvě možnosti, buď bude povrch bubliny dokonale smáčen nebo povrch smáčen nebude. V případě, že okolní kapalina smáčí povrch bubliny, tak se povrch bubliny jeví jako konkávní (dutý). Tlak plynu v bublině je daleko větší než v dotýkající se kapalině, proto bublina praskne a plyn se může jednoduše rozpustit v kapalině. Jestliže povrch bubliny v nukleační poloze není smáčen, nastává druhá možnost a povrch je tzv. konvexní (vypouklý). Dojde k transportu plynu a růstu dané bubliny (obrázek 1). Pohyb plynu z piva do bubliny probíhá pouze difúzí, což je samovolné rozptýlení částic v prostoru. Při nízkém povrchovém napětí dochází ke vzniku menších bublin, z tohoto faktu poté vyplývá požadovaná krémovitá povaha pивní pěny^{4, 5}.

Odvodňování pěny si můžeme představit jako jev, při kterém dochází k úbytku kapaliny z piva, a to vlivem gravitace a tlaku. Dochází ke ztenčování kapalinových filmů mezi bublinami, v průběhu je však možno prasknutí filmu a dojde ke spojení dvou nebo více menších bublin v jednu větší. Tento jev se nazývá koalescence. Koalescenci mohou zvyšovat i určité skupiny látek, např. lipidy. Poslední fází celého procesu tvorby a rozpadu pěny je jev disproportionace, při kterém dochází k difuzi plynu z bublin podstatně menších do bublin větších. Ve vnější vrstvě pěny nastává difuze kyslíku a dusíku dovnitř bublin a zároveň dochází k difuzi oxidu uhličitého do okolního prostředí. Kyslík a dusík jsou plyny, které jsou v pivu velmi málo rozpustné, dochází tedy k zmenšování bublin a ihned vzniká prostor pro příjem bublin ze spodnějších vrstev pěny^{2, 5}.



Obrázek 1 Proces tvorby bublin⁵

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PĚNIVOST

Pivo je nápoj, který obsahuje rozsáhlé spektrum látek, mající především původ z použitých surovin. Tyto látky mají buď pozitivní anebo negativní vliv na pěnovost pивní pěny.

Látky pozitivně působící na pěnovost jsou tzv. amfifilní, to znamená, že jejich hydrofobní část se orientuje do plynu a protější (hydrofilní) část zase směřuje do kapaliny. Probíhá interakce s jinými látkami a vytváří pevný základ pro pěnu. Pozitivně působící látky se shromažďují v mezifázovém prostředí a zároveň vyztužují povrchovou blanku bubliny. Látky omezují povrchové napětí, ale na druhou stranu zvyšují viskozitu piva^{1,6}. Do této skupiny řadíme – především bílkoviny s hydrofobním charakterem, hořké látky chmelu, kovové ionty (např. Mn^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), látky polysacharidové povahy a v poslední řadě i samotný oxid uhličitý^{1,6}.

Přičemž do skupiny látek negativně ovlivňující pěnovost řadíme především látky zabraňující pozitivně působícím látkám přecházet do pивní pěny a pomocí povrchové aktivity vytlačují látky tvořící pěnu z bubliny. Látky, které negativně ovlivňují pěnu i její trvanlivost jsou především lipidy, bazické aminokyseliny, polyfenoly, některé kovy (cín, nikl, měď, železo a řada dalších) a do značné míry i ethanol^{1,6}.

3 LÁTKY BÍLKOVINNÉHO CHARAKTERU

Pivo obsahuje 3–5 g/l čistých bílkovin, přičemž 85 % z těchto bílkovin pochází ze sladu a pouze 15 % z pivovarských kvasinek. Obsah aminokyselin se vždy pohybuje v rozmezí od 300 do 500 mg/l, a jsou zde zahrnuty všechny esenciální aminokyseliny. Tyto látky mají vliv na vznik koloidních zákalů, stabilitu pěny, ale přispívají i k chuti piva^{2, 7}.

Koloidní zákal se obvykle dělí na chladové a trvalé. Chladové koloidní zákal se z piva vylučují při jeho ochlazení na 0 °C, v opačném případě, při zvýšené teplotě (20 °C) se rozpustí. Trvalé zákal jsou v podstatě druhou fází chladového zákalu, při stárnutí dochází k souměrnému zvětšování koloidních částic, ty jsou potom nerozpustné a z piva se ihned vyloučí. Mezi proteiny tvořící koloidní zákal patří především hordeiny, vyznačující se vysokým obsahem glutaminu a prolinu^{2, 7, 31}.

Srážení síranem amonným, z hlediska tvorby zákalů, lze proteiny rozdělit do čtyř frakcí (tabulka 1)³¹.

Tabulka 1 Dělení pivovarských proteinů

Protein T	k chladu citlivý tanin-globulinový komplex
Protein C	koagulovatelný albumin, oxiduje se na protein O
Protein O	oxyprotein nebo nukleoprotein
Protein D	rozpustná frakce obsahující větší podíl polysacharidů

Bílkoviny s pozitivním vlivem na tvorbu pěny mají hydrofobní charakter. Tato struktura umožňuje stálý přechod bílkovin do pěny a v mezifázovém rozhraní orientuje bílkoviny do bubliny. Bílkoviny jsou během výroby piva štěpeny podle struktury, konfigurace a obsahu nebílkovinných částí. Může nastat také případ, kdy bílkoviny do piva vůbec nepřechází, to je způsobeno nerozpustností ve vodě a odolností ke štěpné aktivitě enzymů (např. gluteliny). Do rozpustné formy se převádí asi 35–40 % látek bílkovinného charakteru. Pomocí enzymů pak vznikají látky, které mají nižší a velmi nízkou molekulovou hmotnost než prvotní bílkoviny. Obsah pěnotvorných bílkovin v průběhu sladování roste, jejich štěpné produkty jsou esenciálními faktory pro kvasničné buňky.

Nízký obsah štěpných produktů má za následek negativní průběh kvašení, na druhou stranu vysoká aktivita těchto enzymů způsobuje zhoršení kvality pěny^{2, 7}.

Podle rostoucí hydrofobicity a specifické hmotnosti lze proteiny rozdělit na dvě charakteristické skupiny: (**HMW** – vysokomolekulární, High Molecular Weight) a (**LMW** – nízkomolekulární, Low Molecular Weight) proteiny. Do HMW frakce jsou zařazeny proteiny s molekulovou hmotností v rozsahu 35 až 50 kDa, do druhé LMW frakce patří pouze bílkoviny s molekulovou hmotností od 5 do 15 kDa. HMW frakce obsahuje převážně protein Z, LMW frakci tvoří LTP1 (Lipid Transfer Protein 1) a dále směs hordeinových a glutelinových fragmentů^{2, 7, 31}.

Protein Z tvoří 10 až 25 % všech nedialyzovatelných bílkovin piva a z jedné třetiny je glykosylován. Jedná se ječnou albuminovou bílkovinu. Molekulová hmotnost se pohybuje okolo 40 kDa patří do HMW frakce.

Lipid Transfer Protein (LTP1) je tzv. intracelulárním přenašečem lipidů a řadí se do skupiny LMW frakce. Mezi LTP1 v ječných zrnech a zeleném sladu se nenachází žádné významné odlišnosti. Opět, jako u proteinu Z, se jedná o albuminovou bílkovinu, u které byla dokázána schopnost inhibovat sladové cysteinové endoproteasy.

Hordeiny představují hlavní zásobní bílkoviny ječmene. Skládají se z polymorfní směsi několika komponent, které mohou být oddělitelné například elektroforézou. Základní skupiny hordeinů značíme – B, C, D a γ . Další dělení hordeinů, se kterým se můžeme setkat, je na vysokomolekulární (> 51 kDa), středněmolekulární (29–51 kDa) a nízkomolekulární (< 29 kDa) látky. Látky jsou bohaté na prolin a glutamin, ale mají i svoji negativní stránku, tzn. účastní se na vzniku koloidních zákalů^{2, 7}.

4 LÁTKY NEBÍLKOVINNÉHO CHARAKTERU

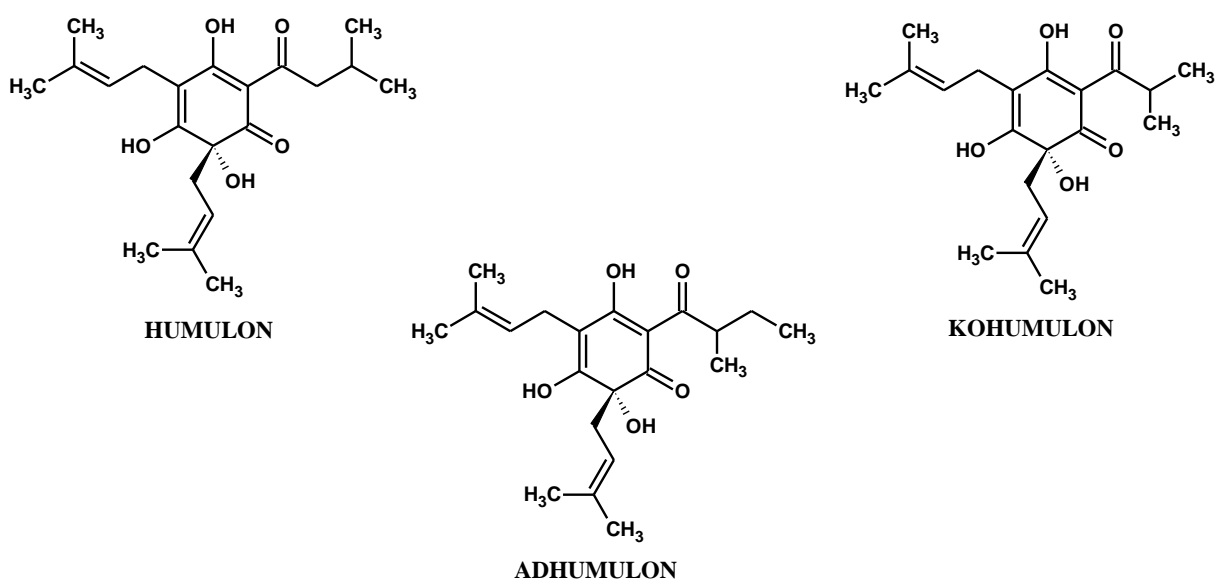
POZITIVNĚ OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU PĚNY

Jedním z typických znaků piva, je právě jeho specifická příjemná hořkost. Hořké chmelové látky společně s proteiny patří k hlavním a zároveň nejdůležitějším látkám podporující pěnovost piva. V pivní pěně se vyskytují zejména tzv. iso- α -hořké kyseliny. Tyto kyseliny pochází z chmele a v průběhu varného procesu přecházejí až do hotového alkoholického nápoje. V posledních letech se při výrobě piva velmi často používají průmyslově připravené výrobky, ať už v podobě upravených extraktů nahrazující chmel, anebo i přípravky různě modifikované (nejčastěji hydrogenované) analogy iso- α -hořkých kyselin. Chemicko-fyzikální vlastnosti těchto látek poté způsobují lepší stabilitu pěny, vyšší hořkost a rezistenci vůči světelnému rozpadu^{2, 8}.

4.1 HOŘKÉ KYSELINY A JEJICH VÝZNAM

4.1.1 α - a iso- α -hořké kyseliny

α -Hořké kyseliny jsou základními složkami chmelu. Během pivovarského procesu z nich vznikají iso- α -hořké kyseliny. Ve většině případů se obsah α -hořkých kyselin pohybuje okolo 3-10 % (m/m). Množství α -hořkých kyselin ve chmelu je závislé na odrůdě a podmínkách pěstování. Mezi tyto isomery, které jsou obsaženy ve chmelu patří humulon, kohumulon a adhumulon (obrázek 2)⁸.



Obrázek 2 Strukturní vzorce α -hořkých kyselin⁸

Při chmelovaru dochází k isomeraci α -hořkých kyselin na příslušné iso- α -hořké kyseliny, čímž dochází ke zvýšené rozpustnosti ve vodě a dále k vyšší organoleptické hořkosti. Isomerace je nejvíce ovlivněna přítomností kovových iontů (Cu^{2+} , Mg^{2+}) a také pH.

Iso- α -hořké kyseliny jsou zodpovědné za přibližně 70 % celkové hořké chuti. Zbývající procento hořké chuti pochází z vedlejších produktů izomerace, tyto produkty jsou oxidovanou formou a můžeme je označit jako allo-, anti- a abeo-iso- α -hořké kyseliny. Oxidované formy kyselin vznikají převážně při chlazení horké mladiny a mají slabší hořkost. Allo-iso- α -hořké kyseliny mají podobnou hořkost jako iso- α -hořké kyseliny. Abeo-iso- α -hořké kyseliny nevykazují takovou hořkost, ale mají pozitivní vliv na pěnivost a přilnavost pивní pěny. Oproti tomu anti-iso- α -hořké kyseliny vykazují až dvakrát tak větší hořkost než samotné iso- α -hořké kyseliny⁸.

4.1.2 Hydrogenované iso- α -hořké kyseliny

Látky z oblasti redukovaných iso- α -hořkých kyselin se dělí podle stupně redukce, resp. karbonylových vazeb na postranním řetězci na:

- dihydro-iso- α -hořké kyseliny
- tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny
- hexahydro-iso- α -hořké kyseliny

Výhodou použití redukovaných forem iso- α -hořkých kyselin z technologického hlediska jsou moderní preparáty. Pivovary daleko více nahrazují granulovaného chmele chmelovými extrakty. Hlavním důvodem, proč se tyto formy stále více používají, je snadnější dávkování a dále mají výrazně vyšší chemickou stabilitu. Redukované formy iso- α -hořkých kyselin vykazují řadu výhod, zejména: vyšší hořkost, odolnost proti světelné degradaci a lepší stabilitu pěny piva^{2,8}.

Při skladování piva ovšem dochází k rozkladu iso- α -kyselin a to hlavně vlivem tzv. autooxidace a reakcí s reaktivními formami kyslíku.

Velice významnou předností redukovaných iso- α -kyselin je schopnost zlepšit tvorbu pивní pěny a prodloužit tak dobu jejího rozpadu, zvláště za přítomnosti hydrofobních polypeptidů. Vzhledem k jejich nepolární povaze jsou iso- α -kyseliny hydrofobní, společně s kationty dvojmocných kovů a bílkovinami vytváří vždy základ stabilního povrchu membrán pěnových bublin. V souvislosti s některými ionty těžkých kovů je potřeba vědět, že již při koncentraci $\mu\text{g/l}$ vyvolávají tzv. „gushing“, což je samovolné přepěňování piva. Mezi tyto kovy řadíme: cín, molybden, bismut, nikl a železo. Zvýšením hydrofobicity u redukovaných iso- α -hořkých kyselin dochází ke zvýšení hustoty pěny a přilnavosti ke stěně sklenice, a zároveň brzdí rozpad pивní pěny. Nevýhodou obzvláště u hexahydro-iso- α -hořkých kyselin je, že při nadbytečném užívání těchto látek vzniká pěna nepřirozeně hustá a k tomu je velice stálá. Tato skutečnost je opět další důvod pro opatrné využívání těchto derivátů při výrobě piva^{2,8}.

4.2 GUSHING

Gushing je jev, který je možno zpozorovat ihned po otevření obalu, kdy dojde k masivnímu přepěnění nápoje (obrázek 3).

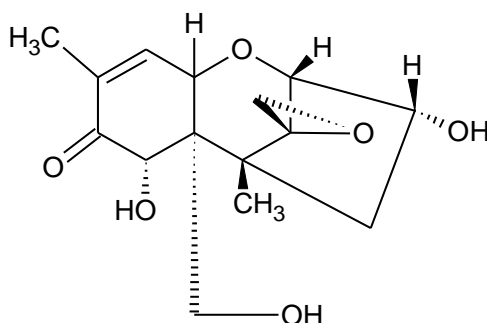
Gushingem jsou postiženy nejvíce piva a nápoje vyrobené z červených plodů a může vzniknout, jak u šumivých vín, tak i u ovocných šťáv. Podstatou tohoto procesu je okamžité uvolnění oxidu uhličitého po otevření láhve. Gushing je považován za určitý neúspěch daného produktu, pivovary poté trpí těžkými finančními ztrátami. Inhibiční účinky se vyskytují u α -kyselin a u nenasycených mastných kyselin, které jsou obsaženy v chmelových silicích. Přepěňování piva souvisí s tvorbou



Obrázek 3 Ukázka gushingu⁹

látek, které vznikají při napadení obilky ječmene mikroskopickými houbami. Tomuto ději říkáme tzv. primární gushing. K látkám způsobující tento primární gushing patří hydrofobiny. Jedná se o extracelulární povrchově aktivní proteiny, které vytváří kvasinky a vláknité houby. Tento typ hub může zároveň produkovat i mykotoxiny.

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, dnes se spíše setkáváme s názvem plísně. V klimatických podmínkách mírného pásu jsou nejrozšířenější mykotoxiny produkované vláknitými houbami rodu *Fusarium*. Za příznivých podmínek mohou růst v celém průběhu skladování. Největší význam z fusariových mykotoxinů v pivovarství mají tzv. trichothecenové mykotoxiny. Vyznačují se tepelnou odolností, což znamená, že až 10 % z nich dokáže přežít při procesu vaření piva a kvašení. To vše může vést až ke stabilizaci mikrobublinek. K nejvíce se vyskytujícím trichothecenovým mykotoxinům patří například deoxynivalenol^{10, 11}.



Obrázek 4 Strukturální vzorec deoxynivalenolu¹²



Obrázek 5 Fusariózy klasů¹³

Indikátorem mikrobiálního znečištění může být existence ergosterolu, tento sterol vzniká metabolickou činností mikromycetů. Ergosterol je jedním z charakteristických zástupců ze skupiny sterolů mikroskopických vláknitých hub, protože vytváří jejich buněčné stěny. Pokud patogen napadne rostlinu dochází ke vzniku specifických proteinů, které mají schopnost zastavovat růst hub. Z hlediska gushingu se jedná o velice významnou skupinu, reprezentanti této skupiny jsou enzymy chitinasa a 1, 3-glukanasa. Glukanasa a chitinasa mají synergický účinek. Uvedené enzymy umí hydrolyzovat buněčnou stěnu patogenů. Přírodním substrátem pro stresové proteiny jsou právě strukturální polysacharidy buněčných stěn hub. Patogenní mikroorganismy a jejich metabolity negativně ovlivňují kvalitu ječmene, ale i kvalitu sladu a piva.

Gushing však nemusí vždy souviset s přítomností patogenů. Příčinou tzv. sekundárního gushingu je např. zákal, kovové ionty nebo krystaly šťavelanu vápenatého. Kyselina šťavelová je přirozená složka v ječmeni, tak i ve sladu. Pokud nastane situace, kdy je přítomen nadměrný obsah této kyseliny, ihned dochází k vytvoření krystalizačních jader, což může mít za následek přepěňování piva neboli gushing. Sekundární gushing je pak velmi často způsoben chybami ve výrobě anebo špatnou manipulací s pivem. Tento druh gushingu byl zaznamenán u piv, které byly zhotoveny především z chmelových extraktů^{10, 14, 15}.

4.2.1 Faktory ovlivňující samovolné přepěnění piva

Mezi faktory, které ovlivňují gushing řadíme: teplotu, mechanický pohyb, tvar lahve, nečistoty v lahvích, detergenty, těžké kovy, mikrobiální kontaminace, obsah oxidu uhličitého a obsah plynů v hrdlu lahve.

Právě teplotní podmínky jsou úzce spojeny se stupněm přesycení oxidu uhličitého v okamžiku otevření obalu. Na základě této skutečnosti rozdělujeme gushing ovlivněný teplotou na zimní a letní.

Bylo prokázáno, že mezi neaktivnější těžké kovy způsobující gushing patří Fe, Sn, Ni, Mo a Bi.

Důležitým faktorem, který hraje roli při skladování daného nápoje je mechanický pohyb. Pokud se při skladování lahev s pivem nacházela ve svislé poloze, tak pivo mělo daleko nižší sklon ke gushingu než piva v poloze horizontální. Čas skladování piva má také značný vliv na vznik gushingu a to, že je nejsilnější po 2–10 týdnech, poté znovu upadá¹⁶.

4.2.2 Možnosti potlačení gushingu

Prevenčí proti přepěňování piva je vždy správný a kvalitní výběr surovin, a tedy i ječmene, sladu a chmele. Vzhledem k velikému mikrobiálnímu poškození ječmene během pěstování a také zpracování, je nutno věnovat maximální pozornost podmínkám zrání, sklizně a dozrávání ječmene, a v první řadě dbát na vysokou hygienu.

Značně vysoké teploty při klíčení mohou taktéž podpořit růst mikroorganismů, zvláště plísní. Některé plísně jsou natolik schopné vylučovat látky podporující a vyvolávající gushing. Příklad desinfekce k máčecí vodě se ukázal jako značně účinná prevence proti gushingu piva, která byla vařena ze sladů napadeného *Fusarii*.

Gushing můžeme potlačit pozdějším přídatkem chmelu. Lze tedy říci, že čím vyšší je dávka chmele, tím je menší sklon k samovolnému přepěňování piva. Na druhou stranu je známo, že chmel obsahuje látky podporující, ale i látky potlačující gushing, ovšem vždy záleží na výběru odrůdy. Z tohoto hlediska i výběr chmele je nástrojem k ochraně proti gushingu¹⁶.

5 LÁTKY NEGATIVNĚ OVLIVŇUJÍCÍ PĚNU PIVA

Kromě látek pozitivně ovlivňujících pěnu piva existují i látky, které mají nepříznivý vliv na tvorbu pивní pěny. Mají za důsledek vznik nestabilní, nevzhledné, nerovnoměrné anebo nedostatečné pěny. Do této skupiny látek patří lipidy, bazické aminokyseliny, proteasy, polyfenoly, ethanol, ale i některé kovové ionty, které toxicky ovlivňují kvasinky, např.: Cu, Ni, Cd, Pd. Všechny tyto látky vzájemně působí se stavebními složkami pěny, a tak zabraňují vytvoření pěny, snižují viskozitu a zvyšují povrchové napětí².

Lipidy představují různorodou skupinu látek, které jsou charakteristické tím, že jsou velmi špatně rozpustné ve vodě. Na druhou stranu mají výbornou rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Zdrojem lipidů jsou suroviny: chmel, slad a kvasnice. Dalším možným výskytem lipidů je i nápojové sklo (může dojít k znečištění skla látkami lipidové povahy) a mycí prostředky, které negativně ovlivňují pивní pěnu. V průběhu celé výroby dochází ke snížení hladiny lipidů, protože účinek lipidů je založen na vzájemném prolínání s hydrofobní částí bílkovin obklopující bubliny pěny. Tímto způsobem se stávají bubliny velice nestabilní a okamžitě dochází k urychlení rozpadu pěny. Negativní účinek na přilnavost pивní pěny se přisuzuje části nízkomolekulárních dusíkatých látek, především bazickým aminokyselinám².

Ethanol nemá jednostranný vliv na pěnivost piva, ale současně je to jedna ze základních složek z pohledu charakteru výrobku, ale také požadavků konzumenta. Alkohol nemá tu schopnost spojovat hydrofobní polypeptidy v pěnovém filmu a podporovat kostru pěny. V nižších koncentracích (1-3 % (m/m)) pozitivně ovlivňuje stabilitu a přilnavost pěny. Při koncentracích do 10 % (m/m) se jeho negativní vliv neprojevuje. Z proteolytických enzymů je negativně ovlivňující pěnivost nejvíce proteínasa A, která štěpí bílkoviny při pH 4–5. Zdrojem jsou kvasinky.

Polyfenoly jsou také látky, které velice ovlivňují pěnu piva, i její stabilitu².

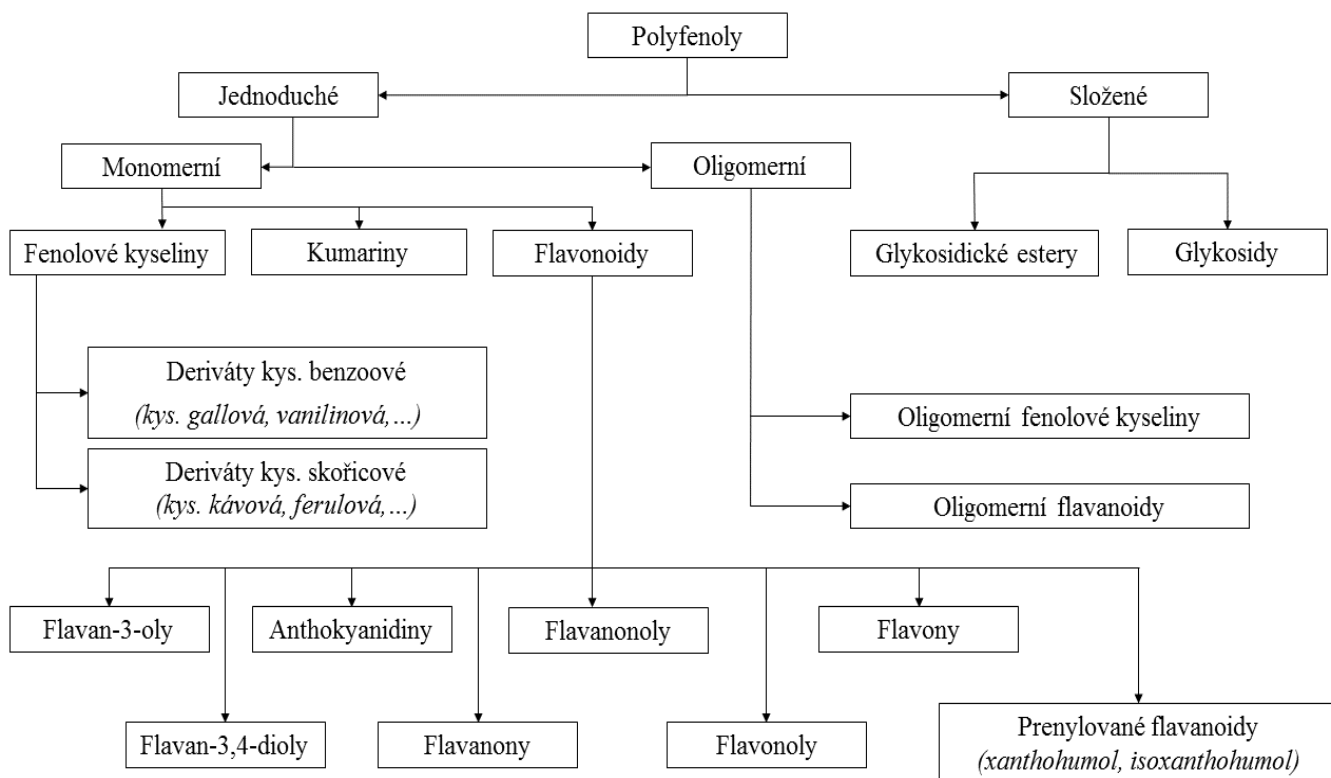
5.1 POLYFENOLICKÉ LÁTKY

V minulosti, kdy existovaly spíše menší pivovary, které dodávaly pivo jen do nejbližšího okolí, nebylo nutné, aby pivo vydrželo čerstvé několik měsíců. Převrat nastal až v průběhu 20. století, kdy se výroba začala soustřeďovat do větších provozů, pivo se začalo převážet na větší vzdálenosti, což významně zvýšilo všeobecné nároky na výrobu, především na jeho trvanlivost. Novodobý trend vede k výrobě piva v plechovkách, skleněných lahvích, ale i plastových. Tento trend poté směřuje ke změně stylu a intenzivnějšímu exportu.

Vysoká trvanlivost každého piva neznamena jenom zachování čirosti, která je v dnešní době samozřejmým požadavkem a pro většinu spotřebitelů je v dnešní době dokonalá čirost zárukou čerstvosti, ale přítomnost jakýkoliv pevných částic je ve většině případů považováno za vadu. Dalším požadavkem je také udržení veškerých kvalitativních vlastností. Mezi tyto kvalitativní vlastnosti zařídíme chuť, vůně, barva, pěnivost, a to během transportu i při následujícím skladování piva. Bohužel žádný sebelepší systém výroby nedokáže jednoznačně zajistit, že finální výrobek bude mít vynikající stabilitu. Složky, které mají vztah k výše uvedeným kvalitativním znakům a stabilitě piva, jsou polyfenolické látky. Do piva se dostávají z ječmene, sladu a chmele. Přírodní polyfenolické složky piva vykazují antioxidační účinky, které se projevují především v inhibici oxidačních přeměn lipidických složek, a tím i blokováním procesů stárnutí chuti piva. Přiměřená konzumace piva je jedním z možných zdrojů přírodních antioxidantů a látek s prokazatelnými antisklerotickými, antikarcinogenními, antioxidačními, antimikrobiálními a protizánětlivými účinky¹⁷.

Rostlinné polyfenoly jsou amorfnní látky fenolické povahy, rozšířeny ve většině částí rostlin, tzn. v kůře, dřevě, listech, plodech a kořenech. Polyfenoly srážejí roztoky želatiny, alkaloidů a se železitými solemi dávají tmavé sraženiny. Naopak se oxidují v alkalickém prostředí atd. V rostlinném „světě“ jsou tyto látky všudypřítomné, rostlinám dodávají jejich charakteristické zbarvení občas i chuť plodům.

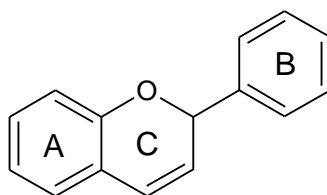
Hlavními reprezentanty jsou flavonoidy, zahrnují se však mezi ně i další látky: kumarinové deriváty, chinony, ubichinony, deriváty kyseliny chlorogenové a volné fenolové kyseliny¹⁷.



Obrázek 6 Rozdělení polyfenolických látek¹⁹

5.1.1 Chemická struktura přírodních polyfenolů piva

Nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolických složek piva představují flavanoidy. Jsou to látky obsahující dvě benzenová jádra navzájem spojená tříuhlíkatým řetězcem (C₆-C₃-C₆) a jejich struktura se odvozuje od heterocyklického flavanu (obrázek 7)¹⁷.



Obrázek 7 Struktura flavanu¹⁷

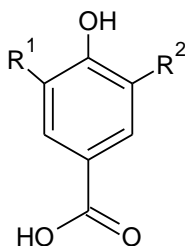
Polyfenoly se běžně člení do čtyř podskupin, a to na chalkony, flavanoidy, flavonoly a anthokyanidiny (obrázek 6).

Chalkony jsou prvními meziprodukty v syntéze flavonoidů vznikající reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkosynthasou. Flavanonová struktura vzniká isomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následující oxidace směřuje k flavonolům. Flavanolová polymerace může dále vést k dobře známým proanthokyanogenům. V tomto případě vždy vznikne vazba mezi C-8 kruhu A a C-4 prostředního můstku. Krátké polymery s méně než 10 jednotkami jsou obvykle označovány za oligomery, na druhou strany zase dlouhé řetězce polymerů jsou označovány jako taniny^{17, 18}.

Další jednoduché rozdělení polyfenolů (obrázek 8)¹⁸:

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

a)



$R_1, R_2 = H$

k. *p*-hydroxybenzoová

$R_1 = OH, R_2 = H$

k. protokatechová

$R_1 = OH, R_2 = OH$

k. gallová

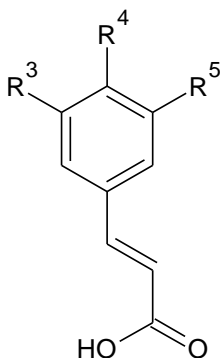
$R_1 = H, R_2 = OCH_3$

k. vanilinová

$R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3$

k. syringová

b)



$R_3 = H, R_4 = H, R_5 = H$

k. skořicová

$R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = H$

k. *p*-kumarová

$R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OH$

k. kávová

$R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OCH_3$

k. ferulová

$R_3 = OCH_3, R_4 = OH, R_5 = OCH_3$

k. sinapová

Obrázek 8 Struktura derivátů odvozených od kyseliny *p*-hydroxybenzoové a), kyseliny skořicové b)¹⁹

5.1.2 Sladové polyfenolické látky

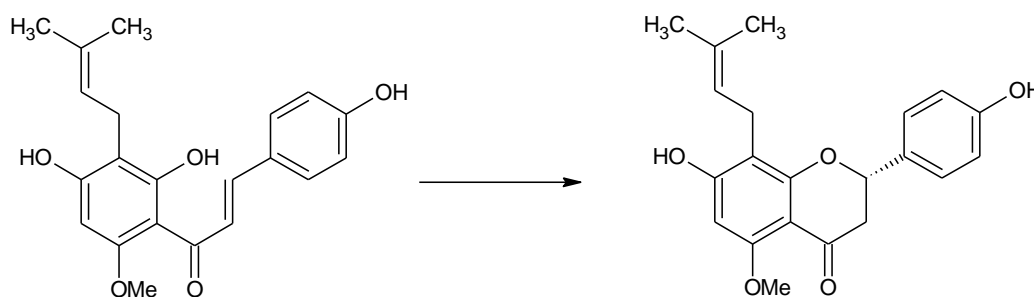
V ječmeni se polyfenoly se nacházejí v zrnech a v aleuronové vrstvě. Množství těchto látek se pohybuje od 0,1 do 0,6 % sušiny. Velice důležitou roli hraje odrůda, ale i místo pěstování. Při nižším obsahu polyfenolických látek piva se většinou setkáváme s vyšším obsahem bílkovin. V obilce se nachází jednoduché polyfenolové kyseliny (syringová, ferulová, vanilinová, *p*-hydroxybenzoová) a to ve formě buď volné nebo vázané. Častější je výskyt ve formě glykosidu nebo esteru, jako je: kyselina chlorogenová, kávová, isoferulová, skořicová apod^{18, 19}.

5.1.3 Chmelové polyfenoly

Doposud bylo v chmelu, mladíně a pivu nalezeno a izolováno přes sto polyfenolických látek. Jsou důležité pro koloidní stabilitu piva, jeho barvu, podílí se také na charakteru hořkosti. Chmel se na obsahu polyfenolu v pivu podílí asi z jedné pětiny a slad ze čtyř pětin. Některé druhy polyfenolových látek (tanoidy) snižují stabilitu piva reakcí s polypeptidy a vytváří s nimi zákal^{18, 19}.

Celkem velké množství flavonoidů s prenylovaným substituentem na kruhu A obsahují chmelové hlávky. Okolo 80 % z nich tvoří tzv. xanthohumol, který do piva přechází jako isomer a to, jako isoxanthohumol. Xanthohumol je žluto-oranžová krystalická látka, která se vyznačuje nepolárním charakterem je tedy možné ho začlenit do skupiny polyfenolů a zároveň i mezi chmelové pryskyřice. Primární biotransformace začíná v játrech a střevní mikroflóře. Xanthohumol také potlačuje přeměnu diacylglycerolu na triacylglyceroly. Při vyšší koncentraci těchto látek dochází ke zvýšení rizika obezity, aterosklerózy, ale také cukrovky (diabetes mellitus)¹⁸. Xanthohumol můžeme považovat i za velmi významnou složku chmele s preventivním účinkem proti vzniku a růstu nádorových buněk. Do dnešní doby byl potvrzen pouze účinek proti buňkám způsobující rakovinu prsu, tlustého střeva a prostaty.

V průběhu chmelovaru dochází k výrazným strukturním změnám prenylových flavonoidů. K nejnámější reakci se přiřazuje izomerace xanthohumolu na isoxanthohumol (obrázek 9)^{18, 20}.



Obrázek 9 Isomerační přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol²⁰

6 KOLOIDNÍ ZÁKAL PIVA

V pivovarské terminologii se koloidním zákalem piva rozumí soustava koloidních částic, které jsou vytvářeny tzv. prekurzory zákalu (zákalotvorné bílkoviny a polyfenoly). Bílkoviny a polyfenoly spolu rádi reagují a tvoří komplexy. Jejich částice se nepřetržitě zvětšují, a tím se komplexy stávají nerozpustnými. Na základě těchto poznatků dochází ke vzniku viditelného zákalu²¹. Vznik takového zákalu můžeme potlačit, a to používáním dostatečně kvalitních surovin, vhodným skladováním, ale nejdůležitější je odstranění většiny zákalotvorných prekurzorů. Tomuto kroku se říká tzv. stabilizace piva²². V dnešní době se na trhu vyskytuje celá skupina látek, jsou to tzv. stabilizační prostředky. Nejčastěji probíhá stabilizace až v konečných fázích úprav piva, ale najdou se i látky, které se do piva dávají dříve. Z piva se mohou odstranit buď sedimentací nebo při filtraci¹⁹.

6.1 PREKURZORY ZÁKALU

6.1.1 Zákalotvorné polyfenoly

Pozitivní vliv polyfenolů spočívá především v jejich antioxidačních vlastnostech. Díky antioxidačním vlastnostem mohou polyfenoly ovlivnit celou řadu fyzikálně-chemických pochodů např. brání vzniku aktivních karbonylových látek, které jsou příčinou celé řady nepříjemných chutí a vůní. Kromě toho oddalují vznik zákalu, protože monomerní polyfenoly, které se vážou na bílkoviny nemají zákalotvornou aktivitu. Naopak působením kyslíku dochází k oxidaci polyfenolů, tím pádem je jejich zákalotvorná aktivita a schopnost reagovat s danými bílkovinami vzrůstá, tzn. dojde ke vzniku koloidního zákalu²¹.

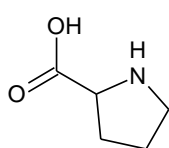
Mnohem větší zákalotvornou schopnost vykazují polyfenoly s vyšším počtem hydroxylových skupin na aromatickém kruhu. Toto je možno vysvětlit hlavně tím, že s počtem hydroxylových skupin v molekule roste jejich rozpustnost, naopak s počtem methoxylových skupin naopak rozpustnost klesá. Sladové a chmelové polyfenoly se od sebe liší poměrem zastoupení jednotlivých složek, jejich rozpustnost je velmi odlišná. V pivovarské technologii hrají důležitou roli chmelové polyfenoly, jsou více polární a také snáze rozpustné ve vodě než polyfenoly pocházející ze sladu. Kvůli horší rozpustnosti sladových polyfenolů je největší množství odstraněno při varu¹⁹.

6.1.2 Zákalo tvorné bílkoviny

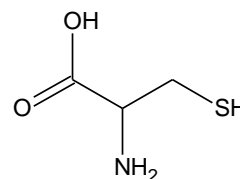
Bílkoviny jsou brány za základní stavební prvky koloidních zákalů. Pomocí vodíkových můstků a hydrofobních vazeb jsou spojovány s polyfenoly do složitých komplexů, které pak mohou za vhodných podmínek (teplota, pH) dosáhnout určité velikosti a v pivu se tak začne projevovat zákal. Ovšem zákal může vznikat i při velmi nízké koncentraci bílkovin. Je však třeba si uvědomit, že ne všechny bílkoviny (peptidy) obsažené v tomto nápoji mohou reagovat s polyfenolovými látkami za vzniku zákalu. Ty nejjednodušší bílkoviny se dělí podle relativní molekulové hmotnosti na albumin, gluteliny, globuliny a prolaminy.

Albuminy a gluteliny se na tvorbě koloidního zákalu podílí nejméně. Globuliny, konkrétně β -globulin, se na vzniku koloidního zákalu podílí podstatně více, protože obsahuje vysoké procento cysteinu (důležitá aminokyselina z pohledu tvorby koloidního zákalu). Prolaminy (hordeiny) jsou považovány za hlavní bílkovinnou část zákalů. Důkazem je, že tato skupina je bohatá na aminokyselinu prolin, který se velmi dobře váže na hydroxy skupinu polyfenolů, a tím plní hlavní úkol v tvorbě koloidního zákalu. Bylo prokázáno, že zákalotvorné frakce bílkovin obsahují 33–38 % prolinu a 32–33 % glutamové kyseliny (obrázek 10)¹⁹.

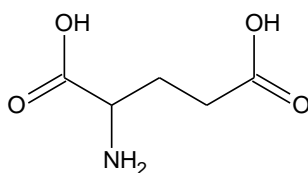
Látky, které také mohou ovlivnit koloidní stabilitu piva, jsou cukry (sacharidy). Z velké části se jedná o β -glukany a pentosany, které se spojují s polyfenolickými látkami a také s bílkoviny pomocí vodíkových můstků do složitějších komplexů. Pokud se v pivu vyskytne větší koncentrace kovových iontů, např.: ionty železa, mědi, zinku nebo hliníku, dochází ke vzniku tzv. kovového zákalu. Tyto látky se do piva dostávají hlavně z používaných kovových zařízení¹⁹.



PROLIN



CYSTEIN



GLUTAMOVÁ KYSELINA

Obrázek 10 Aminokyseliny vyskytující se v zákalotvorných bílkovinách¹⁹

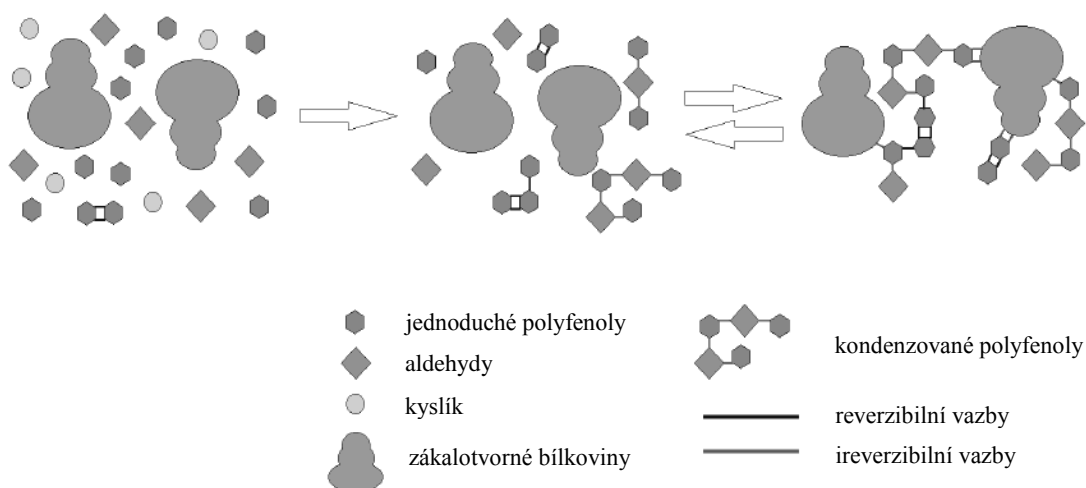
6.2 VZNIK KOLOIDNÍHO ZÁKALU

Koloidní zákal není přímo zdraví škodlivý, spotřebitel ho spíše vnímá jako nepříjemný jev. Tento jev vzniká postupně, pokud dojde k porušení přirozené rovnováhy mezi zákalotvornými bílkovinami a polyfenoly. K narušení rovnováhy dochází v největším případě už v pivovaru v průběhu úprav piva (filtrace, pasterace nebo stáčení) a během skladování piva.

6.2.1 Teorie vzniku koloidního zákalu

Do dnešní doby není zcela jasné a zřetelné, jak koloidní zákal vzniká. Nejčastěji je za příčinu uváděna reakce polyfenolů s bílkovinami, které jsou bohaté především na aminokyselinu prolin. Aminokyselina se váže k polyfenolům vodíkovými vazbami, ty se tvoří mezi atomem kyslíku poskytovaným karboxylovou skupinou bílkoviny a hydroxylovou skupinou polyfenolu. Nejnovější teorie o mechanismu vzniku koloidního zákalu říká, že tvorba zákalu probíhá ve dvou fázích tzv. lag-fáze a fáze růstu.

V první fázi dochází k polymeraci jednoduchých polyfenolů (flavan-3-olů). Karbonylové skupiny v poloze 4 mají schopnost vytvořit vodíkové vazby s hydroxylovou skupinou v poloze 5. Polymerace nemusí být v žádném případě indukována kyslíkem, ale stejnou schopnost má i řada aldehydů. Struktury polymerů, které vznikly působením kyslíku jsou odlišné od struktur vzniklých vlivem aldehydů. Oba typy vedou k rozvoji tzv. chladového zákalu. V růstové fázi potom dochází k reakci již polymerovaných polyfenolů se zákalotvornými bílkovinami a to tak, že zákalotvorné polyfenoly se vážou na specifická místa bílkovin (obrázek 11)¹⁹.



Obrázek 11 Tvorba koloidního zákalu¹⁹

6.2.2 Chladový a trvalý zákal

Jak již bylo výše zmíněno existuje chladový zákal, ale je rozlišován ještě jeden druh zákalu a to tzv. trvalý. Hlavní rozdíl je v jejich rozpustnosti. Chladový zákal vzniká pouze při ochlazení piva na teplotu přibližující se 0 °C. Při následném zahřátí na pokojovou teplotu (± 25 °C) se rozpouští, oproti tomu trvalý zákal zůstává v pivu přítomen při pokojové teplotě. Částice chladového zákalu mají kulovitý tvar. Čím je pivo starší, tím větší jsou částice chladového zákalu. K jeho vývoji výrazně pomáhá existence kyslíku (např. v hrdlu lahve). Částice trvalého zákalu mají tvar nepravidelný.

Oba typy zákalů představují značný problém, ale také je potřeba vyřešit záležitost ohledně vzniku chladového zákalu, protože ten v pivu vzniká vždy jako první a z něj se následně tvoří zákal trvalý¹⁹.

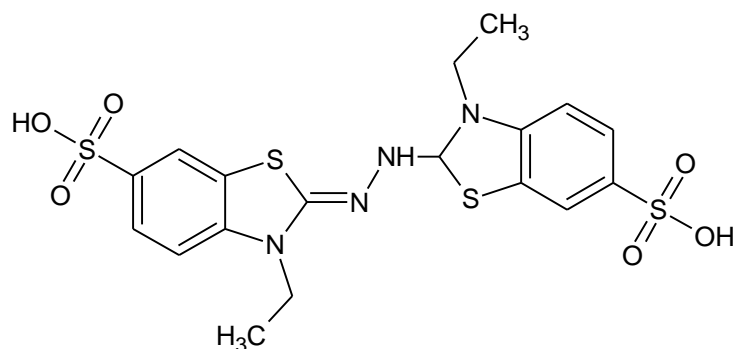
7 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA A JEJÍ STANOVENÍ

Antioxidační aktivitu si můžeme představit jako schopnost sloučeniny nebo směsi látek potlačit oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabránovat peroxidaci lipidů). Rozlišují se dva pojmy, a to tzv. antioxidační kapacita a aktivita. Antioxidační kapacita udává informaci o délce trvání antioxidačního účinku. Antioxidační reaktivita popisuje počáteční dynamiku průběhu procesu při předem určené koncentraci antioxidantu. Na základě chemicko-biologické analýzy rostlinných produktů byly vytvořeny následující metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační kapacitu vzorku (TAC, tj. total antioxidant capacity)²³. Stanovit můžeme také celkovou antioxidační aktivitu vzorku (Total Antioxidant Activity, TAA), která je prokazatelná jak v tělních tekutinách, tak i v potravinách, popřípadě i ve velmi čistých sloučeninách. Stanovení TAC u obilovin není úplně jednoduché, a to hlavně z důvodu, že celá řada antioxidantů se váže na buněčné stěny kovalentní vazbou²⁴.

7.1 METODY STANOVENÍ

7.1.1 Metoda ABTS (metoda TEAC)

Jedná se o jednu ze základních spektrofotometrických metod, která může být použita k měření celkové antioxidační aktivity roztoků čistých látek, vodných směsí nebo nápojů. Při měření celkové antioxidační aktivity v potravinách se využívá odbarvování roztoku se vzorkem, kde radikálový kation ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát, obrázek 12) vzniká ve stabilní formě před reakcí s antioxidanty. Iniciátorem, který ABTS přeměňuje na modrozelený radikálový kation ABTS^{•+}, je K₂S₂O₈. Dále jako iniciátor ABTS^{•+} může být také použit peroxid vodíku, MnO₂ nebo K₄[Fe(CN)₆]. Metoda ABTS je vhodná pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů, absorbance ve viditelné oblasti je při 600–750 nm. Tato výše uvedená metoda umožňuje měřit antioxidační činnost karotenoidů, fenolů, ale i některých antioxidantů obsažených v plazmě^{23, 24, 25}.

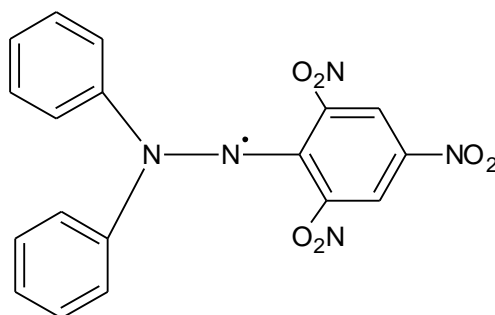
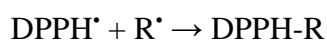
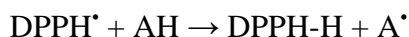


Obrázek 12 Struktura ABTS²⁴

7.1.2 Metoda DPPH

Základem stanovení antioxidační aktivity touto metodou je vznik radikálové formy sloučeniny DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl, obrázek 13). DPPH je volný radikál, který je stabilní a může být akceptorem atomu vodíku, proto přechází do formy stabilní molekuly. Radikál DPPH je v methanolovém roztoku stabilní. Po reakci s antioxidantem se změří barva radikálu DPPH[•] z fialové na žlutou (odbarví se) a vzniká DPPH-H. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Měří se spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Jako standardní látka se používá kyselina askorbová, kyselinu gallová, kyselinu izoaskorbová nebo tzv. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), na jeho množství se antioxidační aktivita nejčastěji přepočítává^{23, 24, 25}.

Radikálová forma DPPH je redukována antioxidantem (AH) nebo radikálem (R[•]) a poté přechází do stabilní formy. Dochází k následujícímu sledu reakcí:

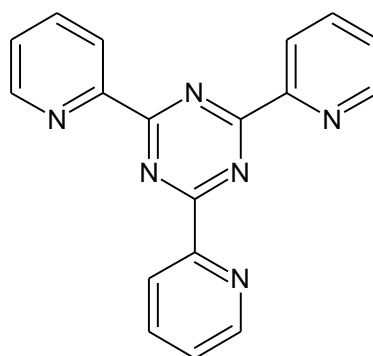


Obrázek 13 Struktura DPPH²⁴

7.1.3 Metoda FRAP

Na základě redoxní reakce je vytvořena tzv. metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). V této metodě se využívá antioxidantů, které jsou schopny redukovat železité komplexy, např. TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) s hexakynoželezitanem draselným $K_3[Fe(CN)_6]$ nebo chloridem železitým $FeCl_3$. Komplexy jsou téměř bezbarvé, někdy mohou být mírně nahnědlé. V poslední fázi redukce vznikne modře zbarvený železnatý komplex.

Nicméně i tato metoda má svá určitá omezení spočívající v tom, že měření probíhá při velmi nízké hodnotě pH (3,6) a nemohou být tedy zachyceny polyfenolické látky reagující s komplexem^{23, 25}.



Obrázek 14 Struktura TPTZ²⁶

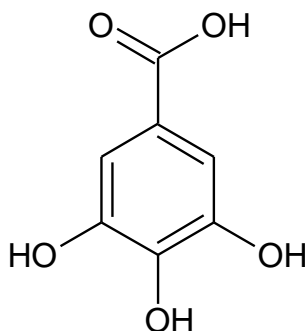
7.1.4 Metoda ORAC

U metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) se vytváří kyslíkové radikály a vyhodnocuje se schopnost dané látky zpomalit nebo úplně zastavit probíhající radikálovou reakci. Detekce je založena na pozorování rychlosti fluorescence fykoeritrinu. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid) – dihydrochlorid), naopak při generaci hydroxylových radikálů pak systém $H_2O_2 + Cu^{2+}$. Tyto radikály patří do skupiny nejreaktivnějších, a z tohoto důvodu je tento test důležitou součástí pro stanovení antioxidantů²⁷.

8 METODY PRO STANOVENÍ POLYFENOLŮ

8.1 METODA POMOCÍ FOLIN-CIOCALTEAUOVA ČINIDLA

Fenolické sloučeniny se oxidují činidlem Folin – Ciocalteu, které se skládá ze směsi kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové. Dochází k redukci na směs modrých oxidů wolframu a molybdenu. Vytvořené modré zbarvení vykazuje maximální absorpci světla v oblasti vlnových délek 750-760 nm, která se měří po uplynutí doby minimálně 20 minut. K dané směsi se obvykle přidává uhličitan sodný a standardem bývá kyselina gallová rozpuštěná v destilované vodě. Míra nárůstu absorbance je přímo úměrná celkovému množství přítomných fenolických sloučenin. Nevýhodou tohoto stanovení je nespecifičnost dané reakce, činidlo může být redukováno i jinými látkami, než jsou polyfenoly, například kyselinou askorbovou^{24, 27, 29}.

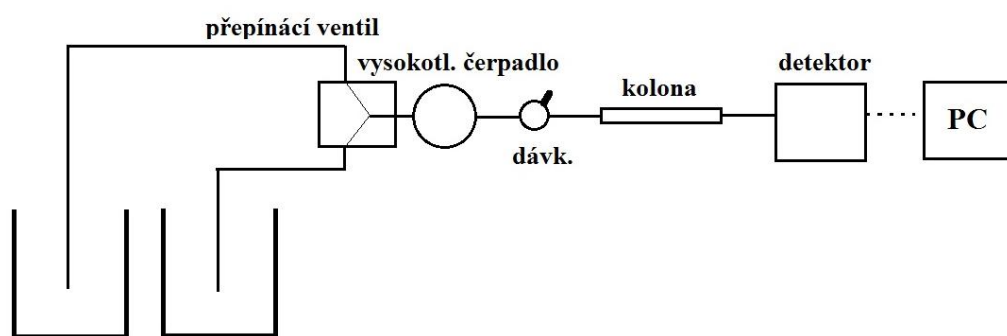


Obrázek 15 Struktura kyseliny gallové²⁴

8.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Kapalinová chromatografie je separační metoda, která využívá několikanásobně opakovaného procesu distribuce látek mezi kapalnou (mobilní) a tuhou (stacionární) fází. V dnešní době je nejrozšířenější a nejpoužívanější vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography)⁴⁴.

Transport dané mobilní fáze kolonou zajišťuje vysokotlaké čerpadlo, které se vyrábí z mechanicky a chemicky odolného materiálu. Čerpadla existují v několika variantách, například membránová, injekčního typu, pístová a další. Umožňují dosažení pracovních tlaků 30–60 MPa. Ovšem lze využít i kolony, které jsou plněny částicemi menší než 2 μm . V těchto případech se dosahuje tlaků 100 - 130 MPa, jedná o tzv. UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). U vysokotlakých čerpadel existuje možnost použití tzv. gradientové eluce^{30,31}, kdy dochází ke změně složení mobilní fáze během separace⁴⁴.



Obrázek 16 Schéma kapalinového chromatografu⁴⁴

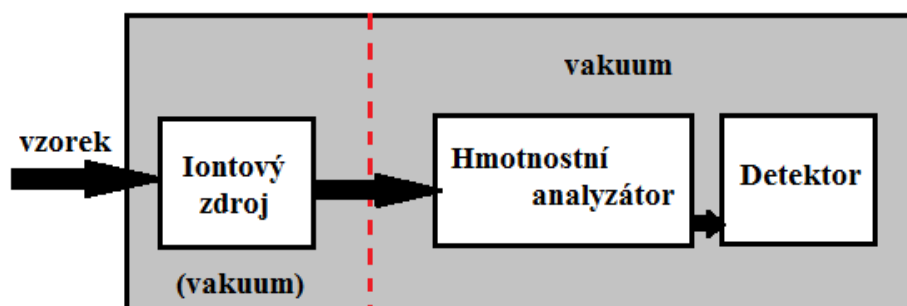
Je-li složení mobilní fáze konstantní, jedná o tzv. izokratickou eluci. Na vysokotlaké čerpadlo navazuje dávkovač vzorků. Ihned po nadávkování je daný vzorek unášen pomocí mobilní fáze dále do chromatografické kolony, která je jádrem celého kapalinového chromatografu a je tvořena vhodnou stacionární fází. V koloně tedy dochází k výše zmíněné separaci látek. Stacionární fáze uvnitř každé kolony bývá na bázi silikagelu, oxidu zirkoničitého, oxidu hlinitého, uhlíku anebo na bázi polymerní. Stacionární fáze je nejčastěji chemicky vázaná na daný nosič. Navázaná skupina ovlivňuje polaritu a selektivitu stacionární fáze. Existuje celá škála stacionárních fází, a to od nepolárních až po stacionární fáze s iontovými skupinami. Ovšem, pokud je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, mluvíme o systémech s normálními fázemi, v opačném případě se jedná o systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC)^{32,33}. Stacionární fáze u RP-HPLC mohou být tvořeny nejčastěji porézním, perfuzním anebo povrchově porézním sorbentem. Mobilní fáze jsou nejčastěji tvořeny vodným roztokem methanolu nebo acetonitrilu^{34, 35}. Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale

hraje důležitou roli v separaci. Složení mobilní fáze lze ovlivnit změnou pH, iontové síly a dalšími činidly. Vlastnosti mobilní fáze jsou důležité z hlediska separace i detekce látek^{31, 44}. Mobilní fáze odtékající z kolony obsahuje rozseparované látky (tzv. eluát) a pokračuje dále do detektoru, který identifikuje jednotlivé látky na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Nejpoužívanější a nejběžnější detektor, který se používá je spektrofotometrický detektor pracující v UV/VIS oblasti³¹. Detekce flavonoidů se obvykle provádí při 250, 265, 290, 350, 370 a 400 nm⁴⁴. Spojení HPLC/MS bývá velmi oblíbenou metodou pro stanovení flavonoidů, které jsou obsažené v nápojích nebo jídle. Další druhy detektorů, které se používají jsou například hmotnostní, fluorimetrický, vodivostní, elektrochemický a další. Metoda HPLC s elektrochemickou detekcí umožňuje detekci elektroaktivních látek velmi přesně a citlivě s použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů. Na pracovní elektrodu detektoru se vkládá kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno popsat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se daná látka oxiduje. To nám pomůže analyzovat komplexní směsi a rozpoznat jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu^{27, 28}. Analýza flavonoidů fluorescenční detekcí je využívána jen zřídka, jelikož flavonoidy jen omezeně vykazují přirozenou fluorescenci (např: flavonoidy s OH skupinou na třetím uhlíku flavanového skeletu a methoxylované flavony). Záznam v závislosti signálu na čase, který můžeme z detektoru dostat se nazývá chromatogram. Na konci celého kapalinového chromatografu se nachází zařízení pro záznam a vyhodnocení dat⁴⁴.

8.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na určení molekulové hmotnosti atomů, molekul a jejich částí převedením na ionty. Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru m/z ³⁶. Spojení hmotnostního spektrometru s metodami separačními nám umožňuje charakterizovat části vzorku ve složitější matrici³¹. Ovšem i tato metoda má své výhody i nevýhody, jako výhody můžeme označit vysokou citlivost, minimální spotřebu vzorku, kvalitativní a kvantitativní analýzu. Mezi nevýhody patří destrukce vzorku a vysoké náklady na pořízení instrumentace.

Základní části hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, který slouží k převedení neutrálních molekul na ionty (ionizace). Dále následuje hmotnostní analyzátor sloužící k rozdělení iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Poslední částí je detektor, ten je určený k detekci iontů a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů. Součástí jsou i další přístroje jako je vakuový systém, iontová optika, počítač³⁶.



Obrázek 17 Schéma hmotnostního spektrometru³⁶

Podle množství dodané energie dělíme ionizační techniky na tzv. měkké, do této skupiny patří ionizace elektrosprejem (ESI)^{37,39,44}, chemická ionizace (CI)⁴⁰, chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)³⁸ a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)⁴¹, jedná se o techniky probíhající v kapalně fázi. Jsou vhodné pro kombinaci s kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou³⁶. Druhou skupinou jsou tvrdé ionizační techniky, kam patří hlavně metoda elektronové ionizace (EI)⁴². Metoda EI je považována za „nejtvrdší“ a zároveň nejstarší ionizační techniku, molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu. Metoda určena pro těkavé a termostabilní látky. Ionizace probíhá při teplotě 150-400°C v plynné fázi³⁶.

9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

9.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Antioxidační aktivita a stanovení celkového množství fenolických látek byly měřeny na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu (Kyoto, Japonsko).

9.2 CHEMIKÁLIE A VZORKY

Pro stanovení antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek byly použity ABTS diamonná sůl, 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo, $K_2S_2O_8$, Na_2CO_3 , DPPH, methanol a destilovaná voda. Vzorky piva: světlá výčepní (Kozel 10°, Staropramen 10°, Braník 10°), světlé ležáky (Plzeň 12°, Budweiser Budvar 12°) a nealkoholické pivo (Birell).

9.3 PRACOVNÍ POSTUP

9.3.1 Metoda ABTS

Tableta ABTS (10 mg) byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody, k tomu bylo přidáno 100 μ l $K_2S_2O_8$ ($c = 0,064$ mol/l). Připravený roztok se nechal působit 12–16 hodin za nepřístupu světla v chladničce. Po uplynulé době bylo ze zásobního roztoku odebráno 1,25 ml do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou. Ke 3 ml reakční směsi bylo přidáno 30 μ l vzorku a poté bylo vše důkladně promícháno. Roztok se nechal reagovat a po 10 minutách byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Původní zelený roztok se odbarvil na světle zelený až čirý.

Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu jako standardní látky. Pracovní postup byl s mírnou modifikací převzat z diplomové práce³⁴.

9.3.2 Metoda DPPH

Ze zásobního roztoku DPPH v methanolu byl připraven pracovní roztok ($c = 0,1 \text{ mmol/l}$). K pracovnímu roztoku byl přidán octanový pufr ($\text{pH} = 4,3$) v poměru 1:2 (DPPH:pufr). K analýze byly odebrány 3 ml této reakční směsi, ke které se přidalo 150 μl vzorku. Úbytek absorbance byl proměřen při vlnové délce 515 nm po 30 minutách. Původně fialový roztok byl působením antioxidantů odbarven na světle fialový až čirý.

Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu jako standardní látky. Pracovní postup byl převzat z diplomové práce⁴⁵.

9.3.3 Metoda pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

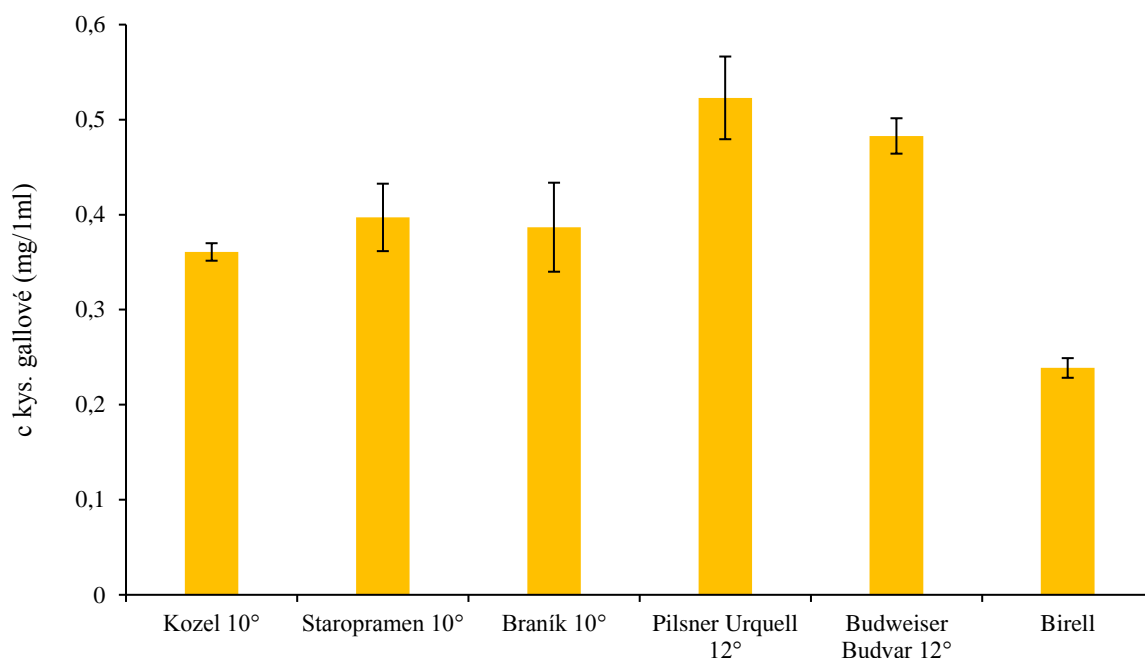
Pracovní roztok byl připraven zředěním 2M Folin-Ciocalteuova činidla destilovanou vodou (1:9). Pro jednotlivá stanovení byl smíchán 1 ml tohoto činidla a 1 ml destilované vody, poté byl přidán optimalizovaný objem vzorku (50 μl). Směs byla promíchána a po 5 minutách byl přidán 1 ml Na_2CO_3 . Po 30 minutách byl změřen nárůst absorbance při vlnové délce 750 nm.

Nárůst absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Pracovní postup byl s mírnou modifikací převzat z diplomové práce³⁴.

9.4 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.4.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích piva

Stanovení celkového obsahu fenolických látek v pivu bylo vypracováno na základě postupu uvedeného v kapitole 9.3.3. Celkem bylo proměřeno 6 vzorků piva, a to piva světlá výčepní (Kozel 10°, Staropramen 10°, Braník 10°), světlé ležáky (Pilsner Urquell 12°, Budweiser Budvar 12°) a pivo nealkoholické (Birell). Každý vzorek byl proměřen vždy pětkrát. Nárůst absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství kyseliny gallové v 1 ml vzorku piva. Kalibrační křivka závislosti nárůstu absorbance na koncentraci kyseliny gallové ($y = 29,811x + 0,0402$) byla převzata z diplomové práce³⁴. Porovnání hodnot celkového obsahu fenolických látek všech vzorků je uvedeno na obrázku 18.

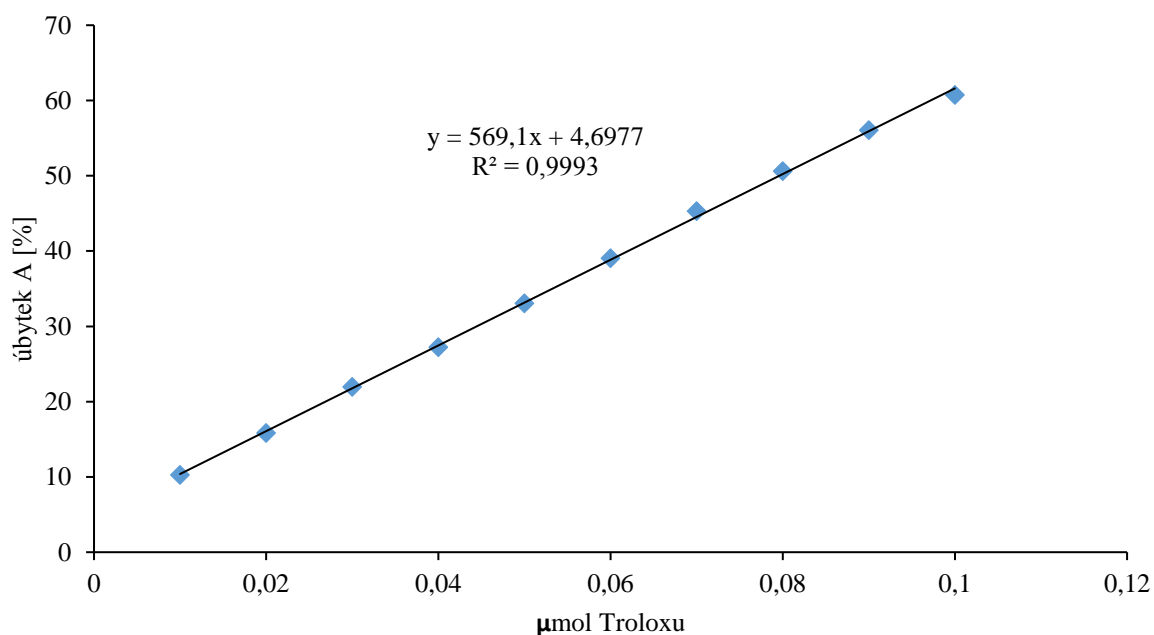


Obrázek 18 Stanovení celkového obsahu fenolických látek v pivu

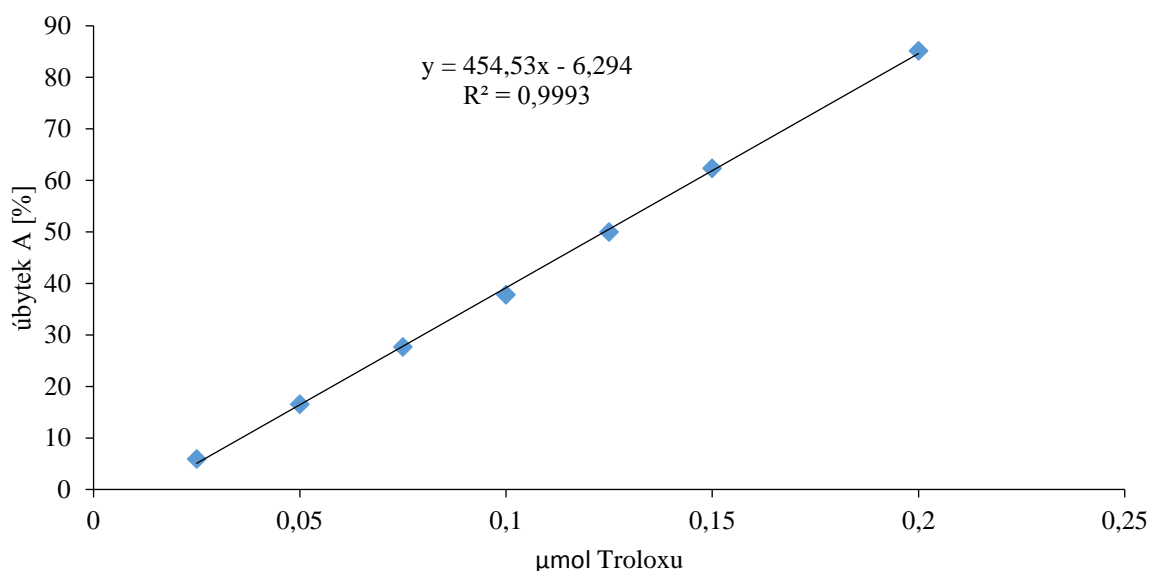
Z obrázku 18 vyplývá, že nejnižší obsah fenolických látek je v pivu Birell (nealkoholické pivo). Nejvyšší koncentrace fenolických látek je v ležácích (Pilsner Urquell 12° a Budweiser Budvar 12°). Naopak nejnižší koncentraci fenolických látek najdeme u piv výčepních (Kozel 10°, Staropramen 10°, Braník 10°).

9.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity jednotlivých vzorků piva byla nejprve sestrojena kalibrační závislost úbytku absorbance ABTS^{•+} radikálu (obrázek 19) a DPPH radikálu (obrázek 20) na množství Troloxu. Z této kalibrační závislosti bylo vypočteno množství Troloxu ekvivalentní antioxidační kapacitě vzorku (TEAC). TEAC slouží k porovnání těchto metod.

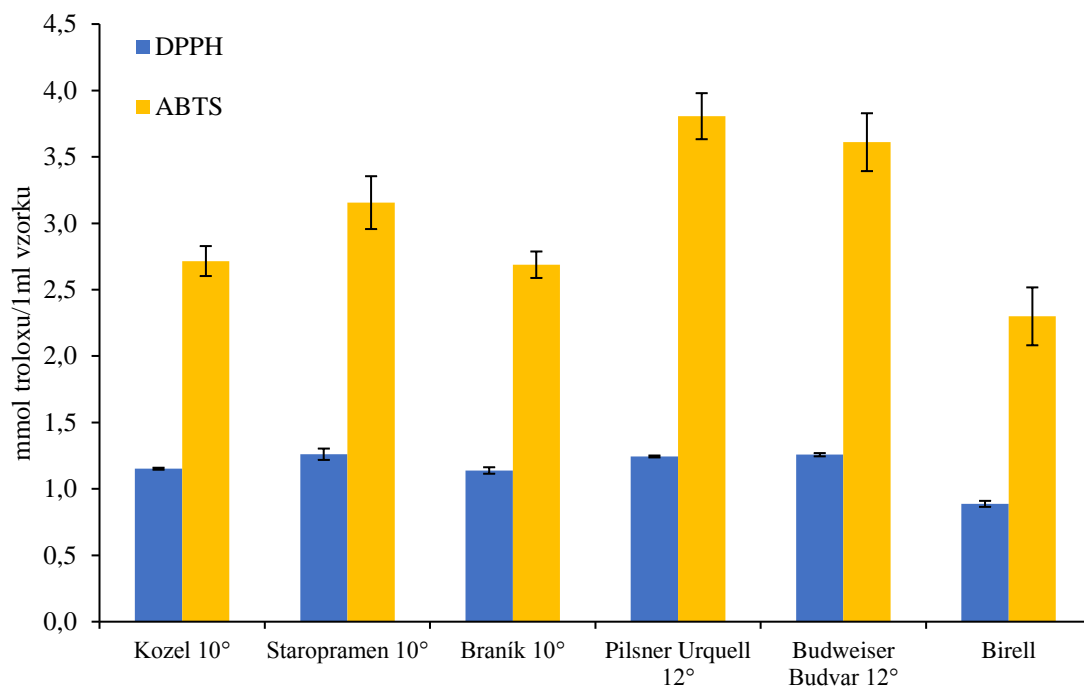


Obrázek 19 Kalibrační závislost Troloxu pro ABTS



Obrázek 20 Kalibrační závislost Troloxu pro DPPH

Antioxidační aktivity všech jednotlivých vzorků byly naměřeny dle postupu v kapitole 9.3.1. a 9.3.2. Každý vzorek byl změřen pětkrát a na základě absorbance byla vypočtena hodnota TEAC. Výsledné hodnoty byly vztaženy na 1 ml daného piva. Průměrné hodnoty všech vzorků se směrodatnými odchylkami jsou uvedeny na obrázku 21.



Obrázek 21 Antioxidační aktivita vybraných vzorků piv měřená pomocí metod ABTS a DPPH

Z obrázku 21 je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu mají piva Pilsner Urquell 12° a Budweiser Budvar 12°. O něco nižší hodnoty antioxidační aktivity vykazují piva desetistupňová – Kozel 10°, Staropramen 10° a Braník 10° stejně jako tomu bylo u metody s Folin-Ciocalteuvým činidlem. V porovnání s ostatními vzorky má nealkoholické pivo, Birell, nejnižší množství látek vykazující antioxidační vlastnosti. Na základě obrázku 21 lze říci, že metoda DPPH nereaguje se všemi látkami s antioxidačními vlastnostmi, které jsou přítomny ve vzorku. Hodnoty TEAC získané touto metodou jsou u všech vzorků mnohonásobně nižší než u ABTS metody.

10 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit vliv látek nebílkovinného charakteru na kvalitu a stabilitu pивní pěny. Tyto látky mohou ovlivnit pivo jak negativně, tak pozitivně. Mezi látky negativně ovlivňující pивní pěnu patří zejména polyfenolické látky. Polyfenolické látky jsou důležitou součástí každého piva. Jedna z nejvýznamnějších skupin polyfenolických látek jsou tzv. flavonoidy. Do piva se dostávají z výchozí suroviny ječmene a chmele. Přírodní polyfenolické složky piva vykazují antioxidační účinky, které se projevují především v inhibici oxidačních přeměn lipidických složek, a tím i blokováním procesů stárnutí chuti piva. Přiměřená konzumace piva je jedním z možných zdrojů přírodních antioxidantů a látek s prokazatelnými antisklerotickými, antikarcinogenními, antioxidačními, antimikrobiálními a protizánětlivými účinky. Účastní se procesu regulace tlaku krve a hladiny glukózy v krvi.

U piva a šumivých vín se můžeme setkat s jevem, kterému říkáme gushing. Jedná se o jev, který je možno zpozorovat po otevření obalu. Vyznačuje se tím, že ihned dojde k masivnímu přepěnění nápoje. Podstatou je okamžité uvolnění oxidu uhličitého po otevření láhve. Gushing je považován za neúspěch daného produktu. Přepěňování piva souvisí s tvorbou látek, které vznikají při napadení obilky ječmene mikroskopickými houbami (proteiny).

V rámci bakalářské práce byla také stanovena antioxidační aktivita a stanoven celkový obsah fenolických látek. Pro stanovení antioxidační aktivity bylo využito dvou velice známých metod, a to metody ABTS a metody DPPH, pro celkové stanovení polyfenolů byla použita metoda pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Celkové stanovení bylo stanovováno spektrofotometricky.

11 ZDROJE

- [1] BASAŘOVÁ, Gabriela a HLAVÁČEK, Ivo. *České pivo*. Praha: Nuga, **1998**. ISBN 80-859-0308-3.
- [2] ČÍŽKOVÁ, H., DOSTÁLEK, P., FIALA J. A KOLOUCHOVÁ, I.: Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva. *Chemické listy*, **2006**, 100 (7), 478 – 485. ISSN 1213-7103.
- [3] ŠAVEL, Jan a BROŽ, Adam. Měření pěnivosti piva. *Kvasný průmysl. České Budějovice*, **2016**, 52/10, 314-317. ISSN 0023-5830.
- [4] PRINC J. a MARLE J. T.: EBC Proceedings of the 26th Congress, Maastricht, 24–29 May 1997, 26. Maastricht 1997.
- [5] LYNCH, D.M. a BAMFORTH, C.W. Measurement and Characterization of Bubble Nucleation in Beer. *Journal of Food Science* [Online]. Wiley-WCH, ©2002. [cit. 27. 2. 2017], 67 (7), 2696–2701. DOI:10.1111/j.1365-2621. 2002.tb08801.x
- [6] BAMFORTH, C.W. The foaming properties of beer. *Journal of the Institute Brewing* [Online]. Wiley-WCH. ©1985 [cit. 3. 3. 2017], 91 (6), 370. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1985.tb04359.x
- [7] DYR, Jiří. *Chemie a technologie sladu a piva: Díl 1*. Praha: VŠCHT, **1965**. 236. ISBN 05-225-62.
- [8] KARABÍN, Marcel, BRÁNYIK, Tomáš, KRULIŠ, Radim, DVOŘÁKOVÁ, Markéta a DOSTÁLEK, Pavel. Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarství. *Chemické listy*, **2009**, 721-728. ISSN 1213-7103.
- [9] Party foul. In: *Grub Street* [online]. Grub Street ©2014.[19. 3. 2017]. Dostupné z: <http://www.grubstreet.com/2014/12/magnets-beer-gushing.html>
- [10] BĚLAKOVÁ, Sylvie, BENEŠOVÁ, Karolína, MIKULÍKOVÁ, Renata a SVOBODA Zdeněk. Faktory ovlivňující gushing. *Kvasný průmysl. České Budějovice*, **2012**, 58 (3), s. 62-63. ISSN 0023-5830.

- [11] MÜLLER Michael Peter, SCHMID Frederik, BECKER Thomas a GASTL Martina. Impact of Different Hop Compounds on the Overfoaming Volume of Beer Caused by Primary Gushing. *Journal of the Institute Brewing* [Online]. Wiley-WCH. ©2010 [cit. 19. 3. 2017], 116 (4), 459-463. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00797.x
- [12] WOLFGANG Steglich a GÜNTER Adam. *Römpp encyclopedia natural products* [online]. Stuttgart: Thieme, 2000, s. 178 [cit. 19. 3. 2017]. ISBN 978-3-1311-7711-7. Dostupné z: [https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpRMPPENP5/cid:kt00AQ0HB1/viewerType:pdf/root_slug:r-mpp-encyclopedia-natural?cid=kt00AQ0HB1&page=6&b-q=deoxynivalenol&sort_on=default&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=Deoxynivalenol%20\(vomitoxin\).%20C&q=deoxynivalenol](https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpRMPPENP5/cid:kt00AQ0HB1/viewerType:pdf/root_slug:r-mpp-encyclopedia-natural?cid=kt00AQ0HB1&page=6&b-q=deoxynivalenol&sort_on=default&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=Deoxynivalenol%20(vomitoxin).%20C&q=deoxynivalenol)
- [13] Fuzariózy klasů pšenice. In: *Agromanuál*[®].cz [online]. Copyright © 2016.[19. 3. 2017]. Dostupné z: <http://agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/aktualni-prehled-ochrany-polnich-plodin-kveten-a-cerven-2012>
- [14] HANKE, S.; KERN, M.; HERRMANN, M.; BACK, W.; BECKER, T. a KROTTENTHALER, M. Hop ingredients and their effect on gushing (Part 1). *Brauwelt International*. Germany, 2010, 28 (6), 356–358. ISSN 0934-9340.
- [15] HANKE, S.; KERN, M.; HERRMANN, M.; BACK, W.; BECKER, T. a KROTTENTHALER, M. Hop ingredients and their effect on gushing (Part 2). *Brauwelt International*. Germany, 2011, 1, 24-26. ISSN 0934-9340.
- [16] BEKENIOVÁ, Pavlína. *GUSHING v pivovaru Starobrno*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Agronomická fakulta. Ústav technologie potravin.
- [17] ČEPIČKA, Jaroslav; KARABÍN, Marcel. Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty. *Chemické listy*. 2002, 96, 90-95. ISSN 1213-7103-0009-2770.
- [18] DLAPOVÁ, Jan. Polyfenolické látky v pivu, jejich vlastnosti a možnosti jejich stanovení. Zlín, 2010. *Bakalářská práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Technologická fakulta. Ústav technologie a mikrobiologie potravin.

- [19] KOTLÍKOVÁ, Blanka; JELÍNEK, Lukáš; KARABÍN, Marcel a DOSTÁLEK, Pavel. Prekurzory a vznik koloidních zákalů piva. *Chemické listy*. **2013**, 107, 362-368. ISSN 1213-7103.
- [20] HOFTA, Pavel; DOSTÁLEK, Pavel a BASAŘOVÁ, Gabriela. Xanthohumol – Chmelová pryskyřice nebo polyfenol?. *Chemické listy*. **2004**, 98, 825-830. ISSN 1213-7103.
- [21] KOTLÍKOVÁ, Blanka; JELÍNEK, Lukáš; KARABÍN, Marcel a DOSTÁLEK, Pavel. Předpověď vzniku koloidního zákalu piva. *Kvasný průmysl*. **2013**, 59 (4), s. 100-104. ISSN 0023-5830.
- [22] ROBINSON, Louise H.; EVANS, D. Evan; KAUKOVIRTA-NORJA, Anu; VILPOLA, Arvi; ALDRED, Peter a HOME, Silja. The Interaction Between Malt Protein Quality and Brewing Conditions and Their Impact on Beer Colloidal Stability. *Master Brewers Association of the Americas*. **2004**, 41(4), 353–362.
- [23] ŠULC; Miloslav, LACHMAN; Jaromír, HAMOUZ; Karel, ORSÁK; Matyáš, DVOŘÁK, Petr a HORÁČKOVÁ; Vendulka. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*, **2007**, 101, 584-591. ISSN 1213-7103.
- [24] MRÁZOVÁ; Eva. Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií. Zlín, **2011**. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Technologická fakulta. Ústav biochemie a analýzy potravin.
- [25] FIDLER; Martin a KOLÁŘOVÁ; Lenka. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*, **2009**, 103, 232-235. ISSN 1213-7103.
- [26] 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine. *The Merck Index* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2017. Last Revised 2013 [cit. 2. 5. 2017]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/MerckIndex/monograph/m11196/tripyridyltriazine?q=authorize>
- [27] DŘÍMALOVÁ; Pavla. Antioxidační aktivita papriky a pepře. Zlín, **2014**. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Technologická fakulta. Ústav analýzy a chemie potravin.

- [28] PAULOVÁ; Hana, BOCHOŘÁKOVÁ; Hana a TÁBORSKÁ; Eva. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*, **2004**, 98, 174-179. ISSN 0009-2770.
- [29] ZLOCH; Z., ČELÁKOVSKÝ; J. a AUJEZDSKÁ; A. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. Plzeň: ÚHLF UK, 2004.
- [30] SNYDER, L. R., M. A. STADALIUS a M. A. QUARRY. Gradient elution in reversed-phase HPLC-separation of macromolecules. *Analytical Chemistry*. **2008**, 55(14), 1412A-1430A. DOI: 10.1021/ac00264a001. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00264a001>
- [31] PAŘILOVÁ; Kateřina. Studium vybraných aktivních látek v českém pivu. Brno, **2009**. *Diplomová práce*. Vysoké učení technické v Brně. Chemická fakulta. Ústav chemie potravin a biotechnologie.
- [32] OLADOKUN, Olayide, Amparo TARREGA, Sue JAMES, Katherine SMART, Joanne HORT a David COOK. The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry*. **2016**, 205, 212-220. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.023>.
- [33] ARIGO, Adriana, Petr ČESLA, Petra ŠILAROVÁ, Maria Luisa CALABRO a Lenka ČESLOVÁ. Development of extraction method for characterization of free and bonded polyphenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Czech Republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2018**, 245, 829-837. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.101>.
- [34] MAZÁČOVÁ, Renáta. Vliv průběhu sladování ječmene na obsah vybraných fenolických látek. Pardubice, **2015**. *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice. Chemicko-technologická fakulta. Katedra analytické chemie.
- [35] SÝKORA, David; TESAŘOVÁ, Eva; VOSMANSKÁ, Magda a ZVOLÁNKOVÁ, Monika. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*, **2007**, 101, 190-199. ISSN 1213-7103.

- [36] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie [online], Mass spectrometry group, Univerzita Pardubice, [cit. 1. 2. 2018], dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf
- [37] QUIFER-RADA, Paola, Anna VALLVERDÚ-QUERALT, Miriam MARTINÉZ-HUÉLAMO, Gamma CHIVA-BLANCH, Olga JÁUREGUI, Ramon ESTRUCH a Rosa LAMUELA-RAVENTÓS. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*. **2015**, 169, 336-343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>.
- [38] ČESLOVÁ, Lenka, Michal HOLČAPEK, Martin FIDLER, Jitka DRŠTIČKOVÁ a Miroslav LÍSA. 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 A*. **2009**, 1216, 7249-7257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.022>.
- [39] ANDRÉS-IGLESIAS, Cristina, Carlos A. BLANCO, Jorge BLANCO a Olimpio MONTERO. Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers. *Food Chemistry*. **2014**, 157, 205-212. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.01.123](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.123). ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614001678>
- [40] KIM, Donghwi, Un Hyuk YIM, Byungjoo KIM, Sangwon CHA a Sunghwan KIM. Paper Spray Chemical Ionization: Highly Sensitive Ambient Ionization Method for Low- and Nonpolar Aromatic Compounds. *Analytical Chemistry*. **2017**, 2000, 89(17), 9056-9061. DOI: [10.1021/acs.analchem.7b01733](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01733). ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b01733>
- [41] DEME, Pragney a UPADHYAYULA, Vijayasarithi V.R. Ultra performance liquid chromatography atmospheric pressure photoionization high resolution mass spectrometric method for determination of multiclass pesticide residues in grape and mango juices: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Food Chemistry*. **2015**, 2000, 173, 1142-1149. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.11.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.007). ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614017324>

- [42] CAPPIELLO, A., G. FAMIGLINI, E. PIERINI, P. PALMA a H. TRUFELLI. Advanced Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Interface Based on Electron Ionization: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Analytical Chemistry*. **2007**, 2000, 79(14), 5364-5372. DOI: 10.1021/ac070468l. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac070468l>
- [43] XU, Cong-Cong, Bing WANG, Yi-Qiong PU, Jian-Sheng TAO a Tong ZHANG. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **2017**, 15(10), 721-731. DOI: 10.1016/S1875-5364(17)30103-6. ISSN 18755364. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875536417301036>
- [44] FALCÃO, Soraia I., Miguel VILAS-BOAS, Leticia M. ESTEVINHO, Cristina BARROS, Maria R. M. DOMINGUES a Susana M. CARDOSO. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, 396(2), 887-897. DOI: 10.1007/s00216-009-3232-8. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3232-8>
- [44] Studijní materiály z přednášek a laboratorních cvičení určené pro studenty fakulty chemicko-technologické, Pardubice
- [45] FIDLER, Martin. Analýza prenylovaných flavonoidů v chmelu a pivu. Pardubice, **2007**. *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice. Chemicko-technologická fakulta. Katedra analytické chemie.