



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## STUDIUM VYBRANÝCH AKTIVNÍCH LÁTEK V ČESKÉM PIVU

STUDY SOME ACTIVE SUBSTANCES IN CZECH BEER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA PAŘILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0247/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Kateřina Pařilová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Konzultanti diplomové práce:

### Název diplomové práce:

Studium vybraných aktivních látek v českém pivu

### Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - složení piva, hlavní skupiny biologicky aktivních látek, specifika složení a technologie českého piva.
2. Optimalizace metod analýzy vybraných aktivních látek v pivu - fenolické látky, proteiny.
3. Srovnávací studie - analýza charakteristických aktivních látek v českém pivu a v pivech jiného typu.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Kateřina Pařilová  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřená na analýzu fenolických i dalších aktivních látek u 22 různých značek světlých piv typu ležák se zaměřením na nalezení rozdílů mezi pivy českými a zahraničními. Teoretická část popisuje kromě nejužívanějších metod analýzy hlavních aktivních látek – tj. proteinů a polyfenolů rovněž technologii výroby piva a specifika složení a výroby produktů označovaného evropskou ochrannou známkou „České pivo“.

Analýza celkových polyfenolů, celkových flavonoidů, antioxidační aktivity a většiny pivovarských charakteristik byla provedena spektrofotometricky. K identifikaci a kvantifikaci jednotlivých fenolických látek byla použita metoda on-line kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem a s hmotnostní detekcí. Pro orientační analýzu bílkovin byla využita vertikální elektroforéza PAGE-SDS a mikrofluidní elektroforetický systém Experion (BioRad). Z celkového počtu 22 vzorků bylo 15 českých a 7 zahraničních piv, u nichž byly srovnány hodnoty základních pivovarských parametrů, skupinových antioxidantů i jednotlivých fenolických látek. Srovnání bylo provedeno rovněž pro piva balená v lahvích a v plechovkách a též pro piva alkoholická a nealkoholická. Jako modelový srovnávací vzorek byl použit český chmel odrůdy Sládek. V závěrečné části práce byla zhodnocena využitelnost stanovení sledovaných fyziologicky aktivních látek pro rozlišení piv vyráběných různým způsobem a navrženy parametry vhodné pro posouzení autenticity Českého piva.

## **SUMMARY**

The aim of this work was to study phenolics and other active compounds in 22 kinds of lager beer and especially to find some differences between Czech beer and beers made in foreign countries. In theoretical part the most useful methods for phenolic and protein analysis are discussed. Further, basic steps of brewery technology are introduced and main beer components with regard to Czech beer specificity are presented.

Analysis of total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity and most of basic technological characteristics was performed spectrophotometrically. To identification and quantitative analysis of individual phenolics on-line liquid chromatography with photo-diode array (PDA) and mass spectrometry (MS) detection was used. Protein analysis was performed by vertical electrophoresis SDS-PAGE and by Experion microfluidic electrophoresis (BioRad). From the total of 22 samples, 15 Czech beers and 7 beers of foreign marks were enrolled into this study. In these samples levels of brewery characteristics, group antioxidants and individual phenolics were compared. Flask and can beers as well as alcoholic and non-alcoholic beers were compared too. As a model comparative sample the Czech hop of Sládek variety was used. Finally, usefulness of tested parameters to differentiation composition and technology of individual beer samples was evaluated and parameters suitable for Czech beer authenticity analysis were proposed.

### **Klíčová slova**

pivo, polyfenoly, proteiny, české pivo

### **Key words**

beer, phenolics, proteins, Czech beer

PAŘILOVÁ, K.: *Studium vybraných aktivních látek v českém pivu*. Brno, 2009. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc

#### PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

*Ráda bych velmi poděkovala vedoucí mé diplomové práce Doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a podporu v průběhu celé mojí práce, i za umožnění experimentální části. Děkuji také Ing. Andree Halienové a Ing. Stanislavu Obručovi za praktickou pomoc, ochotu a oporu*

# OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	ČESKÉ PIVO – HISTORIE A SOUČASNOST.....	9
2.1.1	<i>Historie piva</i> .....	9
2.1.2	<i>Současný stav</i> .....	10
2.2	TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA.....	11
2.2.1	<i>Výroba sladu</i> .....	11
2.2.2	<i>Výroba piva</i> .....	18
2.3	PIVO JAKO FINÁLNÍ PRODUKT .....	25
2.3.1	<i>Hlavní skupiny biologicky aktivních látek piva</i> .....	26
2.4	SPECIFIKA SLOŽENÍ A TECHNOLOGIE ČESKÉHO PIVA.....	33
2.5	METODY STANOVENÍ AKTIVNÍCH LÁTEK PIVA (PROTEINY, POLYFENOLY) – PŘEHLED.....	35
2.5.1	<i>Separace fenolických látek-základní instrumentální metody</i> .....	35
2.5.2	<i>Metoda HPLC/MS v analýze flavonoidů</i> .....	38
2.5.3	<i>Separace proteinů</i> .....	46
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	51
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	51
3.1.1	<i>Standardní chemikálie</i> .....	51
3.1.2	<i>Chemikálie – stanovení koncentrace bílkovin</i> .....	51
3.1.3	<i>Chemikálie pro elektroforézy</i> .....	52
3.1.4	<i>Ostatní chemikálie</i> .....	52
3.1.5	<i>Použité přístroje a pomůcky</i> .....	53
3.2	MATERIÁL – ANALYZOVANÉ VZORKY PIVA A SUROVIN .....	54
3.2.1	<i>Zpracování vzorků pro analýzy</i> .....	55
3.2.2	<i>Stanovení skupinových antioxidačních parametrů</i> .....	56
3.2.3	<i>Stanovení pivovarských parametrů a charakteristik</i> .....	57
3.3	ANALÝZA POLYFENOLICKÝCH LÁTEK POMOCÍ LC/ESI-MS ANALÝZY .....	58
3.3.1	<i>Analýza standardních látek - optimalizace separační metody RP-HPLC/ESI-MS</i> .....	58
3.3.2	<i>Kalibrace a optimalizace (ladění) hmotnostního spektrometru [53]</i> .....	59
3.3.3	<i>Ladění hmotnostního detektoru a stanovení MS spektra reserpinu</i> .....	60
3.4	OPTIMALIZACE PODMÍNEK MS DETEKCE U VYBRANÝCH POLYFENOLICKÝCH LÁTEK .....	61
3.4.1	<i>Polyfenolické sloučeniny – kyselina chlorogenová a epikatechin</i> .....	61
3.4.2	<i>Stanovení MS/full scan a MS/MS/full scan spekter</i> .....	62
3.5	ANALÝZA INTRACELULÁRNÍCH BÍLKOVIN .....	63
3.5.1	<i>Stanovení celkových proteinů Lowryho metodou</i> .....	63
3.5.2	<i>Elektroforéza bílkovin metodou PAGE-SDS</i> .....	63
3.5.3	<i>Mikročipová elektroforéza</i> .....	65
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	67

4.1	CHEMICKÁ ANALÝZA HOTOVÉHO PIVA .....	67
4.1.1	<i>Antioxidační aktivita, celkové polyfenoly a celkové flavonoidy</i> .....	67
4.1.2	<i>Hořké látky</i> .....	74
4.1.3	<i>Stanovení podílu extraktu, obsahu alkoholu, stupňovitosti a stupně prokvašení</i> .....	76
4.2	CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE FLAVONOIDNÍCH SLOUČENIN .....	81
4.2.1	<i>Optimalizace poměru rozpouštědel v mobilní fázi</i> .....	81
4.2.2	<i>Výběr chromatografické kolony</i> .....	82
4.2.3	<i>Optimalizace izolace polyfenolických látek z piva</i> .....	82
4.3	OPTIMALIZACE PARAMETRŮ MS DETEKCE .....	82
4.3.1	<i>Stanovení MS spekter reserpinu</i> .....	83
4.4	OPTIMALIZACE PODMÍNEK MS DETEKCE POLYFENOLICKÝCH LÁTEK .....	85
4.5	ANALÝZA STANDARDNÍCH LÁTEK –MS <sup>N</sup> FULL SCAN .....	86
4.6	ANALÝZA OBSAHU POLYFENOLŮ VE VYBRANÝCH PIVECH TYPU LEŽÁK POMOCÍ LC/MS ANALÝZY .....	88
4.6.1	<i>Kvantifikace</i> .....	88
4.6.2	<i>Identifikace flavonoidů</i> .....	99
4.6.3	<i>Přehled ostatních specifík testovaných piv</i> .....	109
4.6.4	<i>Charakteristika českého chmele</i> .....	114
4.7	STANOVENÍ PROTEINŮ V MODELOVÉM VZORKU PLZEŇSKÉHO LEŽÁKU POMOCÍ LOWRYHO METODY .....	115
4.8	STANOVENÍ PROTEINŮ PIVA POMOCÍ SDS-PAGE A MIKROČIPOVÉ ANALÝZY .....	115
5	ZÁVĚR .....	118
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	120
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	125
8	SEZNAM PŘÍLOH .....	126
9	PŘÍLOHY .....	127

# 1 ÚVOD

Od nepaměti se lidé snažili připravit nápoj, který by nejen uhasil žízeň, ale měl i další blahodárné účinky na lidský organismus, který by byl vyroben z dostupných surovin a přitom nebyl drahý. A tak již před několika tisíci lety si lidé začali připravovat nápoj, který označujeme jako pivo.

Protože stále více odborníků z oblasti výživy prokazuje, že tento po vodě dnes nejrozšířenější nápoj, jehož historie sahá až 6000 let před náš letopočet, má při střídmé konzumaci blahodárné účinky na zdraví, krásu a životní pohodu, je bezpochyby užitečné prozkoumat jeho složení a prohloubit poznatky o spektru látek v něm obsažených [1].

Důležitou vlastností piva je jeho antioxidační schopnost daná bohatým obsahem směsi polyfenolů – flavonoidních látek a volných fenolových kyselin, jež dokáží likvidovat volné radikály a zabraňují tak jejich škodlivému působení v organismu (iniciování rakoviny, kardiovaskulárních chorob apod.) Antioxidační ochrana organismu je velmi důležitým faktorem působícím proti vzniku a rozvoji tak závažných onemocnění, jako jsou srdečně-cévní a nádorové choroby. Polyfenolům v pivu jsou přisuzovány rovněž účinky antimikrobiální, antitrombotické, navíc regulují krevní tlak i krevní glukózu, pozitivně ovlivňují trávení a přispívají též k chuti a koloidní stabilitě piva [2, 3].

Z nutričního hlediska je taktéž významné, že pivo neobsahuje tuky a přesto je, díky sacharidům, zdrojem energie. Vykazuje však méně energie než např. plnotučné mléko, hroznová šťáva nebo sekt, což je považováno za příznivé. Pozitivní je také vysoká stravitelnost aktivních látek piva, zejména bílkovin a sacharidů, jenž činí až 95 % [4].

V celém světě existuje přibližně patnáct tisíc značek piv. Existují také nápoje, které se pivu blíží, ovšem klasické pivo – jakým je především světoznámé pivo plzeňské, nikdy nenahradí např. pivo syrovátkové, vyrobené kvašením syrovátkové suroviny, nebo sakhi-saké-šamšu, vyráběné zejména v Japonsku a Číně, které se připravuje z loupané rýže. Na různých pivních stylech se podepisují tradice, výrobní postupy a především tradiční receptury. Piva jsou vyráběna z různých ingrediencí (od koření až po ovoce) a jejich výrobci na nich pracují mnoha způsoby. Ať už se jedná o způsoby kvašení, vaření nebo pozdějšího zpracování při zrání či lahvování nebo stáčení do sudů. Lidé, kteří se pivu věnují, tvrdí, že není možné určit, které pivo je horší a které lepší. Jsou prostě pouze odlišná. Největší oblibu si však získalo tradiční české pivo charakteristické svými jedinečnými sensorickými vlastnostmi i objektivními analytickými charakteristikami. Rozdíly oproti zahraničním druhům nalézáme ve stupni prokvašení, pH, barvě, obsahu hořkých látek a polyfenolů i v chuti piva [5].

O výjimečných kvalitách „českého piva“ svědčí nejen velká poptávka po onom produktu, ale i četné pokusy zahraničních výrobců o napodobení a ke zneužívání českých obchodních pivních značek. Mnoho pivovarů na celém světě vaří například pivo plzeňského typu a patřičně to zdůrazňuje nápisem Pilsener, Pils nebo Pilsner na svém produktu, což znamená plzeňské pro světlá výrazněji chmelová piva, i když někdy tyto pivovary nesídlí ani v Evropě. Složitě a vleklé spory se vedou například s americkým koncernem o značku Budweiser, jenž souvisí s podnikáním německých přistěhovalců, kteří znali výbornou kvalitu českých piv ze svých pobytů v Mariánských lázních i díky exportu do USA. V Americe jsou kromě toho zneužívány

i pivní značky dalších českých pivovarů, např. Michelob podle pivovarů v Měcholupech u Žatce či Libotschaner podle pivovaru v Libočanech ze stejné oblasti [6].

A právě podrobná studie aktivních látek piva může přispět k zabránění zneužívání a nelegálního používání české značky, jelikož umožní nalezení charakteristických parametrů pro jednoznačné určení autenticity a pro odlišení piv vyrobených odlišným technologickým postupem.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 České pivo – historie a současnost

#### 2.1.1 Historie piva

Nejstarší zmínky o přípravě piva pocházejí z doby před téměř pěti tisíci lety. Objeviteli pěnivého moku byli s největší pravděpodobností Sumerové žijící ve 4. – 3. tisíciletí př. n. l. na území jižní Mezopotámie, kteří pivo - sumersky zvané kaš - připravovali z ječných chlebů a ze sladu ve veliké džbánovité nádobě s vodou. Chmel nebyl tehdy ještě znám a nahořklá příchut' se tedy dodávala pivu jinak – obvykle předběžným pražením chlebů v horkém popelu [7, 8].

Prvým dokladem souvisejícím přímo s výrobou piva v Čechách je nadační listina prvního českého krále Vratislava II. (1061 – 1092) pro vyšehradskou kapitulou z roku 1088, kde se kanovníkům kapitule přiděluje desátek pro vaření piva. V těchto starých dobách pivo vařily velmi primitivním postupem ženy v každé domácnosti. Mělo význam sytící, protože nesloužilo jen jako nápoj, ale připravovaly se z něj různé pokrmy jako polévky, kaše a omáčky. Chut' a odlišnost středověkých piv ovlivňovala skutečnost, že vlastní kvašení bylo spontánní - tj. bylo výsledkem činnosti kvasinkovitých mikroorganismů vyskytujících se v přirozeném prostředí v daném čase v místě výroby [9].

Rozvoj řemeslné výroby piva nastal ve 13. století se zakládáním nových královských měst, která dostávala od panovníka řadu privilegií. V této době se začaly již uplatňovat také první snahy o ochranu českého typu piva, neboť k výsadám nově založených královských měst patřilo tzv. „hájemství“ neboli „mílové právo“, podle kterého se od hradeb města na vzdálenost jedné míle (přibližně deset kilometrů), nesměl vyrábět slad ani vařit nebo čepovat žádné cizí pivo. Porušení tohoto práva se trestalo odejmutím veškerých měšťanských práv, citelnou pokutou i zabavením piva. V období 12. až 14. století byl každý "měšťan" oprávněn vařit pivo (stejně tak jako péci svůj chléb). Na konci tohoto období došlo k omezení pouze na příslušníky obce, kteří vlastnili domy uvnitř hradeb a později - když se pivo již v domácnosti nevařilo, ale vyrábělo se ve zvláštních k tomu ustanovených místnostech (pivovaru), a kdy došlo díky rozvoji řemesel k vytváření společenstev (tzv. cechů) - ustanovovala příslušná městská rada, v jakém množství a v jakých lhůtách jednotliví měšťané mají pivo vařit [10, 11].

Bylo dokázáno, že již na konci 15. století bylo u nás vařeno "bílé pivo". Bílé pivo bývalo husté, ani příliš sladké, ani hořké. V té době připravoval se slad pouze z pšenice a ječmene. Pšeničnému se však dávala přednost a byl připravován v míře daleko větší než slad z ječmene. Umění vařit bílé pivo si teprve o 50 let později našlo cestu do Bavor a Schlager - zde si vévodové přivlastnili výlučné právo používat pšenici pro výrobu piva a zřídili si dvorní pivovary, které pro ně produkovaly pšeničné pivo.

Z obou druhů sladu vařilo se tedy dvojí pivo, tzv. bílé (bledé) čili pšeničné pivo a černé (tmavé nebo červené) čili ječné. Stará česká "svrchní piva" byla zakvašována pomocí tzv. svrchních kvasnic. Tato byla jemnější a byla méně alkoholická než později vyráběná piva pomocí spodního kvašení.

Nejen v Čechách, ale i v mnohých dalších zemích, se dávalo přednost kvašení svrchnímu, protože svrchní piva nebyla vázána na nízkou teplotu, a proto se mohlo používat všude, za každého ročního období a v každém podnebí, aniž by bylo nutno používat drahý led [12].

Popis výroby piv - převážně svrchně kvašených z pšeničného sládu, která u nás převažovala do poloviny 19. století - publikoval prof. Pražské univerzity, přírodovědec, geodet, astronom a osobní lékař císaře Rudolfa II. Tadeáš Hájek z Hájku (1525 – 1600) v 16. století ve své knize: *De cerevisiae eiusque conficiendi, ratione natura, viribus & facultatibus, opusculum* (O pivě, jeho výrobě, povaze, silách a vlastnostech). Kniha vyšla v roce 1585 a je to zřejmě první pivovarská technologie na světě [6].

Samotné Čechy byly právě v minulosti proslulé především svými svrchně kvašenými pšeničnými pivy, avšak se zkvalitňováním připravovaného piva vzrůstal význam ječmene. Čeští sládky postupně nabyli názoru, že pšenice se hodí k vaření méně než ječmen, a že z ječmene se vyrobí čistší a čistěji chutnající pivo.

Přesto se pšeničná piva v českých zemích udržela po dlouhou dobu. Bílé pšeničné pivo, ponejvíce barvy zlatoklasé až ryšavé, vymizelo u nás prakticky až před rokem 1750. V letech 1840 - 1870, kdy s výstavbou strojních pivovarů vzniká v podstatě pivovarství jako průmyslové odvětví, nastává významná změna ve výrobě piva, v jeho zakvašování a uležení. Opouštělo se velmi rychle a komplexně zavedené svrchní kvašení [12].

Významným mezníkem v českém pivovarství bylo založení Měšťanského pivovaru v Plzni (dnešního Prazdroje) v roce 1842, který vyráběl již výhradně spodně kvašená piva. Pivo mělo velmi dobrou kvalitu a během krátké doby všechny pivovary v Čechách a na Moravě zavedly tuto technologii výroby. V polovině 19. století nastal tzv. zlatý věk českého pivovarství, které silně ovlivnilo vývoj tohoto oboru na celém světě [13].

### 2.1.2 Současný stav

29. října 2008 České pivo získalo ochranu evropského zeměpisného označení, což znamená zapsání zeměpisného označení České pivo u Evropské unie. Základem byly úvahy a diskuse mezi sládky a technologi o věcné specifikaci pojmu České pivo a o nutnosti chránit české pivo, technologii jeho výroby i kvalitu a zamezit existenci napodobenin, které se za české pivo vydávaly a zneužívaly tak jeho nenapodobitelných vlastností. Vycházelo se i z ojedinělého faktu, že české pivo se stále vyrábí převážně tradičními technologiemi. Cílem ochrany evropského zeměpisného označení České pivo je zejména zabránit tomu, aby byl jako české pivo označován výrobek vyrobený netradičními metodami v České republice nebo vyrobený metodami tradičními, ale v zahraničí [14].



Obr. 1- Česká ochranná známka

Vztah Čechů k pivo v ČR vykazuje v posledních pěti letech stabilizovanou podobu. Aktuální názory české společnosti na pivo a pivovarství a jejich proměny v uplynulých letech nabízí výsledky šetření, které provedlo Centrum pro výzkum veřejného mínění (CVVM) při Sociologickém ústavu Akademie věd ČR, v.v.i.:

Podíl lidí, kteří pijí pivo, se v České republice v letech 2004 – 2008 nijak výrazně neměnil a dosahuje hodnot kolem 90 % u mužů a mezi 50 – 60 % u žen. Podíl mužů a žen pijících pivo alespoň občas se významně neliší podle kategorií věk, vzdělanost nebo příjem. Mírně nižší spotřebu vykazují nejmladší ročníky (18 – 29 let), naopak největšími konzumenty jsou muži ve věku 45 – 59 let. Potvrdilo se, že pivo nadále zůstává nápojem, který je nejčastěji konzumován ve společnosti jiných lidí. Podle zveřejněných výzkumů je názor veřejnosti na budoucnost českého piva a pivovarnictví dlouhodobě poměrně optimistický. Z výzkumu vyplývá, že 69 % obyvatel se přiklání k názoru, že některé pivovary prorazí na zahraniční trhy a stabilně, zhruba tři čtvrtiny obyvatel se neobávají, že by české pivo bylo z domácího trhu vytlačeno zahraničními značkami.

U konzumentů piva je dlouhodobě patrná preference při volbě piva, které pijí. Konkrétní značku si vybírají konzumenti s vyšším vzděláním a vyšší životní úrovní domácností. Výzkumy CVVM také potvrdily, že tradičně nejdůležitějším kritériem pro výběr piva je podle hodnocení samotných spotřebitelů jeho chuť, přičemž drtivá většina konzumentů neuznává jiné pivo než-li české. Aspekty ceny nebo reklamy se umísťují až na konci seznamu a to za chutí, značkou, zvykem a stupňovitostí. Chuť je při výběru piva důležitější u mužů než žen, které naopak často více zohledňují aspekt ceny. Obecně bylo vysledováno, že s růstem životní úrovně roste preference chuti a v nižších příjmových kategoriích naopak nabývá na síle otázka ceny.

Na českém trhu piva se stalo v posledních dvou letech významným fenoménem nealkoholické pivo, jehož spotřeba dramaticky stoupá. Je to způsobeno především mnohem lepší kvalitou piva, dále přísnějším postihem řidičů konzumujících alkohol a v neposlední řadě i stále se rozšiřujícím počtem míst, kde je nealkoholické pivo k dispozici, ať již lahvové, nebo točené. Nealkoholické pivo není pro české obyvatele samozřejmou náhradou piva, avšak 45 % mužů a 16 % žen jej volí jako nápoj v okamžiku, kdy normální pivo konzumovat nemohou [15].

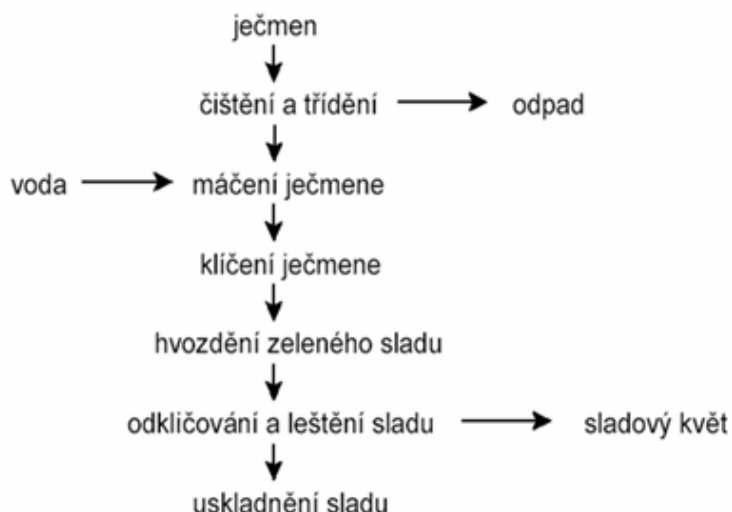
## **2.2 Technologie výroby piva**

Způsoby výroby piva se mohou v různých zemích i v různých pivovarech značně lišit, prvním krokem, který předchází vlastní výrobě piva, je však vždy výroba sladu [16].

### **2.2.1 Výroba sladu**

Slad, jako základní surovina pro výrobu piva, ovlivňuje technologický výrobní postup a má stěžejní význam z hlediska chemického složení, organoleptických vlastností i koloidní stability finálního výrobku [16].

### Schéma výroby sladu



Obr. 2 - Výroba sladu

Pro výrobu sladu se používají ve světě různé suroviny – v sousedním Německu, zejména v Bavorsku, je to pšenice, v USA , v severní a jižní Americe, v Maďarsku nebo Chorvatsku je silný podíl kukuřice, v Africe kořen cassava, v Brazílii brambory, v Mexiku agáve, v Česku je to téměř výhradně ječmen (jarní dvouřadý) pro přípravu ječného sladu, a proto je mu věnována následující podkapitola. Všechny zmíněné komodity jsou zdrojem škrobu nutného pro kvašení při výrobě piva [1, 16].

#### **2.2.1.1 Ječný slad**

Aktivní látky ječného zrna [16,17]:

##### *a) Sacharidy*

Sacharidy představují největší část organického podílu zrna - tvoří 82 % hmotnosti zrna. Výrazně převažují polysacharidy, které se rozdělují na škrobové ( $\alpha$ -glukany) a neškrobové ( $\beta$ -glukany) podle převažujícího typu glykosidových vazeb.

Až 65 % hmotnosti zrna kvalitních sladovnických odrůd tvoří škrob, přibližně 10 % hmotnosti tvoří neškrobové polysacharidy, hlavně celuloza, hemiceluloza, pentosany, lignin a gumovité látky. Zvýšený obsah  $\beta$ -glukanů v ječmeni a následně ve sladu ztěžuje jeho sladařské a pivovarské zpracování sníženou přístupností škrobových zrn enzymům, zvyšováním viskozity roztoků a snížením koloidní stability piva, proto je snahou minimalizovat jejich obsah zkrácením vegetačního období ječmene. Celuloza tvoří hlavní stavební složku obalových pluch, hemicelulosa se podílejí na stavbě a pevnosti buněčných stěn. Nízkomolekulární sacharidy

představované oligosacharidy maltosou, sacharosou a rafinosou i monosacharidy glukosou a fruktosou jsou přítomny jen v nepatrném množství [9].

Z ostatních složek obsahuje ječmen polyfenolické látky, dusíkaté látky i řadu vitaminů.

#### *b) Polyfenoly*

Celkové množství polyfenolických látek se pohybuje od 0,1 do 0,6 % sušiny. Nacházejí se především v obilce jako volné i vázané. Volné kyseliny jsou syringová, vanilinová, ferulová, p-hydroxybenzoová. Častěji se vyskytují ve formě glykosidů nebo esterů. U některých odrůd mohou být přítomny volné kyanidiny (ozimé ječmeny) nebo delfinidiny. Tyto aktivní flavan-3,4-dioly poskytují složité polyfenoly, které mají tzv. tříslovinnou sílu, což znamená schopnost vázat vysokomolekulární dusíkaté sloučeniny a vylučovat je z roztoků. Tato schopnost je klíčovou pro tvorbu lomu mladiny (viz. dále) a pro tvorbu koloidních zákalů piva.

V ječmeni jsou přítomny též anthokyanogeny a tanoidy. **Tanoidy** jsou nízkomolekulární a středněmolekulární polyfenolové látky, jejichž obsah ovlivňuje zejména intenzitu hořkosti a plnost chuti hotového piva. Zvláštní význam má skupina **anthokyanogenů**, které se při zahřátí v kyselém prostředí mění na barevné anthokyanidiny. Jejich nosičem je bílkovina hordein.

#### *c) Dusíkaté látky*

Dusíkaté látky ječmene bílkovinného i nebílkovinného charakteru jsou lokalizovány v různých částech zrna. Za optimum pro sladovnický ječmen se pokládá obsah dusíkatých látek v rozmezí 10 až 11,5 %. V zrně jsou přítomny převážně ve formě rozdílně rozpustných frakcí albuminů, globulinů, hordeinů, glutelinů i jejich štěpů jako lepkové, rezervní a tkáňové bílkoviny. Nebílkovinné dusíkaté složky představované dusíkatými bázemi, fosfatidy, amidy, tvoří jen malý podíl a jsou přítomny zejména v klíčku. Největší podíl dusíkatých látek tvoří právě bílkoviny (**proteiny**), které se rozdělují podle fyzikálně-chemických vlastností do čtyř skupin:

**Albuminy** (leukosiny) jsou proteiny s molekulovou hmotností kolem 70 kDa, rozpustné ve vodě a ve zředěných roztocích solí, kyselin a hydroxidů. Elektroforeticky je lze rozdělit na 8 až 16 frakcí a představují 4 % všech bílkovin v ječmeni. **Globuliny** (edestiny) tvoří asi z 18 % z celkového obsahu bílkovin. Jsou rozpustné v roztocích elektrolytů a elektroforeticky se dělí na 4 frakce, které mají velmi rozdílnou molekulovou hmotnost. Zásadní technologický význam se přisuzuje  $\alpha$ -globulinu, které při pH 4,9 a vysokém obsahu síry tvoří zákaly piva.

**Prolaminy** (hordeiny) jsou rozpustné v 70% alkoholu a nerozpustné ve vodě a v roztocích solí. Tvoří největší podíl obsahu bílkovin (37 %). Jsou to zásobní bílkoviny, jejichž množství je značně ovlivněno zásobou přijatelného dusíku v půdě. Kvalitativní složení (elektroforetická diferenciací) hordeinové frakce se využívá při určování odrůdy ječmene. Elektroforeticky se dělí na pět komponent, z nichž  $\delta$ - a  $\epsilon$ -hordein jsou součástí koloidních zákalů piva.

**Gluteliny** (gluteniny) jsou lehce rozpustné v alkalických nebo zalkalizovaných rozpouštědlech. V celkovém množství bílkovin jsou zastoupeny asi 32 %, při jejich zvýšeném obsahu lze předpokládat horší rozluštění sladu.

V zrně jsou rovněž složeny (konjugované) bílkoviny neboli **proteidy**. Jde o organické dusíkaté látky, které hydrolýzou poskytují jednak bílkoviny a jejich štěpné produkty a jednak látky nebílkovinné. Rozdělují se do pěti skupin:

**Fosfoproteiny** (protein + fosfát) jsou důležitými hydrolasami.

**Glykoproteiny** (protein + cukr) doprovázejí většinou albuminy a často mají funkci koenzymů.

**Lipoproteiny** (protein + lipid) – např. lecitinproteiny působí negativně na pěnivost.

**Chromoproteiny** (protein + barevná komponenta) obsahují barevné složky anthokyanogeny, chlorofyl apod.

**Nukleoproteiny** (protein + nukleové kyseliny) jsou nejdůležitější.

Z hlediska dalšího zpracování jsou důležitými bílkovinnými složkami ječmene enzymy, přítomné jak v latentní, tak v aktivní formě. Ve sladařské technologii se vyskytují enzymy všech šesti klasifikačních tříd, výrazně převažují procesy, které katalyzují hydrolytické enzymy (amylolytické, proteolytické, cytolytické enzymy a fosfatasy).

#### *d) Vitaminy*

V zrna ječmene jsou obsaženy rovněž různé vitaminy, z nichž mnohé tvoří součást aktivních skupin různých enzymů a jsou proto důležité při klíčení a rozmnožování kvasinek. Ve významném množství je přítomen vitamín H, E, provitamin A a téměř celý komplex vitamínů skupiny B (B1, B2, B3, B5, B6), kyselina listová, v menším množství vitamín C [17].

#### **2.2.1.2 Příjem, třídění, čištění, a sušení ječmene [16]**

Základním požadavkem pivovarsko-sladařského průmyslu je odrůdová jednotnost a stejný produkční původ zrna. Zrno musí být vyzrálé, neboť nevyzrálé ječmeny obsahují zpravidla méně enzymů a více nízkomolekulárních látek, zejména cukrů a dusíkatých látek. Tyto látky pak sice umožní rychlé vyklíčení zrna, ale jakmile se spotřebují, klíčení citelně ochabuje. Při nízké koncentraci enzymů je štěpení rezervních látek pomalé, zárodek má nedostatečnou výživu a jakost sladu je zpravidla nevyhovující. Kvalitní surovina tedy podstatně usnadňuje výrobu.

Příjem sladovnického ječmene se provádí na přijímací rampě z vagónů, aut, popř. i z lodí a z každé dodávky se odebírají vzorky k analýzám. Přijímací rampa je vybavena mostní nebo automatickou váhou, pod rampou jsou zabudovány příjmové koše, které umožňují dělit zrno podle jakostních znaků i odrůd. Čištění zrna probíhá v čistírně na základě velikosti (síta), spec. hmotnosti (aspirátéry), tvaru a délky (triéry). Železné příměsi se odstraňují na elektromagnetech nebo permanentních magnetech. Vyčištěný ječmen se pak dále třídí na podíl nad sítem 2,5 mm (I. třída) podíl nad sítem 2,2 mm (II. třída neboli zadina používaná ke krmení).

Dokonale vyčištěné a vytříděné zrno je prvním předpokladem nízkých skladovacích ztrát a vyrovnané jakosti finálního výrobku.

K zajištění životaschopnosti a minimálních ztrát dýcháním je navíc nutné skladovat zrno s nízkým obsahem vody (14 – 15 %). V opačném případě dochází k poklesu klíčivosti a klíčivé energie. Nevyklíčené obilky jsou nejen vhodným substrátem pro rozvoj plísní, ale promítají se i do zhoršení jakostních znaků hotového sladu. Z hlediska bezpečnostního i ekonomického se suší zrno do vlhkosti 17 % výhradně pomocí aktivního větrání. Při vyšší vlhkosti se suší ječmen termicky na sušárnách s nepřímým ohřevem při teplotě náhřevu zrna do 40 °C. Sušicí režim musí být veden tak, aby při jednom průchodu zrna sušárnou byl snížen obsah vody maximálně o 3 % .

### **2.2.1.3 Máčení ječmene [16, 17]**

Cílem máčení je zvýšit řízeným způsobem obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna, přičemž přijatá voda musí vystačit až do konce klíčení. Máčení se považujeme za nejdůležitější úsek výroby sladu, který rozhoduje o jeho budoucí kvalitě.

Technologicky velmi významným efektem je vyluhování barevných a hořkých látek, kyseliny křemičité a bílkovin z pluch. Tyto látky jsou nežádoucí, neboť zhoršují sensorické vlastnosti piva a podporují tvorbu zákalu v pivu. Podmínkou pro správný průběh klíčení je dostatek vody a vzduchu u namáčeného ječmene. Zvýšení obsahu vody v zrně vede k zahájení projevů života – ke klíčení.

Rychlost příjmu vody zrnem ovlivňuje řada faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou

- teplota vody,
- velikost
- struktura zrna,
- provětrávání ječmene.

Teplota máčecí vody má rozhodující vliv na rychlost příjmu vody. Čím je voda teplejší, tím rychlejší je příjem vody, neboť hydratace koloidů je rychlejší a se zvyšující se teplotou klesá viskozita vody. Velikost zrna ovlivňuje významně rychlost příjmu vody. Proto je nutné, aby byly zpracovávány ječmeny vytříděné, neboť jen obilky stejné velikosti mají předpoklad ke stejné rychlému příjmu vody. Čím je zrno větší, tím pomaleji přijímá vodu. U nevytříděného ječmene dochází při máčení k přemočení malých zrn, nebo k nedomočení velkých zrn. Důsledkem je nestejně namočení, což nakonec vede k nehomogennímu průběhu klíčení a k výrobě nehomogenního sladu. Struktura i složení zrna jsou výrazně ovlivněny klimatickými podmínkami každého ročníku. Existuje velký rozdíl v kvalitě zrna vyprodukovaného v suchém nebo vlhkém ročníku. Zrno z ročníku suchého má polosklovitý až sklovitý endosperm, většinou i vyšší obsah bílkovin, což všechno negativně ovlivňuje příjem vody. Zrna moučnatá přijímají vodu rychleji, stejně jako ječmen s nižším obsahem bílkovin. S příjmem vody se zahájí i intenzivnější dýchání ječmene, a je tedy i větší spotřeba kyslíku. Pokud není ječmen pravidelně provětráván a není zaručen přívod kyslíku, dochází k intramolekulárnímu dýchání, které v extrémních případech může vést k poškození, nebo dokonce až k umrtvení embrya zrna.

### **2.2.1.4 Technologie máčení [17,18]**

K máčení ječmene se používají železobetonové nebo ocelové **náduvníky**, které se umísťují blízko zařízení pro klíčení ječmene.

Nejběžnější je způsob máčení se vzdušnými přestávkami, kdy se ječmen napouští tenkým proudem do náduvníku předem naplněného vodou, po té se z hladiny odstraní splavky a spodem se připouští voda, aby se ječmen propíral. Po vyprání se tato voda vypustí a napustí se čerstvá voda tak, aby hladina byla 20 - 30 cm nad povrchem ječmene. Máčecí voda se pak dle teploty, množství a možností vzdušnění 1 - 3krát denně vyměňuje a mezi každým napouštěním se dělá vzdušná přestávka 4 - 6 h, aby se zrno dostatečně provzdušnilo. Celková doba máčení se pohybuje od 60 do 90 h.

### 2.2.1.5 Klíčení

Účelem sladařského klíčení ječmene je aktivace a tvorba enzymů a dosažení požadovaného stupně rozluštění (vnitřní přeměny) podle typu vyráběného sladu. Dosahuje se toho umělým modelováním podmínek přirozeného klíčení vhodnou teplotou, vláhou a přístupem kyslíku. Při klíčení se vyvíjejí v zárodečné části zrna zárodky kořínků a listů za využití zásobních látek z endospermu a současně se mění i vnitřní znaky zrna. Klíčení klasickým způsobem se provádí na humnech a má několik charakteristických fází:

**Mokrý hromada** – tj. vymáčený ječmen ve výšce 0,6 - 0,8m

**Suchá, oschlá hromada** – stadium do 24h po vymočení, kdy hromada tak zvaně špičkuje. Nutný je přívod vzduchu, neboť zrna intenzivně dýchá a objevují se první špičky kořínků.

**Pukavka** – hromada stále vyžaduje dostatek vzduchu - objevují se další kořínky a pokračuje jejich růst, hromada intenzivně dýchá a má výraznou vůni okurek, postupně přechází do stadia mladík.

**Mladík** – nejdůležitější fáze klíčení, zrna intenzivně dýchá, intenzivně probíhají i enzymatické přeměny. Je-li v hromadě nedostatek oxidu uhličitého, nadměrně se zvyšují ztráty dýcháním zrna i růstem kořínků. Vyrovnaná hromada – délka kořínků a střílky se vyrovnává, dýchání se zpomaluje, hromada stárne.

**Stará hromada** – intenzita dýchání klíčících zrn nadále klesá a je patrné postupné zavadání kořínků. Výsledným produktem klíčení je tzv. zelený slad [17,18].

Během klíčení se působením enzymů štěpí rezervní látky a zvyšuje se rozpustnost a luštitelnost endospermu. Největší technologický význam mají fosfatasy, cytasy, proteasy a hlavně amylasy.

**Fosfatasy** uvolňují při svém působení z fytinu a dalších organických látek kyselce reagující fosforečnany (hydrogen- a dihydrogenfosforečnany), a tím napomáhají tvorbě kyselé reakce, důležité pro činnost ostatních enzymů. Ke kyselé reakci uvnitř zrna přispívají i organické kyseliny, které vznikají při rozkladu sacharidů a aminokyseliny, které vznikají štěpením bílkovin.

**Cytasy** jako komplex enzymů štěpících neškrobové polysacharidy celulosu, hemicelulosu a gumovité látky (glukany, pentosany), pomáhají zpřístupnit zrnka škrobu a makromolekuly bílkovin uzavřené v buňkách endospermu. Klíčící zrna jejich působením postupně křehne a měkne, a tím dochází k tzv. cytolýtickému rozluštění.

**Amylasy** se při klíčení aktivují (cukrotvorná  $\beta$ -amylasa) i tvoří (dextrinotvorná  $\alpha$ -amylasa). Jejich působením se štěpí rezervní škrob endospermu na maltosu a glukosu, které jsou dále prodýchávány za tvorby energie potřebné pro životní procesy zrna. Štěpení škrobu probíhá při sladování sice jen ve velmi omezené míře (rozloží se jen 4 – 5 %), avšak vytvořené enzymy mají zásadní význam při štěpení škrobu při pozdějším rmutování. Aktivace a tvorba amylas je tím větší, čím déle se hromada vede při nízké teplotě.

Důležitý je přístup kyslíku ke klíčícímu zrnku, aby bylo zajištěné dostatečně intenzivní dýchání zrna. Komplikace způsobuje oxid uhličitý, který při klíčení vzniká a brzdí aerobní dýchání. Proto se v počátečních stádiích klíčení musí hromady často provětrávat, aby se vznikající oxid uhličitý vyvětral.

**Proteolytické enzymy**, jejichž aktivita se během klíčení několikanásobně zvyšuje, štěpí bílkoviny. Jejich znatelný přírůstek nastává již v počáteční fázi klíčení v předstihu před aktivací

amylasy. Zpočátku se zvláště silně štěpí hordein, později jeho štěpení slábne a začíná převládat štěpení glutelinu. Z globulinů se nemění během klíčení pouze  $\beta$  - globulin.

I když k nejintenzivnějšímu štěpení bílkovin dochází až při rmutování, aby vyrobený slad dosáhl dobré jakosti, musí proběhnout hluboká proteolýza již při sladování. Na rozluštění bílkovin má vliv především odrůda a ročník. U kvalitních ječmenů dochází při sladování k hlubšímu rozštěpení bílkovin, než u ječmenů horší kvality. U velkých obilek, se oproti obilkám malým, rozluštění zřetelně opožďuje.

Vliv má také *sklizňová zralost*. Ječmeny na bílkoviny chudší mívají příznivější skladbu bílkovin, a proto se snadněji a hlouběji rozlušťují, než ječmeny bílkovinami bohatší.

Zřetelně se uplatňuje také *stupeň domočení zrna*. Čím je vyšší, tím je rozluštění bílkovin hlubší. Rovněž *větrání* při máčení a v prvních dnech klíčení podporuje stupeň rozluštění bílkovin, neboť při intenzivnějším dýchání dochází k větším metabolickým změnám, které zasahují také bílkoviny.

*Stupeň rozluštění bílkovin* se nejvíce projevuje na pěnivosti piva. Slady přelouštěné, ale zejména slady krátké (nedoluštěné) snižují pěnivost i chlebnatost, zhoršují chuť a koloidní stabilitu piva. Hluboké rozluštění bílkovin je příčinou prázdné chuti piva. Proto se přikládá optimálnímu obsahu  $\alpha$  - aminodusíku velký význam, neboť umožňuje kvasinkám asimilovat nízkomolekulární dusíkaté frakce [18, 19].

Jako mezistupeň mezi klíčením a hvozděním se zařazuje, zejména u bavorského sladu **válečkování**, na půdních prostorách v blízkosti hvozdu nebo na volné kapacitě hvozdu. Zelený slad zde ve vrstvě 300 – 500 mm ještě dorůstá, dolušťuje se a zavadá, což umožňuje zvýšit kapacitu humen. Při výrobě pšenišského sladu se válečkování nevyužívá [16].

### 2.2.1.6 Hvozdění [16, 17]

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu, kdy se snižuje obsah vody ve sladu pod 4 %, zastavují se životní a lušticí pochody v zrně, redukuje se část enzymové aktivity a tvoří se barevné i aromatické látky, charakteristické pro jednotlivé druhy sladů a piv.

Vlastní proces hvozdění se provádí na hvozdech a lze ho rozdělit na 3 fáze, jež postupně přecházejí jedna v druhou. V první růstové fázi se snižuje obsah vody na 20 %, teplota se pohybuje kolem 40 °C a zrno je stále schopné klíčit. Stoupá obsah rozpustného dusíku a nízkomolekulárních produktů štěpení škrobu.

**Růstová fáze** probíhá do teploty 40 °C, při vlhkosti nad 20 % a v zrně při ní ještě probíhají všechny vegetační pochody včetně růstu kořínků a stěelky. **Enzymatická fáze** probíhá při teplotách do 60 °C a vlhkosti pod 20 %. V zrně jsou již zastaveny vegetační pochody, pokračují ale enzymatické reakce. **Chemická fáze** probíhá při teplotách nad 60 °C a při vlhkosti pod 10 %. V zrně dochází především k tvorbě sensoricky aktivních látek.

Při výrobě *sladu pšenišského typu* je nutno nejprve odstranit vodu ze sladu při teplotách do 60°C velkým množstvím vzduchu asi na 10 – 12 % (fáze předsoušení sladu), v další fázi se teplota zvyšuje na 80 °C (fáze vyhřátí sladu) a nakonec je slad tzv. dotahován při teplotě 80 – 85 °C. Při výrobě *bavorského typu sladu* se naproti tomu musí nechat enzymy na hvozdu dále působit a vytvořit značné množství štěpných produktů – sacharidů a aminokyselin. Množství vzduchu procházející hvozděnou vrstvou je nižší a zelený slad se zahřívá na teplotu 40 – 50 °C, konečnou dotahovací teplotou je 105°C [17].

K nejdůležitějším reakcím při hvozdní patří tvorba chuťových (aromatických) a barevných (oxidoredukčních) látek. Tyto látky tvoří charakter sladu, jeho vůni, chuť, barvu a oxidoredukční schopnosti. Chuťové i barevné látky obsahující dusík – melanoidiny vznikají při vyšších teplotách interakcemi štěpných produktů polysacharidů a bílkovin, zejména monosacharidů a aminokyselin (Maillardovy reakce). Jednotlivé fáze tvorby melanoidinů jsou složité chemické reakce typu kondenzací, aldolových kondenzací a dehydratací, štěpení aminokyselin a termického štěpení cukrů. Bezdušičaté barevné a aromatické látky vznikají při hvozdní karamelizací sacharidických složek při termickém štěpení cukrů, enzymovou oxidací za vzniku melaninů a neenzymatickým hnědnutím (komplexy polyfenolů a železa). Pro dostatečnou tvorbu těchto látek je nezbytným předpokladem hluboké rozštěpení polysacharidů a bílkovin během klíčení ječmene. Melanoidiny, reduktony, melaniny, karamelizační produkty i ostatní barevné a aromatické látky chrání složky koloidních roztoků vůči změnám disperzity, uplatňují se jako oxidoredukční složky a svým zabarvením vytvářejí typickou barvu sladu a z něj vyrobeného piva [18].

#### **2.2.1.7 Odkličování a drcení [16]**

Odhvozdný slad se sklápí do košů a dopravuje se k odkličovačce, kde se zbavuje kořínků zvaných sladový květ, jenž je pro vysoký obsah biologicky významných látek vyhledávanou surovinou v krmivářství i ve fermentačních technologiích. Odkličovaný slad se chladí a je dopravován do sil, kde se nechává šest týdnů odležet před vlastním zpracováním.

### **2.2.2 Výroba piva**

#### **2.2.2.1 Suroviny pro výrobu piva**

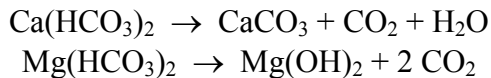
Společně se sladem patří k základním a nepostradatelným pivovarským surovinám kvalitní voda a chmel [20].

#### Voda [18]

Voda má podstatný vliv na charakter a jakost piva, o čemž svědčí např. i světově proslulý plzeňský Prazdroj, který vděčí za svou kvalitu a oblibu kromě jiného právě složení používaných vod.

V pivovarské technologii se musí nezbytně používat voda hygienicky nezávadná, především na úseku kvasného hospodářství, mytí nádob a výrobního zařízení. Pro varné účely nejsou kladeny na vodu tak vysoké požadavky, neboť při varu rmutu a mladiny se prakticky sterilizuje. Voda nesmí být příliš tvrdá a nesmí obsahovat větší množství Fe, CaSO<sub>4</sub> a Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, které způsobují tvrdou chuť piva. NaCl přítomný v menším množství působí příznivě na dokreslení chuti, zejména u tmavých piv.

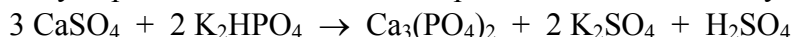
K nejdůležitějším rozpuštěným látkám patří vápenaté a hořečnaté soli, které vytvářejí tvrdost vody, což je důležité kritérium posuzování kvality vody pro pivovarské účely. Rozlišuje se tvrdost stálá – nekarbonátová a tvrdost přechodná – karbonátová. Tvrdost stálá je tvořena vápenatými a hořečnatými solemi (sírany, chloridy, křemičitany aj.), kdežto tvrdost přechodná je tvořena hydrogenuhlíčitany, které se varem úplně či částečně rozkládají.



Celková tvrdost je součtem tvrdosti stálé a přechodné, vyjadřuje se mmol/l a podle její hodnoty se v pivovarském oboru vody dělí na:

měkké	do 1,4 mmol/l
středně tvrdé	do 2,1 mmol/l
tvrdé	do 5,3 mmol/l
velmi tvrdé	nad 5,3 mmol/l

Z technologického hlediska je důležité, že některé ionty svými reakcemi s fosforečnany ječmene a sladu způsobují snížení pH, čili zvyšují kyselost rmutů, sladiny a mladiny. Takto působí především ionty vápníku a částečně i hořčíku pozitivně na činnost enzymů:



Na druhé straně hydrogenuhličitanové a uhličitanové ionty působí opačně, zvyšují pH, tudíž snižují kyselost a působí negativně na varní proces.



Pro výrobu světlých piv je vhodná měkká voda s menším podílem hořčíku a přechodné tvrdosti. Pro tmavá piva nevádí i tvrdší voda.

### Chmel [17,18]

Pro výrobu klasického piva je také chmel (*Humulus lupulus*) velmi důležitý. Kromě toho, že dodává nápoji lehce hořkou chuť a přispívá k tvorbě charakteristického aroma, má celou řadu dalších z technologického hlediska velmi důležitých vlastností. Složky chmele působí jako srážecí prostředek vysokomolekulárních látek mladiny, ovlivňují pěnivost a čirost, působí bakteriocidně a podílejí se významnou měrou na koloidní stabilitě piva.

Sklizený chmel obsahuje asi 75% vody, proto se suší na obsah 11 %, při granulaci na 5-6 %. Při tomto obsahu vody chmel neplesnivý, ani se nerozpadá. Po odsušení se chmel síří a lisuje do přepravních a skladovacích žoků.

#### **2.2.2.2 Technologický postup**

Vlastní výrobu piva lze rozdělit do tří technologicky odlišných výrobních úseků, zahrnujících řadu složitých mechanických, fyzikálně-chemických a biochemických procesů

- A) výroba mladiny ze sladu, chmele a vody, popř. za použití náhražek,
- B) kvašení mladiny
- C) dokvašování mladého piva pivovarskými kvasinkami, zrání
- D) závěrečné úpravy a stáčení zralého piva do transportních nádob či obalů [18].

#### A) Výroba mladiny

Výroba mladiny dále zahrnuje několik technologických operací, do jisté míry samostatných, avšak úzce spolu souvisejících. Jedná se o:

- šrotování sladu případně. sladových náhražek, vystírání sladového šrotu do vody,

- rmutování,
- scezování sladiny a vyslazování sladového mláta,
- chmelovar a závěrečné úpravy mladiny [20].

a) Šrotování a vystírání [18]

Ve sladu a sladových náhražkách obsažené látky, především škrob, je nejprve nutné převést do roztoku, aby mohly být sladovými enzymy přeměněny ve směs nízkomolekulárních sacharidů, které později kvasinky zkvasí na ethanol a oxid uhličitý. Slad a případně použité škrobnaté náhražky se proto nejprve rozšrotují s cílem dokonalého vymletí endospermu na vhodný poměr jemných a hrubších částic, a to při zachování celistvosti pluch, neboť ty slouží v pozdější fázi výroby jako filtrační materiál. Tento sladový šrot se poté mísí s vodou při vystírání a následuje

b) Rmutování [10, 17, 18]

V něm dochází k mnoha enzymovým reakcím, především ke zcukření škrobu. Hlavním cílem rmutování je převedení žádoucích složek extraktu varních surovin do roztoku. Rozhodující je činnost amylolytických, proteolytických a kyselinotvorných enzymů, druhotné jsou enzymové reakce štěpení gumovitých látek a hemicelulos a oxidačně-redukční a další enzymové reakce.

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

- 35 – 38 °C – kyselinotvorná teplota
- 48 – 52 °C – peptonizační teplota
- 60 – 65 °C – nižší cukrotvorná teplota
- 70 – 75 °C – vyšší cukrotvorná teplota
- 78 °C - odrmutovací teplota

Při rmutování tak pokračuje část biochemických dějů započatých při klíčení sladu. Rozlišují se dva základní způsoby rmutování – dekokční a infuzní.

Oba typy se od sebe liší nejen technologickým postupem, ale i nárokem na strojní vybavení varny. Zatímco infuzní způsob představuje nejjednodušší způsob a je možno provádět jej pouze v jedné vyhřívané nádobě, pro dekokční rmutování jsou třeba dvě nádoby, z toho je jedna vyhřívána (rmutovací pánve nebo kotel, většinou s parním nebo elektrickým ohřevem, výjimečně ohřevem přímým plamenem). Dekokční rmutování se provádí na jeden rmut, na dva rmuty nebo na tři rmuty.

○ *Rmutování na jeden rmut* – 100 kg sladového šrotu se smíchá (vystře) ve 420 l vody, teplé 62,5 °C, ve vystírací kádi. Po smíchání klesne teplota na 58 °C, poté se polovina díla, tzv. rmut, přečerpá do rmutovací pánve. V této pánvi se zahřeje na 75 °C, nechá se prodleva pro proběhnutí zcukření škrobu a poté se zkouší jodovým roztokem, zda je veškerý škrob zcukernatělý (kápnutím pár kapek rmutu na bílý talířek a přidáním jodového roztoku se kontroluje případná změna barvy rmutu; pokud zůstane původní, u světlého piva žlutá, u tmavého piva tmavě okrová, je všechen škrob převeden na cukr a rmut se může ohřát k bodu varu). Pokud se barva přidáním jodu změní do modro-fialova, je nutno prodloužit dobu prodlevy do té doby, dokud všechen

škrob nez cukří. Zcukřený rmut se vaří po dobu 10 – 30 minut, poté se vrátí do vystírací kádě a smíchá se s jejím obsahem. Tím se dosáhne zvýšení teploty v celém díle přibližně na 75 °C, při které proběhne zcukření škrobu i v původním díle.

○ *Rmutování na dva rmuty* – sladový šrot se vystírá do vody o teplotě 37 °C, pak se ohřeje přidáním určitého množství horké vody, tzv. „zapáčkou“ 52 °C a jedna třetina, tzv. první rmut, se přečerpá do rmutovací pánve, kde se opět ohřívá jako u jednorumtového způsobu na teplotu 72 – 75 °C, po zcukření a provedení zkoušky na zcukření se rmut povaří a vrátí se zpět k původnímu dílu. Takto se zvýší teplota na 65 °C. Poté se spustí opět jedna třetina - druhý rmut, a postup se opakuje.

○ *Rmutování na tři rmuty* – začátek rmutování, postup ohřevu a var rmutu je shodný s dvorumtovým způsobem, avšak po vystření se ihned první rmut čerpá do rmutovací pánve. Infúzní postupy rmutování zajišťují převedení extraktu do roztoku dlouhodobějším účinkem sladových enzymů bez povaření rmutu. Používají se především při výrobě svrchně kvašených piv a při surogaci materiály bez enzymové aktivity (náhrada sladu ječným šrotem, rýží atd.) s aplikací průmyslově vyráběných enzymů.

Nejdůležitější chemickou reakcí při rmutování je štěpení škrobu na nízkomolekulární cukry, zejména glukosu, maltosu a dextriny, které katalyzují enzymy ze skupiny glukosidas, za účasti enzymů ze skupiny transglukosidas. Štěpení škrobu má tři fáze – bobtnání a zmazovatění škrobu, ztekucení škrobu a zcukření škrobu. Prodlužováním nebo zkracováním časových prodlev při optimálních teplotách pro dextrinotvornou  $\alpha$ -amylasu nebo cukrotvornou  $\beta$ -amylasu lze v určitém rozmezí měnit složení rozpuštěného extraktu. Delší časovou prodlevou při 65 °C se získá sladina s vyšším podílem zkvasitelných cukrů (maltosy a glukosy), naopak rychlým vyhřátím rmutu na 70 °C se potlačí působení  $\beta$ -amylasy a sladina je bohatá na dextriny.

Kromě štěpení škrobu je při rmutování důležité i štěpení vysokomolekulárních bílkovin. Bílkoviny jsou důležité pro pěnivost piva i plnost chuti a jejich štěpné produkty aminokyseliny jsou důležité pro kvašení. Vysoký obsah bílkovin by však způsoboval nízkou stabilitu a trvanlivost piva, proto dochází k jejich štěpení proteolytickými enzymy (proteinasami a peptidasami) V technologickém procesu se sice nepožaduje převést ze sladu do piva mnoho bílkovin (jen asi 1/3 až 2/5), ale je třeba získat jednotlivé frakce pokud možno v co nejpříznivějším poměru pro jakost.

Z vysokomolekulárních bílkovin jsou při rmutování částečně štěpeny a převedeny do roztoku gluteliny a prolaminy, převážná část jich však odchází do mláta, protože jsou nerozpustné. Přímě rozpustné jsou naopak albuminy, část globulinů a jejich štěpné produkty.

Přirozenou kyselost vystírky způsobují enzymy při štěpení organických sloučenin fosforu za uvolňování kyseliny fosforečné, která spolu s aminokyselinami vzniklými štěpením bílkovin snižuje pH. Při rmutování jsou částečně štěpeny též ve sladu obsažené lipidy. Reakce je katalyzována enzymy lipasami, které jsou tak zodpovědné za zvýšení obsahu glycerinu a volných mastných kyselin v pivu.

### c) *Sezování sladiny a vyslazování sladového mláta*

Po rmutování následuje operace *scezování*, prováděné za účelem oddělení roztoku extraktu, tj. **sladiny**, od pevného podílu zcukřeného rmutu, tj. **mláta**. *Vyslazování mláta* se provádí 75 °C

horkou vodou, aby se z mláta vyloužily poslední zbytky rozpustného extraktu. Zfiltrovaný roztok extraktu při vyslazování se nazývá **výstřelek** a zpravidla se vyslazuje na 2 – 3 výstřelky.

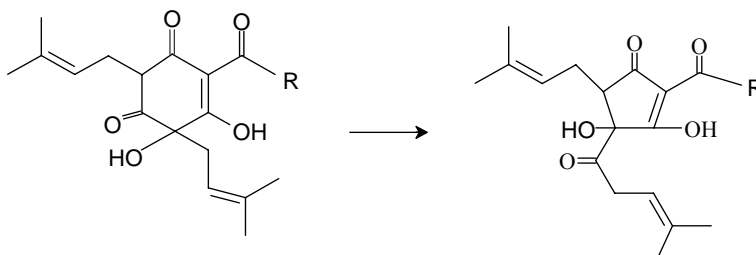
d) *Chmelovar*

Označuje proces, kdy se sladina získaná scezováním se v mladinové pánvi vaří s chmelem po dobu 90 – 120 minut, u moderních systémů 65 – 80 minut.

Chmelovar provázejí technologicky důležité fyzikální změny a chemické reakce většinou na sobě vzájemně závislé. Uplatňuje se vliv doby a intenzity varu, pohybu a odparu, pH a přítomných tříslovin. Tyto činitele působí na koagulaci bílkovin, na vznik komplexních sloučenin bílkovin s tříslovinami, na rozpustnost a chemické změny hořkých látek, na barvu mladiny i na vznik redukujících látek. Ve srovnání s výchozím stavem je mladina koncentrovanější, obsahuje vyloužené a změněné látky chmele a je chudší o vysrážené bílkoviny. Míra koagulace vysokomolekulárních látek, tzv. lom mladiny ovlivňuje organoleptické vlastnosti a koloidní stabilitu piva. Varem s chmelem se tedy chemické složení mladiny upraví i do značné míry stabilizuje a zároveň dochází k inaktivaci přítomných enzymů, což má zásadní význam pro další zpracování mladiny kvašením a je nutnou podmínkou mikrobiální čistoty hlavního kvašení, dokvašování a biologické stability piva.

Hlavními reakcemi při chmelovaru jsou izomerační reakce chmelových  $\alpha$ -hořkých kyselin a rozličné oxidační reakce vedoucí k produktům ovlivňujících sensorický charakter mladiny a následně i piva. Za horka se degradují mastné kyseliny, probíhá oxidace vyšších alkoholů, tvoří se produkty Maillardovy reakce, dochází k termické degradaci aminokyselin a k enzymové i neenzymové oxidaci polyfenolů. V průběhu chmelovaru klesá hodnota pH o 0,15 – 0,25 především díky tvorbě melanoidinů, v menší míře též reakcí vápenatých a hořečnatých solí vyslazovací vody s hydrogenfosforečnany sladu a chmelovými hořkými kyselinami. Tento přirozený pokles pH příznivě ovlivňuje koagulaci bílkovin. Chmel se k mladině přidává většinou natřikrát a jeho jednotlivé technologicky účinné látky se chovají různě.

o **Chmelové pryskyřice** jsou původcem hořké chuti piva a současně základní účinnou složkou chmele. Jejich rozpouštění ve vroucí mladině je významně ovlivněno hodnotou pH, přičemž při vyšším pH je jejich rozpustnost vyšší, ale v roztoku jsou přítomny převážně ve formě molekulární disperze, projevující se drsnou hořkostí. Nejvíce hořkosti udílí pivu  $\alpha$ -hořké kyseliny, které při varu mladiny částečně izomerizují – *Obr. 3*, čímž vznikají produkty rozpustné i ve studené mladině.



*Obr. 3- Izomerace  $\alpha$ -hořkých kyselin na iso- $\alpha$ -hořké kyseliny při chmelovaru[18]*

Podíl izomerizovaných kyselin vzrůstá s dobou a teplotou varu, se vzrůstem hodnoty pH a se stupněm dezintegrace chmelových hlávek, klesá s rostoucí dávkou chmele a s větším obsahem hrubých kalů v mladině. Z jednotlivých homologů  $\alpha$ -hořkých kyselin dává největší výtěžky kohumulon, proto chmele s vysokým obsahem kohumulonu poskytují vyšší hořkost.

#### o **Chmelové polyfenoly**

Polyfenoly neboli třísloviny chmele představované sloučeninami typu bioflavonoidů (katechiny, anthokyanogeny, prenylované flavonoidy) a fenolovými kyselinami mají důležité technologické vlastnosti, jako je jejich srážecí účinek na vysoko- a středně-molekulární bílkoviny, jsou nositeli antioxidačních vlastností a přispívají též k výraznosti a říznosti chuti piva.

#### o **Chmelové silice**

Chmelové silice sice z větší části při výrobě piva vytěkají při chmelovaru, ale přesto část, která v mladině zůstane a přejde až do hotového piva, vytváří jeho aroma.

Produktem chmelovaru, který trvá zpravidla 90 min, je mladina. V chemickém složení mladiny převládají vedle vody sacharidické složky (dextriny, oligosacharidy maltosa a maltotriosa, monosacharid glukosa a malé podíly  $\beta$ -glukanů a pentosanů), dusíkaté látky, chmelové a minerální látky, polyfenoly a vitaminy. Chemické složení mladiny je rozhodující pro konečnou kvalitu vyrobeného piva [18].

Po chmelovaru následuje oddělení zbytků chmele ve chmelovém cízu, či jiném separátoru, pokud byl použit hlávkový chmel, byl-li dávkován granulovaný chmel, odstraní se pevné zbytky v průběhu závěrečných úprav mladiny pro zakvašení. Úpravy zahrnují separaci hrubých kalů ve vířivé kádi (whirpoolech), chlazení mladiny obvykle taktéž ve vířivé kádi, kde při teplotách kolem 95 °C dochází k usazení hrubých kalů. Pak následuje dochlazení mladiny v deskových protiproudých chladičích na zákvasnou teplotu 5 - 7 °C, k částečné či úplné separaci jemných kalů (sedimentační kádě, odstředivky, dekantéry, filtry, odstředivky, flotační tanky) a nakonec se zchlazená mladina provzdušní (flotační tanky, keramické svíčky, trysky, injektory) sterilním vzduchem. Vyrobená mladina musí svou koncentrací extraktivních látek odpovídat vyráběnému pivu, tzn. že při výrobě 10 % piva musí obsahovat 10 % hm. extraktivních látek, při výrobě 12 % piva 12 % hm. extraktivních látek apod.

### B) Kvašení mladiny [10, 18]

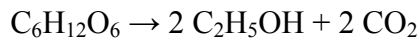
Cílem kvašení piva je neúplně řízené prokvašení sacharidů na alkohol a CO<sub>2</sub> za současného vytváření vhodných organoleptických vlastností piva.

Hlavní kvašení se provádí většinou v otevřených kvasných kádích pivovarskými kvasinkami. Prvním nutným krokem k dosažení požadované kvality piva a zabezpečení optimálního průběhu výroby podle technologického postupu kvašení a dokvašování je výběr vhodného kmene kvasinek. V současnosti se používají dva základní druhy:

**a) Kvasinky svrchního kvašení** (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *cerevisiae*) – pro piva typů „ale“, „porter“, „stout“. Po ukončení kvašení jsou vynášeny na hladinu vznikajícím oxidem uhličitým, kde tvoří tzv. „deku“, a mají vyšší tepelnou odolnost. Tyto kvasinky jsou používány pro výrobu svrchně kvašených piv, teplota kvašení je v rozsahu 20 – 24 °C.

**b) Kvasinky spodního kvašení** (*Saccharomyces carlsbergensis*) – pro piva plzeňského typu, po ukončení kvasného procesu usedají na dno kvasných nádob, teplota kvašení je v rozsahu 8 – 15 °C.

V Belgii se kromě toho vyrábí piva spontánním kvašením s využitím směsi přírodních mikroorganismů. Nejdůležitějšími reakcemi hlavního kvašení jsou přeměny zkvasitelných sacharidů glukózy, maltózy a maltotriózy na etanol a oxid uhličitý anaerobním kvašením.



Současně se v malé míře tvoří vedlejší kvasné produkty, alifatické alkoholy, aldehydy, diketony, mastné kyseliny a estery. Všechny tyto látky a jejich vzájemný poměr spolu vytváří chuť a aroma piva.

V průběhu hlavního spodního kvašení v kádích umístěných v chlazených místnostech zvaných spilka se rozlišuje několik stadií. Brzo po zakvašení dochází k *zprašování*, kdy se objevuje první bílá pěna na povrchu kvasící mladiny. Následuje *odrážení*, při němž pěna houstne a je vytlačována do středu kvasné kádě. *Nízké bílé kroužky* představují hustou smetanovou pěnu s kučeravým povrchem a jsou stádiem nejintenzivnějšího kvašení. *Vysoké hnědé kroužky* jsou způsobeny poklesem pH a vyflotováním vyloučených chmelových a tříslo-bílkovinných sloučenin. Následuje *propadání kroužků* za tvorby husté deky z vyloučených látek na povrchu prokvašené mladiny, tj. mladého piva. Deky se z hladiny mladého piva sbírají, aby do něho nepropadly a nezpůsobily zhoršení chuti piva. Současně ke konci hlavního kvašení sedimentují spodní kvasinky na dno kvasné kádě. Po stáhnutí piva se sbírají, propírají se studenou vodou a znovu se nasazují do provozu. Hlavní kvašení trvá zpravidla 6 - 10 dní podle druhu vyráběného piva .

#### C) Dokvašování mladého piva pivovarskými kvasinkami, zrání [6, 18]

Dokvašování a zrání mladého piva se provádí v ležáckém sklepě, kde pivo při teplotách 1 až 3 °C velmi pozvolna dokváší, číří se, zraje a sytí se pod tlakem vznikajícího oxidu uhličitého v uzavřených ležáckých tancích. Doba ležení je závislá na typu piva. U běžných piv do koncentrace 10 % bývá 3 týdny, pro speciální exportní piva se zvyšuje až na několik měsíců. Během této doby dochází k řadě fyzikálně-chemických dějů, které vedou k vyžrání sensorického charakteru piva a k ustanovení rovnováhy v koloidním systému piva. Vznikající oxid uhličitý se nejprve hromadí v prostorách nad pivem a vytváří přetlak, posléze se začíná vázat na bílkovinné složky piva a tím vytváří jeho charakteristický říz.

#### D) Závěrečné úpravy a stáčení zralého piva do transportních nádob či obalů [18]

Dokonale vyžralé pivo se dále filtruje, případně pasterizuje či stabilizuje a nakonec se stáčí do transportních obalů. Používají se různé typy filtrace - nejčastěji se kombinují deskové filtry a naplavovací křemelinové filtry. Nejmodernější způsoby používají membránovou filtraci nebo reverzní osmózu, umožňující tak dokonalé pročištění piva, že není nutná následná pasterace. Vzhledem k finanční náročnosti membránové filtrace se však stále ještě často piva pasterují krátkým tepelným ohřevem (zpravidla při teplotě 62 °C). Principem pasterace je odstranění prekurzorů zákalů piva, především vysokomolekulárních dusíkatých složek, polyfenolů, kovových iontů a rozpuštěného kyslíku, která zničí mikroorganismy a zajistí dlouhou trvanlivost nápoje. Požaduje-li se trvanlivost ještě delší (např. 1 rok) pak se využívá chemických stabilizátorů, nejčastěji tanin, silikagel nebo nověji antioxidanty případně enzymy (papain aj.).

Stáčení piva se provádí již zcela automaticky buď do nerezových KEG sudů nebo skleněných lahví či hliníkových plechovek eventuálně do cisteren, ve kterých se pivo převáží do restaurací, pivnic, supermarketů apod.

### 2.2.2.3 Výroba nealkoholického piva [21]

Pro výrobu nealkoholického piva se používá poněkud modifikovaný výše popsaný způsob výroby, přičemž v současnosti existuje několik různých metod:

Nejužívanější metodou je tzv. výroba skokem, kdy se nejprve připraví nízkostupňová mladina o původním podílu 4% extraktu. Ta se vyrobí ve varně dvouřmutovým dekokčním způsobem a nechá se 1 až 1,5 dne zkvasit ve spilce, místo běžných 7-10 dní u výčepních piv. Poté se pivo přečerpá do ležáckého sklepa, kde se řídí jeho stupňovitost a objem alkoholu, jenž nesmí přesáhnout 0,5 obj. %.

Dalšími, méně využívanými metodami výroby nealkoholického piva jsou:

**Metoda použití speciálních kvasnic**, které nezksvašují sladový cukr a tudíž nevytváří v pivu alkohol.

**Metoda přidávání enzymů** - při rmutování se dodají do sladiny enzymy, které nevytváří tolik sladového cukru vytvořeného ze škrobu.

#### **Vymrazování alkoholu a metoda membránová filtrace**

Posledním způsobem je specialita Pivovaru Černá Hora, který nepoužívá žádnou z výše uvedených metod, ale vyrábí pivo tzv. technologií **membránové vakuové destilace**, kdy se ve vakuovém prostředí při sníženém tlaku alkohol odpařuje při teplotě 40-45 °C. Tím vzniká pivo s maximálním objemem do 0,04 obj. % alkoholu. Tato technologie je nejlepší pro zachování chuťových vlastností piva. Chuťově by se mělo pivo více podobat pivu tradičnímu alkoholickému. Navíc jako vedlejší produkt je získán destilát s chuťovými vjemy sladu a chmelu, který má 40 % alkoholu a je využíván k přípravě výrobku pod názvem Pivní rezná.

V zahraničí se na rozdíl od ČR vyrábí mnohem širší sortiment nápojů označovaných jako pivo. Jsou používány různé náhražky sladu případně chmele a to i v relativně vysokém podílu, jsou používány různé technologie výrazně odlišné od klasické pivovarské technologie, jsou využívány jiné mikroorganismy a postupy kvašení, případně jsou vyrobená piva ochucována různými ovocnými a bylinnými příchutěmi. To vše má za následek mnohem širší nabídku pro spotřebitele. V zemích s tradiční výrobou piv ležáckého typu, k nimž patří i Česká republika, se novinky tohoto druhu uplatňují jen velmi obtížně.

## 2.3 Pivo jako finální produkt

Z chemického hlediska je pivo směsí různých sloučenin: makromolekul – bílkovin, sacharidů, nukleových kyselin a dalších zajímavých látek, které zahrnují především polyfenolové sloučeniny, hořké látky, vitamíny, minerální látky a také alkohol. Chemické složení piva se významně mění v závislosti na kvalitě výchozích surovin a přísad, na stupni prokvašení i na podmínkách procesu.

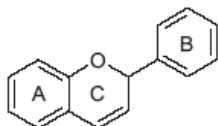
Nejvíce zastoupenou složkou je vždy voda, v níž jsou všechny ostatní složky, rozpuštěny. Vysoký obsah vody v pivu oproti jiným alkoholickým nápojům umožňuje účinně hasit žízeň a navíc se též podílí na tvorbě specifické chuti piva. Je zajímavé, že ačkoliv můžeme mít stejný

postup výroby i stejné kultury kvasinek, nikdy neuvaříme stejné pivo s jiným zdrojem vody. Voda pro výrobu piva proto bývá naprosto jedinečná, neopakovatelné chuti a maximální kvality, její obsah závisí na koncentraci původní mladiny a kolísá mezi 88 – 96 %.

### 2.3.1 Hlavní skupiny biologicky aktivních látek piva

#### 2.3.1.1 Polyfenolové látky (polyfenoly)

Pivo obsahuje široké spektrum polyfenolů a fenolických kyselin, které pocházejí z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových výrobků a které ovlivňují sensorické vlastnosti - chuť, vůni, pěnovost, barvu, ale i celkovou trvanlivost piva. Bývají řazeny k přirozeným antioxidantům, z nichž se v pivech vyskytují fenolické kyseliny zahrnující ortho- i para deriváty kyseliny benzoové (tj. kyselina salicylová, kyselina gentisová, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina protokatechinová, kyselina gallová, kyselina vanilinová a kyselina syringová) a deriváty kyseliny skořicové (tj. kyselina *p*-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina sinapová), dále lze v pivu nalézt kyselinu chlorogenovou a její deriváty, chinony i ubichinony a především různé flavonoidy – tj. deriváty heterocyklického flavanu, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů zahrnujících v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C6-C3-C6 a jejichž struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu *Obr. 4* [22].



*Obr. 4 – Flavan* [22]

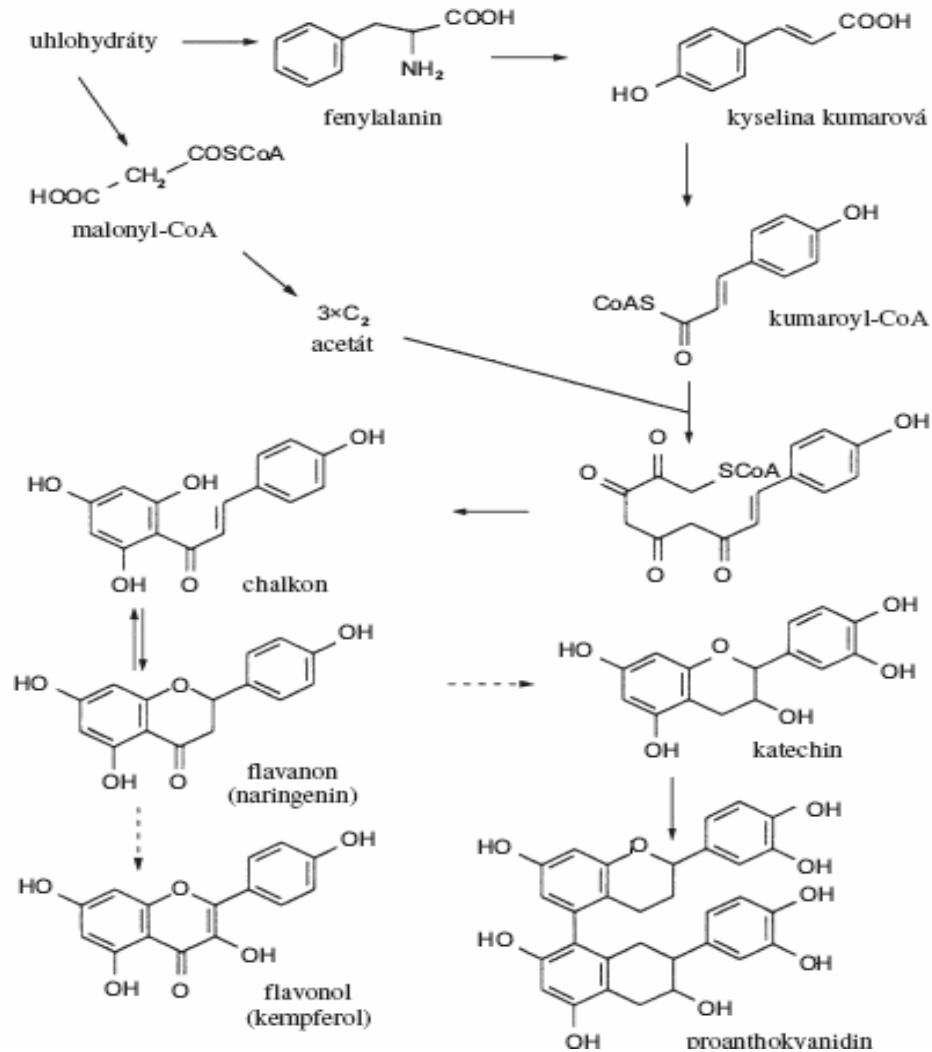
Podle stupně oxidace C<sub>3</sub> řetězce se rozeznává 7 základních struktur flavonoidů: katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny [22].

Ze strukturně příbuzných sloučenin (vesměs produktů biosyntézy a katabolismu flavonoidů), u kterých jsou kruhy A a B spojeny alifatickým C<sub>3</sub> řetězcem nebo řetězcem, který je částečně součástí furanového cyklu, se dále rozeznávají aurony, chalkony a dihydrochalkony.

Méně časté sloučeniny s kruhem B spojeným s pyranovým kruhem C v poloze C-3 se nazývají isoflavonoidy, pokud je vazba posunuta v poloze C-4, nazývají se příslušné sloučeniny neoflavonoidy.

Pivovarsky významnými flavonoidy jsou zejména chalkony (př. xanthohumol, xanthogalenol, 3'-geranylchalconaringenin), flavanony (př. isoxanthohumol, naringenin, eriodiktyol), flavonoly (př. morin, kvercetin, kaemferol), a proanthokyanogeny (př. delphinidin, pelargonidin, kyanidin) a jednoduché monomery flavanolu (př. (+)-katechin a (-)-epikatechin). Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthasou (*Obr. 5*). Flavanonová

struktura vzniká isomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následná oxidace vede k flavonolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavonolová polymerace může dále vést k proanthokyanogenům [23].



Obr. 5 – Schéma biosyntézy flavonoidů [22]

Velká část flavonoidů bývá navíc glykosylována, přičemž navázaný cukr může být glukosa, rhamnosa, méně často galaktosa, arabinosa, xylosa, glukuronová kyselina i další cukry.

V průběhu pivovarské technologie dochází k řadě chemických přeměn polyfenolových složek pocházejících z původních surovin, především v průběhu chmelovaru, kvašení, filtrace, a stabilizace koloidních vlastností piva. Jedná se o reakce hydrolytické, isomerační, kondenzační až polymerační a oxidoredukční. Hydrolytické reakce vedou obvykle ke štěpení glykosidů na aglykony a odpovídající sacharidické složky a výrazně se v kvalitě hotového piva neuplatňují, z isomeračních reakcí je typickou reakcí především přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol

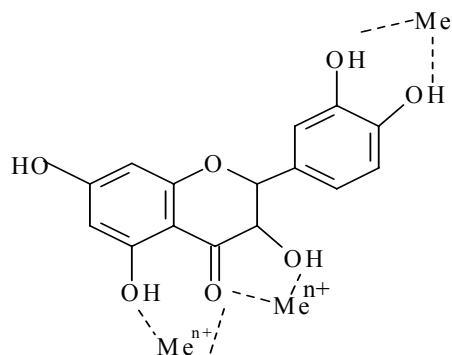
během chmelovaru. Kondenzační až polymerační reakce se uplatňují především ve smyslu tvorby výšemolekulárních celků s vysokou srážecí aktivitou vůči bílkovinám extraktu piva. Tím dochází k tvorbě polyfenol-bílkovinných komplexů, které za určitých podmínek mohou vypadávat z roztoku, a tím vytvářet koloidní zákaly. S oxidačně-redukčními procesy souvisí zejména problematika senzorické stability piva po naplnění do konzumních obalů, v nichž polyfenolové složky hrají důležitou roli. Působením světla, tepla, kovových iontů, mechanického pohybu a dalších faktorů jsou iniciovány reakce, vedoucí ke tvorbě volných radikálů způsobujících autooxidaci polyneenasycených lipidických složek extraktu piva. To má za následek tvorbu těkavých karbonylových sloučenin zodpovědných za nepříznivé chuťové změny. Ovšem právě polyfenoly a zejména flavanoidy jsou jako nejúčinnější přirozené antioxidanty piva tyto děje eliminují [24].

### Antioxidační účinky polyfenolů[25]

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům.

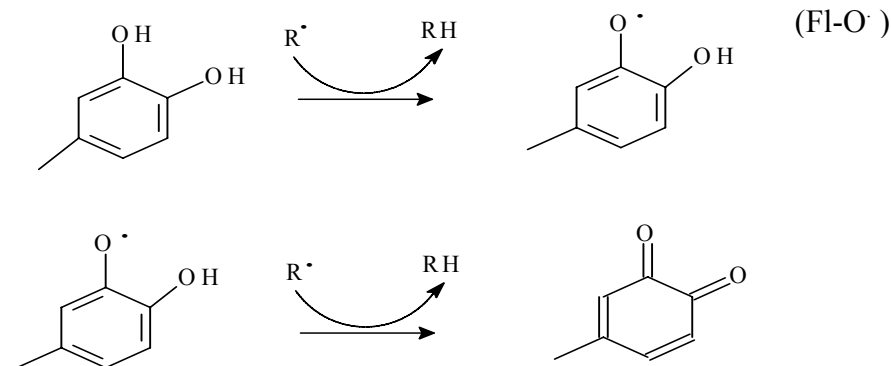
1.) Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidasu, proteinkinasu C) i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipoxygenasa, mikrosomální monooxygenasy, topoisomerasy a induktory apoptosy).

2.) Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem, např. při Fentonově reakci (*Obr. 6*).



*Obr. 6 - Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů*

3.) Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná (snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu). Látky s nízkou hodnotou redoxpotenciálu ( $< 0,75$  V) jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík (*Obr. 7*) a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál ( $\text{Fl-O}^\cdot$ ) nebo neradikálové chinoidní struktury. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve než reagují s dalšími buněčnými komponentami.



Obr. 7 - Oxidovatelnost polyfenolů [24]

Aktivita flavonoidů klesá v pořadí myricetin > kvercetin > rhamnetin > naringenin > katechin > 5,7-dihydroxy-3,4,5 -trimethoxyflavon > kempferol > flavon a vzrůstá s počtem hydroxylových skupin substituovaných na aromatickém kruhu, přítomnost hydroxylylu na C-3 ani jeho glykosylace účinnost nezvyšuje. Řada přírodních polyfenolových složek piva je dokonce silnějšími antioxidanty, než jsou prokázané antioxidačně účinné vitaminy C, E a provitamin  $\beta$ -karoten. Příkladem je hlavní prenylchalcon xanthohumol (inhibující oxidaci LDL cholesterolu) [24].

### 2.3.1.2 Proteiny [19, 26]

Mezi látky, které mají vliv na kvalitu piva řadíme též proteiny. Pivo obsahuje 3 - 5 g/l čistých bílkovin, přičemž 85% z těchto bílkovin pochází ze sladu a 15% z pivovarských kvasinek, aminokyselinový profil zahrnuje téměř všechny esenciální aminokyseliny. Obsah aminokyselin se pohybuje v mezích 300 - 500 mg/l. Technologický význam těchto látek spočívá v ovlivnění možnosti vzniku koloidních zákalů, formování a stability pěny, a navíc podporují plnost chuti piva.

Koloidní zákal se obvykle dělí na chladové, které se z piva vylučují při jeho ochlazení na 0 °C, ale při zvýšení teploty na 20 °C se rozpustí, a na trvalé, které jsou v podstatě druhou fází chladového zákalu, kdy přirozeným stárnutím dochází ke stálému zvětšování koloidních částic, které jsou již nerozpustné a které se z piva nevratně vyloučí. Mezi zákalotvorné proteiny patří především hordeiny vyznačující se vysokým obsahem glutaminu a prolinu.

S ohledem na tvorbu zákalů lze pivovarské proteiny rozdělit pomocí srážení síranem amonným do čtyř frakcí:

- 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

Mnohem významnější a častější klasifikace proteinů piva je ovšem rozdělení s ohledem na pěnovost a stabilitu pěny piva. Význam tohoto dělení spočívá především v tom, že bohatá, hustá a dlouhotrvající pěna patří mezi důležité kvalitativní i kvantitativní znaky piva a navíc je jedním z prvních vjemů vnímaných spotřebitelem.

Významné bílkoviny z hlediska pěnovosti piva mají hydrofobní strukturu, která usnadňuje přechod bílkovin do pěny a umožňuje v mezifázovém rozhraní orientaci bílkoviny do bubliny plynu. Podle rostoucí hydrofobicity a na základě jejich přesné specifické hmotnosti, byly proteiny rozděleny na dvě významné skupiny: **HMW (High Molecular Weight)** a **LMW (Low Molecular Weight) proteiny**

Do HMW frakce jsou řazeny bílkoviny v rozsahu molekulových hmotností 35 a. 50 kDa, do frakce LMW bílkoviny s molekulovou hmotností 5 až 15 kDa. HMW frakce obsahuje převážně protein Z, LMW frakci tvoří LTP1 (Lipid Transfer Protein1) a směs hordeinových a glutelinových fragmentů– LMW i HMW bílkoviny pochází především ze sladu.

- *Protein Z* - představuje 10 až 25 % všech nedialyzovatelných bílkovin piva a je přibližně z jedné třetiny glykosylován. Je to ječná albuminová bílkovina o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa, která patří do HMW frakce, mezi ječné serpiny (Serine Proteinase Inhibitors) a je tvořena několika homologními proteiny.

- *Lipid Transfer Protein (LTP1)* je polypeptid – intracelulární přenašeč lipidů, který je na základě své hmotnosti 9660 Da řazen do LMW frakce. Jedná se o albuminovou bílkovinu, u které byla prokázána schopnost inhibovat sladové cysteinové endoproteasy.

- V ječmeni a sladu jsou dále obsaženy **bílkoviny vázající lipidy (Lipid Binding Proteins – LBP)**, bílkoviny o hmotnosti přibližně 13 kDa. Jsou vázané na buněčné membráně a extrahovatelné detergenty. Jejich společnou vlastností je inhibice destabilizačních vlivů lipidů

- **Hordeiny** – hlavní zásobní bílkoviny ječmene – se skládají z polymorfní směsi několika složek oddělitelných např. elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Základní skupiny jsou značeny *B*, *C*, *D* a  $\gamma$  a představují vysokomolekulární (> 51 kDa), středněmolekulární (29 až 51 kDa) a nízkomolekulární (< 29 kDa) látky. Významná skupina hordeinových derivátů má hmotnost nižší než 5 kDa. V negativním smyslu se podílí na vzniku koloidních zákalů piva.

Pouze malá skupina bílkovin hotového piva má vyšší molekulovou hmotnost než 50 kDa – jejich původ je pravděpodobně v použitých kvasnicích. Společnou vlastností uvedených složek je jejich stabilita v průběhu sladařského a pivovarského procesu a odolnost především k vyšším teplotám, extrémním hodnotám pH a k proteolýze.

Bílkoviny jsou v průběhu výrobního procesu štěpeny různou měrou podle struktury, konfigurace a obsahu nebílkovinných částí. Některé typy bílkovin, obsažených v pivovarských surovinách, do piva vůbec nepřečází. Je to způsobeno jejich vlastní nerozpustností ve vodě a rovněž odolností k štěpné aktivitě enzymů. Mezi tyto látky patří např. gluteliny, které odcházejí z výroby s mlátem. Během sladování jsou bílkoviny využívány k výstavbě základů rostlinných těl – ke tvorbě kořínků a stěelky zrna. Proto je obsah ve sladu nižší přibližně o 0,3 % oproti obsahu bílkovin v ječmeni. Do rozpustné formy je převedeno během klíčení asi 35 až 40 % bílkovin. Působením hydrolytických enzymů (peptidas) vznikají látky s nižší až velmi nízkou molekulovou hmotností ve srovnání s původními bílkovinami.

### 2.3.1.3 Sacharidické složky (cukry) piva [17]

Celkový obsah sacharidů v pivu se pohybuje okolo 28 g/l a představuje jednak hlavní energetickou složku piva (až 60%) a jednak hlavní součást extraktu. Jednotlivé zastoupení sacharidů - Tab. 1.

Nejdůležitějšími cukry jsou dextriny, neboť ty, společně s alkoholem, zvyšují disperzi piva v zažívacím traktu lidského organismu, což umožňuje vysoce rychlou a účinnou látkovou výměnu. V menším množství jsou přítomny některé monosacharidy a oligosacharidy. Nejvíce zastoupené jsou zkvasitelné cukry maltosa a maltotriosa a nezakvasitelné pentosy. Gumovité látky představované hlavně pentosany a  $\beta$ -glukany zvyšují viskozitu piva.

Tab. 1: Sacharidy piva

<i>Sacharidy piva</i>	<i>c [g/l]</i>	<i>Sacharidy piva</i>	<i>c [g/l]</i>
Glukosa	0,1–0,5	Isomaltotriosa	0,4–1
Fruktosa	0,1–0,2	Dextriny	20–30
Sacharosa	0–0,1	$\beta$ -glukany	150–400
Maltosa	1,5–5	Pentosany	0,2–0,5
Maltotriosa	1–3	Dextriny	20–30

V některých zemích, získává pivo – obzvláště nízkoalkoholické oblibu jako nápoj pro sportovce, a to jednak díky své vhodné osmolaritě (jde ve své podstatě o isotonický nápoj) a jednak poskytuje tzv. „rychlé kalorie“, a je proto vhodné k rychlému doplnění energie po sportovním výkonu .

### 2.3.1.4 Hořké chmelové látky [17,18]

Pivo je jediný nápoj, který obsahuje hořké chmelové látky (až 40 mg/l), které zahrnují řadu velmi si podobných složitých organických sloučenin, které snadno podléhají oxidaci i dalším chemickým přeměnám. Nejúčinnější z nich je skupina  **$\alpha$ -hořkých kyselin**, skládající se převážně z humulonu, kohumulonu adhumulonu. Méně účinné jsou  **$\beta$ -hořké kyseliny** lupulon, kolupulon, adlupulon tvořící nespecifické měkké pryskyřice (humulinony, luputriony) a tvrdé pryskyřice (humulinové a hulupinové kyseliny). Chmelové  $\alpha$ -hořké kyseliny jsou jen nepatrně rozpustné ve vodě, a tedy i v pivu. Za varu v slabě kyselém vodném prostředí, z větší části izomerují za vzniku *cis*- a *trans-iso*- $\alpha$ -hořkých kyselin, které jsou již rozpustnější a vykazují silnou organoleptickou hořkost. Obdobná reakce přeměny  $\beta$ -hořkých kyselin probíhá jen v nepatrné míře, a proto jejich příspěvek k hořkosti piv je mnohem menší.

V závislosti na zastoupení hořkých látek vykazuje hořkost piva různé chuťové odstíny. Piva vařená z chmelů a chmelových výrobků s vyšším obsahem  $\beta$ -hořkých kyselin vykazují obvykle jemnější a méně drsnou hořkost než piva obsahující pouze nebo převážně jen iso- $\alpha$ -hořké kyseliny. Kvalitu hořkosti ovlivňuje dále též podíl kohumulonu v  $\alpha$ -hořkých kyselinách. Vysoký obsah kohumulonu koreluje s nízkým obsahem  $\beta$ -kyselin a naopak. Piva vyrobená z chmelů s nízkým obsahem kohumulonu mají mírnější a příjemnější hořkost než piva s vysokým obsahem kohumulonu. Kromě vytváření sensorické hořkosti jsou hořké látky důležité i pro vznik a stabilitu pивní pěny a na samotného spotřebitele mohou mít několik fyziologických efektů.

Jedná se především o sedativní až narkotický a bakteriostatický účinek a o podporu sekrece žluči, jež příznivě ovlivňuje trávicí proces včetně zvýšení chuti k jídlu [17].

Humulon by mohl být díky svým vlastnostem vhodný i pro terapii leukémie. V kombinaci s aktivní formou vitamínu D je dokonce ještě účinnější než vitamin D samotný a je proto vhodný i jako prevence osteoporózy.

### **2.3.1.5 Ethanol**

Ethanol je nejvýznačnější těkavou složkou v pivu. Jeho množství závisí na koncentraci původní mladiny a stupni prokvašení a podílí se zejména na plnosti chuti piva. Nejnovější výzkumy navíc potvrzují, že rozumná konzumace alkoholu (pro zdravou dospělou populaci 20–40 g alkoholu za den, tj. 0,5–1 l piva denně u mužů, u žen 0,3–0,6 l) pozitivně ovlivňuje fyzickou a duševní kondici člověka. Ve srovnání s abstinenty jsou ti, kteří dodržují tuto relativně bezpečnou dávku, méně náchylní např. na kardiovaskulární onemocnění, neboť u nich dochází ke zvýšení sérové koncentrace HDL cholesterolu, což vede k poklesu krevního tlaku v důsledku rozšíření cév [26].

### **2.3.1.6 CO<sub>2</sub>**

Oxid uhličitý je z nutričního hlediska bezcennou látkou. Dosažení optimálního obsahu a zejména vázání rozpuštěného oxidu uhličitého v pivu má však zásadní vliv na senzorycké vlastnosti piva, jeho trvanlivost a správný říz při stáčení. Z fyziologického hlediska má oxid uhličitý vliv především na prokrvení ústní sliznice, zvýšení tvorby slin, povzbuzení produkce kyseliny chlorovodíkové v žaludeční sliznici a podporu vylučování látek odváděných močí ledvinami. Část požadovaného množství oxidu uhličitého získá pivo v procesu hlavního kvašení a část při dokvašování.

Říz piva patří k jeho významným a velmi obtížně definovatelným vlastnostem, neboť je výsledkem působení různých technologických, surovinových a zpracovatelských faktorů. Podle definice se řízem piva rozumí štiplavý pocit, vyvolaný tímto nápojem v ústech a všeobecně se dává do souvislosti s nasycením piva oxidem uhličitým. Říz piva má výrazný vliv na oblibu piva a tím i na jeho konzumaci. Uplatňuje se nejen při uhašení fyziologické žízně, ale zdůrazňuje u něho i pocit osvěžení. Přispívá bezesporu k souboru vlastností dobrého piva, které mají vybízet k dalšímu napití [26].

### **2.3.1.7 Vitaminy, provitaminy, minerální a stopové prvky**

**Fytoestrogeny** jsou přírodní látky, které významně snižují např. výskyt rakoviny prsu, tlustého střeva, dělohy či prostaty. V lidské stravě se však vyskytují jen velmi zřídka a je snahou jejich denní příjem zvýšit. Je proto velmi příznivé, že v pivu se fytoestrogeny vyskytují (př. 8-prenylnaringenin, jež je považován za jeden z nejúčinnějších fytoestrogenů vůbec).

Další předností piva oproti např. vínům a jiným alkoholickým nápojům je, že svým příznivým a vyváženým obsahem **vitamínů** může pokrýt značnou část doporučené denní dávky. Pivo je jediným nápojem, který obsahuje významná množství vitamínů a leckdy bývá označován jako vitaminový koktejl. Zastoupeny jsou především *inositol* (v množství 60 mg/l), *cholin* (v množství 100 - 300 mg/l) a všechny vitaminy skupiny B – thiamin (vitamín B1 v množství 0,04 mg/l), riboflavin (vitamín B2 v množství 0,2 mg/l), niacin, kyselina nikotinová (vitamín B3 v množství

6 mg/l), pyridoxin (vitamín B6 v množství 0,04 mg/l), kyselinu pantotenovou (B5 v množství 1 mg/l), kobalamin (B12 v množství 100 mg/l), *kyselinu folovou (listovou* v množství 0,1 mg/l), a *biotin* (vitamin H v množství 0,01 mg/l). Jeden litr piva plzeňského typu tak kryje 25 až 50 % denní potřeby riboflavinu, niacinu, pyridoxinu, kyseliny folové, kyseliny pantothenové, biotinu a kobalaminu a 3 % denní potřeby thiaminu. Tyto hodnoty však neplatí obecně a jsou jedním z důkazů kvality a jedinečnosti českého piva.

Nezanedbatelný je i obsah některých **minerálů a stopových prvků**, které pocházejí většinou ze sladu. Velmi důležitý je např. obsah *křemíku* (vzniklého při rmutování) ve fyziologicky využitelném stavu. Křemík v pivu brzdí absorpci nežádoucího hliníku v těle, který je příčinou Alzheimerovy choroby a mimo to působí proti ateroskleróze a osteoartritidě. Z dalších v pivu obsažených prvků jsou významnými především zinek, fluor a měď a obzvláště *draslík* a *hořčík*, které jsou nezbytné ke správné funkci všech orgánů v těle. Příznivý je též poměr *Ca : Mg (1 : 3)*, který působí proti vzniku žlučových a močových kamenů. *Zinek* přítomný v pivu je důležitý pro lidský organismus především z hlediska tvorby inzulínu, a odolnosti proti kožním chorobám, *fluor* má pozitivní vliv proti vzniku zubního kazu, *měď* pomáhá předcházet ischemické chorobě srdeční.

Doposud bylo v pivu nalezeno přes 2000 sloučenin. V současném stavu poznání je však třeba připustit, že ještě mohou existovat látky, které dosud objeveny nebyly, a přesto mají velký vliv na pozitivní zdravotní účinky piva [6, 26].

## 2.4 Specifika složení a technologie českého piva

Historický vývoj českého pivovarství, kvalita českých surovin i pracovitost a odbornost českých sládků má za následek, že chuť českého piva je dnes poněkud odlišná než chuť zahraničních piv. České pivo je mnohem voňavější a pitelnější než zahraniční piva, což lze dokázat i při chemickém rozboru piv. Již na první pohled i laik pozná, že české pivo má poněkud tmavší barvu. Zásadním rozdílem oproti ostatním druhům piva je přítomnost tzv. neprokvašeného extraktu – sacharidických složek, které dodávají pivu plnost a spolu s nasycením CO<sub>2</sub> i chuť k dalšímu doušku [27].

V souvislosti s pivem typicky českým je snahou najít možnosti, jak pivo co nepřesněji charakterizovat a jak nejlépe popsat způsob jeho výroby i oblasti, ve kterých se produkují jedinečné suroviny nezbytné pro výrobu. Nejde jen o to jasně a přesně definovat suroviny, včetně místa jejich původu a způsob výroby, který garantuje vysokou kvalitu a charakteristické vlastnosti českého piva. Ale také o to, že všechny faktory dohromady vytvářejí podmínky, které české pivo chrání a zamezují jeho napodobování.

Označení České pivo zároveň představuje příležitost pro pivovary, které vymezené podmínky respektují, uspět na trhu s tak jedinečným produktem, jakým naše pivo nepochybně je. Rozlišitelnost Českého piva vyplývá především ze skutečnosti, že pivu dominuje slad a chmel. Je přijatelná pouze slabá příchut' pasterizace, kvasnic či esterů, cizí vůně či příchutě nejsou přípustné. Pivo má střední až silný říz s pomalým uvolňováním oxidu uhličitého. Podobně i plnost je střední až vysoká, zejména díky obsahu nezakvašených zbytků extraktu, charakteristických rozdílem mezi zdánlivým a dosažitelným prokvašením. Nižší míra prokvašení znamená rovněž nižší obsah alkoholu. Velmi důležitou vlastností Českého piva je jeho hořkost.

Míra hořkosti piva je střední až vyšší, s mírnou až lehkou trpkostí, která déle odeznívá. Hořkost zůstává v ústech déle a déle tedy působí i na chuťové buňky. Vyšší míra hořkosti rovněž podporuje proces trávení.

Světlé pivo (světlý ležák, světlé výčepní pivo a lehké pivo) je se slabým až středním aroma světlého sladu a chmele. Pivo má zlatou barvu střední až vyšší intenzity, je jiskrné a po nalití do sklenice tvoří kompaktní bílou pěnu. Tmavé pivo (tmavý ležák a tmavé výčepní pivo) má výrazné aroma tmavého a barevného sladu. Má střední říz s charakteristickou silnou plností způsobenou podstatným rozdílem mezi zdánlivým a dosažitelným prokvašením a přítomností nezkvasitelných substancí v surovinách, z nichž se pivo vaří. Charakter hořkosti je ovlivněn vysokou plností piva. Z druhotných chutí a vůní jsou přípustné pouze karamelová a nasládlá.

Hranice oblastí produkce Českého piva jsou:

— na jihozápadě Chebská pánev, Český les, Šumava, Blanský les a podhůří Novohradských hor,

— na jihu Třeboňská pánev, jižní okraj Českomoravské vrchoviny a řeky Dyje a Morava za Hodonínem,

— jihovýchodní hranici tvoří západní a severní okraj oblasti chráněné Bílými Karpatami, východní hranici západní, severní a jihovýchodní okraj oblasti chráněné Beskydami,

— na západě je daná oblast vymezena řekou Ohře, Mosteckou pánví a řekou Labe po Děčín, severozápadní hranice řekou Ploučnice a Kamenice a Lužickými horami,

— severní hranici tvoří Liberecká pánev, jižní svahy Krkonoš, Broumovské hory a jižní svahy Orlických hor a severovýchodní hranici podhůří Kralického Sněžníku, Rychlebské hory a Zlatohorská vrchovina, řeka Opavice k soutoku s Opavou, Opava k soutoku s Odrou, Odra k soutoku s Olší, Olše k soutoku s Lomnou a Lomná až po oblast chráněnou Beskydami.

Suroviny pro České pivo jsou rovněž přesně specifikovány [27].

**Slad** –v 99 % se v českých zemích vyrábí výhradně světlý druh sladu, zvaný též „plzeňský slad“, vyrobený z jarního dvouřadého ječmene, přičemž konkrétní odrůdy pro výrobu tohoto sladu jsou odvozeny od kultivovaných odrůd schválených Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí v Brně, čímž je zaručen pravý chuťový profil Českého piva.

**Chmel** - používají se zejména odrůdy pěstované ve vybraných oblastech těchto určených území: 1) Žatecká oblast, 2) Ústěcká oblast, 3) Tršická oblast.

Chmely vyšlechtěné v první polovině minulého století v žatecké oblasti se staly na dlouhé období světovým standardem nejvyšší kvality. Jejich hlavní předností bylo a stále je vynikající chmelové aroma bez jakýchkoliv vedlejších vůní a pachů. Mnoho v zahraničí úspěšných odrůd odvozuje svůj původ od originálních žateckých krajových odrůd, neboť ten je specifický a liší se od chmele pěstovaného ve světě zejména svým poměrem  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin. Zatímco u běžně pěstovaných odrůd tento poměr obvykle činí 2,5:1, poměr u odrůd pěstovaných v této oblasti činí v průměru 1:1,5. Další charakteristickou vlastností odlišnou od jiných druhů chmele je obsah  $\beta$ -farnesenu, jehož obsah činí 14–20 % všech esenciálních olejů. Odrůdy chmele kultivované a pěstované na daném území a obecně všechny odrůdy chmele pro výrobu Českého piva musejí být schvalovány kontrolními orgány a doporučeny Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským a minimální množství českého chmele nebo produktů z něj vyrobených musí činit 30 % u světlých ležáků a nejméně 15 % u ostatních variant piva.

**Voda** – pro výrobu Českého piva se používá voda z místních zdrojů. Tvrdost vody používané pro vaření českého piva je hodnocena jako měkká až polotvrdá.

**Pivovarské kvasnice** – kmeny kvasinek využívané pro tzv. spodní kvašení (*Saccharomyces cerevisiae subsp. uvarum*), které jsou vhodné pro výrobu Českého piva a které zajišťují rozdíl mezi zdánlivým a dosažitelným prokvašením. Nejčastěji jsou používány kmeny č. 2, 95, 96, které jsou uloženy ve Sbírce reprodukčních kmenů pivovarských kvasinek Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. pod registračním číslem RIBM 655, a jsou dostupné všem producentům Českého piva.

Vlastní proces rmutování probíhá dekokčním jedno až třímotovým způsobem; nepoužívá se infuzní způsob. Kvašení probíhá při maximální teplotě do 14 °C a tento technologický proces je standardně oddělen od druhého kvašení, jedná se tedy o dvoufázové kvašení a celá technologie výroby je pod stálou kontrolou [27, 28].

## **2.5 Metody stanovení aktivních látek piva (proteiny, polyfenoly) – přehled**

### **2.5.1 Separace fenolických látek-základní instrumentální metody**

#### **2.5.1.1 Plynová chromatografie (Gas Chromatography-GC)**

Plynová chromatografie byla používána pro analýzu flavonoidů na začátku šedesátých let 20. století. Deriváty flavonoidů byly separovány na koloně naplněné SE-30 silikonovým polymerem, následovala tepelně-vodivostní detekce. Frakce byly odebírány pro IR a UV-VIS spektroskopii. Ačkoliv GC není již tak hojně využívána k analýze polyfenolů, její význam v poslední době roste díky rozvoji vysokoteplotní chromatografie a zavedení vylepšených derivatizačních procedur. Při derivatizaci flavonoidů většinou dochází ke vzniku trimethylsilyletherových (TMS) derivátů. Methylace flavonoidů s více než jednou hydroxylovou skupinou může dát vzniknout několika derivátům, které komplikují kvantifikaci. Současné využití plynové chromatografie v analýze je zaměřeno na jejich antioxidační aktivitu, metabolismus a taxonomii. Flavonoidy jsou detekovány hmotnostním spektrometrem s elektronovou ionizací v režimu výběrového monitorování iontů. Molekulární ion  $[M+H]^+$  a fragmenty vzniklé odštěpením methylových nebo karbonylových skupin, popř. vzniklé retro Diels-Alderovou reakcí (2.5.2.2) umožňují detekci [29].

#### **2.5.1.2 Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis-CE)**

Separace metodou CE je založena na odlišnosti elektroforetických mobilit iontů v elektroforetickém médiu uvnitř malé kapiláry. Většina studií využívajících kapilární elektroforézu pro analýzu flavonoidů se vztahuje k výzkumu přírodních produktů, zahrnují analýzu rostlin, zeleniny, bylin a rostlinných a zeleninových produktů. Hlavní typy kapilární elektroforézy jsou kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická elektroforéza (MEKC) s typickým fosfátovým a borátovým pufrům. Kapiláry mají vnitřní průměr 50-100  $\mu\text{m}$ , napětí je 10-30 kV a objem nástřiku se pohybuje v rozmezí 10-50 nl. Na kapilární elektroforézu obvykle navazují UV-VIS, fluorescenční, ED a MS detektory [29].

### 2.5.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě (*Thin Layer Chromatography-TLC*)

V současné době stále hraje chromatografie na tenké vrstvě v analýze flavonoidů významnou roli. TLC je mimořádně výhodná pro rychlé rozdělení rostlinných a léčivých extraktů před detailní analýzou instrumentálními technikami (především LC/UV-VIS). Ve většině případů je využíván jako stacionární fáze SiO<sub>2</sub>. Detekce probíhá v rozmezí 350-365 nm nebo 250-260 nm, je možné využít i měření optické hustoty při stejné vlnové délce [29].

### 2.5.1.4 Separace flavonoidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography-HPLC*)

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

#### Stacionární fáze

Nejdéle známé jsou kolony tvořené jednotlivými částicemi stacionární fáze pravidelného tvaru o velikosti v řádech mikrometrů. Novější monolitické stacionární fáze umožňují kompaktnější zaplnění kolony. Zcela nový typ stacionární fáze představují vtištěné polymery (imprinted polymers), které jsou obdobou monolitických kolon, ale navíc je do náplně zabudován obtisk analytu, jenž má být oddělen. V kapalinové chromatografii jsou využívány pro separaci složek vzorku různé síly a efekty, např. adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, biospecifické interakce nebo síťový efekt. Většinou se uplatňuje více principů separace najednou. Klasické uspořádání adsorpční chromatografie s polární stacionární a nepolární mobilní fází se nazývá chromatografie s normálními fázemi (normal-phase chromatography, NP). Dnes je však mnohem více využíván obrácený tzv. reverzní typ chromatografie (reversed-phase chromatography, RP) [30, 31].

#### Mobilní fáze

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale významně se podílí na separačním procesu. Složení mobilní fáze lze ovlivnit změnou v ní obsažených rozpouštědel, pH, iontové síly, párovými činidly atd. Mobilní fáze je charakterizována především polaritou a selektivitou. Vlastnosti mobilní fáze jsou důležité z hlediska separace i detekce. Mobilní fáze by měla dávat v detektoru minimální signál, a tím umožňovat co nejcitlivější detekci solutů [30].

#### HPLC a flavonoidy - separace a detekce

Separace flavonoidů se obvykle provádí pomocí *RP-HPLC*. Nejčastěji používanou stacionární fází je chemicky vázaná oktanová a oktadecylová fáze. Nicméně využívají se také silikagel, Sephadex a polyamidy. Gradientová eluce je obvykle prováděna binárním systémem rozpouštědel, a to vodnou fází s přísadkou kyseliny octové a mravenčí a vedle nich také methanolu nebo acetonitrilu, které představují organické modifikátory. Fosfátové pufrů se neuplatňují tak často jako dřív, hlavně kvůli kontaminaci iontového zdroje v případě detekce hmotnostní spektrometrií. Kapalinová chromatografie většinou probíhá při pokojové teplotě, ale

někdy se doporučuje zvýšit teplotu až ke 40 °C, aby se dosáhlo zkrácení doby trvání analýzy a protože kolony, u kterých se udržuje stálá teplota, poskytují opakující se eluční časy [29, 32].

Všechny aglykony polyfenolů obsahují alespoň jedno aromatické jádro, proto dobře absorbují UV záření. Detekce flavonoidů se obvykle provádí při 250, 265, 290, 350, 370 a 400 nm, v přítomnosti anthokyanidinů s přidanou vlnovou délkou v rozsahu 500 - 525 nm. Jednoduché substituenty jako methyl, methoxy- a nedisociované hydroxylové skupiny zpravidla způsobují jen zanedbatelné změny v pozici absorpčního maxima. Konjugáty flavonoidů absorbují v uvedených vlnových délkách, jenže většina glykosidů a acylových zbytků jsou rovněž slabé chromofory, a proto nelze získat spolehlivé chromatogramy prostřednictvím *DAD* a *UV* detekce [29].

Analýza flavonoidů *fluorescenční detekcí* je využívána jen zřídka, jelikož flavonoidy jen omezeně vykazují přirozenou fluorescenci (např. izoflavony, flavonoidy s OH skupinou na třetím uhlíku flavanového skeletu a methoxylované flavony). Vlastnosti funkčních skupin a jejich poloha rozhodují, zda jednotlivé flavonoidy fluoreskují či nikoliv. Ze všech izoflavonů vykazují silnou přirozenou fluorescenci jen ty, které nemají navázanou hydroxylovou skupinu na pátém uhlíku flavanového skeletu. U těchto sloučenin lze pak využít detekce emisního záření o dlouhých vlnových délkách. Také flavonoly přirozeně fluoreskují díky 3-OH skupině, která je zapojena do intramolekulárního přenosu protonu v excitovaném stavu. Ten pak způsobí dvojitou emisi závislou na rozpouštědle. Kombinace fluorescenční a UV detekce tedy poskytuje možnost rozlišit fluoreskující a nefluoreskující sloučeniny, které se eluují současně [29].

Protože je většina flavonoidů elektroaktivní díky přítomnosti skupin fenolických látek, může být využita také elektrochemická detekce, i když tato metoda není tak citlivá jako fluorescenční detekce [29].

Propojení kapalinové chromatografie se spektroskopickými technikami jako je UV-VIS, MS, nebo NMR poskytuje efektivní vybavení pro rychlý sběr dat a objasnění struktury. LC/DAD je účinná technika pro rychlé rozdělení směsi, nicméně data získaná na základě absorpce světla jsou nedostatečné pro objasnění struktury. LC/UV-VIS/MS je rychlá technika umožňující krátké vystavení analytu světlu a vzduchu, což limituje jeho degradaci. Dnes je nejvýznamnější technikou pro identifikaci cílového flavonoidu a strukturní charakterizaci neznámých členů této třídy sloučenin LC-MS/MS. Tandemová hmotnostní spektrometrie z velké části nahradila operace jednostupňové hmotnostní spektrometrie díky mnohem lepší selektivitě a širšímu rozsahu získaných informací. Ve studiích zabývajících se charakterizací neznámých sloučenin bývají aplikovány různé obměny LC-MS/MS vedle LC-DAD UV pro rychlou identifikaci tříd [33].

Také LC-NMR se často ukáže jako nezbytné vybavení k získání jednoznačných strukturních charakterizací. V oblasti výzkumu přírodních produktů neustále stoupá význam on-line LC-NMR. Nevýhodnou jsou ale nízká citlivost, nákladná instrumentace a dlouhé trvání experimentu. Pro komplexní objasnění struktury nových přírodních produktů je nezbytná přípravná izolace, protože v LC-NMR je obvykle část spektrální oblasti  $^1\text{H}$  ztracena a navíc neposkytuje informace o  $^{13}\text{C}$ . Je však třeba zdůraznit, že NMR detekce je obzvláště účinná pro určení odlišnosti izomerů, konfigurace cukrů a substitučního modelu na systému aromatických jader [29].

## 2.5.2 Metoda HPLC/MS v analýze flavonoidů

Jelikož polyfenolické sloučeniny tvoří skupinu mírně polárních molekul, lze pro jejich analýzu využít kapalinovou chromatografii na reversní fázi s následnou hmotnostní detekcí a elektrosprejem jako iontovým zdrojem. Užití LC/MS v analýze potravin poskytuje důležité informace o struktuře cílové nebo neznámé látky přímo v matricích. V některých případech připojené techniky mohou poskytnout úplnou on-line strukturní analýzu, která není časově náročná [34, 35].



Obr. 8 - LC/MS systém

### 2.5.2.1 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí převedením na kladné nebo záporné ionty. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami, zejména s plynovou a kapalinovou chromatografií, umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složitější matrici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [30].

#### Iontový zdroj a typy ionizačních technik

Nezbytným předpokladem u hmotnostní spektrometrie je, že analyzovaná látka nese náboj. Energetická náročnost ionizace závisí na typu analyzované látky. Pro většinu organických látek se hodnota prahové ionizační energie pohybuje mezi 7-16 eV, přičemž energie přesahující tuto prahovou energii vede k převedení látky do ionizovaného stavu [30].

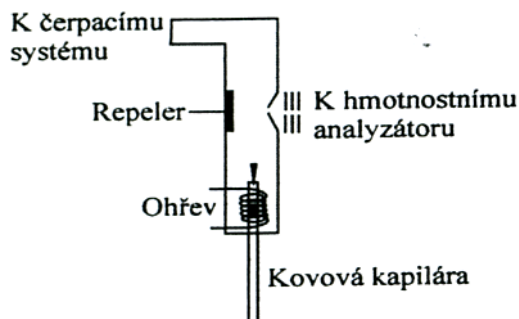
Výtěžek ionizace většiny používaných ionizačních technik se pohybuje kolem 0,01 %, z čehož vyplývá, že proces ionizace výrazně omezuje citlivost měření a dosažitelnou mez detekce metody. Podle množství dodané energie dělíme ionizační techniky na tzv. měkké, při nichž je množství nadbytečné energie malé a pravděpodobnost fragmentace nízká, a na tvrdé, kdy dodaná energie postačuje k rozsáhlé fragmentaci primárně vzniklého iontu. Nejběžnější jsou techniky ionizace v plynné fázi. Analyzovaná látka je předem odpařena do vakua, nutným předpokladem je její dostatečná těkavost [30].

○ *Tvrde ionizační techniky*

Ionizace elektronem (electron ionization, EI) je tvrdá ionizační technika v plynné fázi. Jedná se v současné době o nejlépe propracovaný způsob ionizace. Spolu s chemickou ionizací (chemical ionization, CI) jsou používány běžně v kombinaci s plynovou chromatografií. Vzhledem k obtížnému převedení do plynné fáze jsou flavonoidy běžně analyzovány metodou HPLC/MS, pro kterou byly vyvinuty metody ionizace vzorku za atmosférického tlaku [30].

○ *Sprejové ionizační techniky-měkké ionizační techniky*

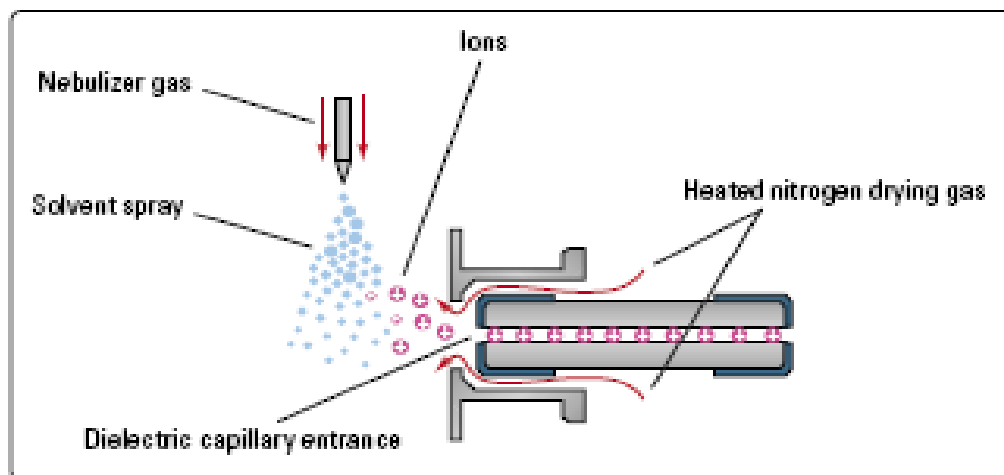
Sprejové ionizační techniky řadíme mezi měkké ionizační techniky v kapalně fázi. Jsou vhodné pro kombinaci s kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou. Patří mezi ně termosprej (thermospray, TSI, *Obr. 9*), elektrosprej (elektrospray, ESI), fast atom bombarding, chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionisation, APPI). Největší význam při stanovení fenolických látek mají chemická ionizace za atmosférického tlaku a elektrosprejová ionizace [31].



*Obr. 9 - Schéma iontového zdroje – termospreje [30]*

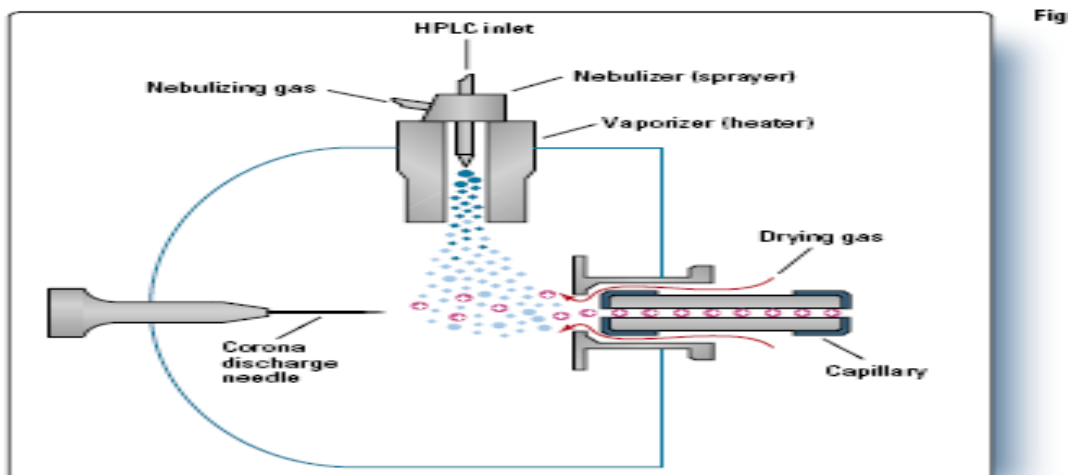
V současnosti nejčastěji používaným iontovým zdrojem pro kombinaci LC/MS je elektrosprej (*Obr. 10*). K rozprášení kapalně fáze přivedené do kovové kapiláry dochází vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím této kapiláry, na níž je přivedeno vysoké napětí, a protielektrodou, která je uzemněna. Napětí na kovové kapiláře dosahuje hodnot 2-5 kV. Špička kapiláry elektrospreje je úzká, a proto intenzita elektrického pole ve vzduchu na špičce kapiláry je velmi vysoká. Vznikají tak drobné kapičky kapalně fáze s vysokou hustotou povrchového náboje. Ty jsou rychle vysušeny protiproudem horkého inertního plynu, nejčastěji dusíku o teplotě asi 200 °C. Disociované látky mechanismem iontového vypařování přecházejí přímo do fáze plynné a vzniklé ionty jsou vedeny vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního

analyzátoru. V procesu ionizace mohou vznikat kladně i záporně nabitě ionty v závislosti na polaritě napětí vloženého na protielektrodu. Ionizace elektrosprejem poskytuje převážně molekulární ionty. Pro identifikaci glykosidů flavonolů a derivátů katechinu je nezbytné spojení s MS/MS, čímž se získají informace o struktuře molekul, které jsou srovnatelné s informacemi nabytými pomocí APCI [30, 36, 37].



*Obr. 10 - Hlavní děje probíhající při ionizaci elektrosprejem [39]*

U APCI (*Obr. 11*) ústí vstupní kapilára, kterou je přivedena kapalná fáze z chromatografické kolony, do pneumatického rozprašovače, jehož plášť je vyhříván na velmi vysokou teplotu, až 700 °C. Dochází k efektnímu rozprášení a odpaření kapalné fáze. V prostoru koronového výboje generovaného na hrotu tzv. koronové jehly dochází především k ionizaci par mobilní fáze nebo molekul zvlhčovacího plynu a tvorbě chemicko-ionizačního plazmatu. Molekuly analyzovaných látek jsou pak následně ionizovány mechanismem chemické ionizace přenosem protonu za vzniku kvazi-molekulárních iontů typu  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$ . APCI-MS poskytuje jasné informace o molekulové hmotnosti fenolických látek a také užitečné informace o jejich struktuře (rozpoznávací fragmenty iontů), které mohou být verifikovány rovněž pomocí UV-DAD [30, 37].



Obr. 11 - Schéma iontového zdroje APCI [39]

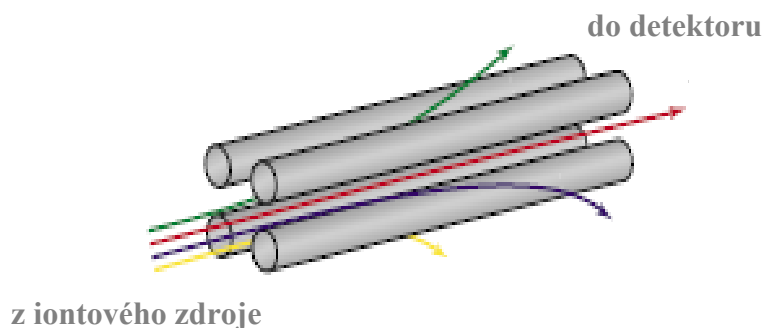
### Hmotnostní analyzátory

Umožňují rozlišení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle poměru jejich hmotnosti a náboje,  $m/z$  [30].

#### ○ *Kvadrupólový analyzátor (quadrupole, Q)*

Kvadrupólový analyzátor (Obr. 12) v hmotnostní spektrometrii se běžně uplatňuje ve spojení s plynovou a kapalinovou chromatografií nebo také s kapilární elektroforézou. Tento typ analyzátoru tvoří čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí [30].

Na ionty, které se dostanou do prostoru mezi tyčemi, působí střídavé elektrické pole, což se projeví jejich oscilací. Při dobře zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí a jejich vhodného poměru projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém  $m/z$ , ostatní se dostanou do nestabilní dráhy a zachytí se na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje. Postupnou změnou napětí (skenování) vkládaných na kvadrupól je možno nechat projít ionty ve zvoleném intervalu hodnot  $m/z$ . Hlavní výhodou kvadrupólového analyzátoru je možnost rychlé změny hodnot napětí vkládaných na tyče. To umožňuje zvolit rychlé skenování odezvy a mnohonásobně zaznamenat hmotnostní spektra během eluce velmi úzkých chromatografických (elektroforetických) píků. Jistými nevýhodami je omezený hmotnostní rozsah, který závisí na kvalitě konstrukce detektoru (maximální hodnota  $m/z$  se pohybuje mezi 2 000-3 000) [32].



Obr. 12 - Kvadrupólový analyzátor [39]

○ *Iontová past (ion-trap, IT)*

Iontová past (Obr. 13) je trojrozměrnou obdobou kvadrupólového filtru a umožňuje pomocí střídavého elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Tvoří ji uzemněné vstupní a výstupní kruhové elektrody hyperbolického průřezu a prstencové středové elektrody, na které se přivádí vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou [30].

Nejprve jsou otvorem ve vstupní kruhové elektrodě přivedeny do iontové pasti molekuly analyzované látky a provede se následná ionizace pulsem elektronů. Další možností je ionizace v externím iontovém zdroji, takže do vnitřního prostoru iontové pasti je analyzovaná látka přivedena už v ionizovaném stavu. Během doby, kdy se na středovou prstencovou elektrodu přivádí střídavé napětí o malé amplitudě a ionty v širokém rozsahu hmotností se udržují na stabilních uzavřených drahách, je možno akumulovat dostatečné množství iontů v prostoru iontové pasti. Následně je zvyšována amplituda střídavého napětí. S její rostoucí hodnotou jsou postupně ionty s rostoucím  $m/z$  vypuzeny z pasti a přes otvor výstupní kruhové elektrody jsou vedeny do detektoru. Dříve se iontová past využívala hlavně ve spojení GC/MS při analýzách stopových množství organických látek. Dnes, díky konstrukčnímu vývoji, je těžištěm jejího využití kombinovaná technika LC/MS, a to i pro analýzy vysokomolekulárních látek [30].



Obr. 13 - Průřez iontovou pastí [30]

○ *Průletový analyzátor*

Průletový hmotnostní analyzátor je nejjednodušším hmotnostním analyzátozem tvořeným pouhou evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů s rozdílným  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Ionty s odlišným  $m/z$ , vystupující z iontového zdroje, mají při stejné kinetické energii rozdílnou rychlost. Hmotnější ion se

pohybuje pomaleji a dorazí do detektoru později. Časová diference a tedy i dosažitelné rozlišení závisejí na délce dráhy, kterou ionty v trubici průletového analyzátoru urazí. Aby zařízení nemuselo být příliš rozměrné, konstruuje se s tzv. reflektorem, elektrostatickým zrcadlem znásobujícím průletovou dráhu iontů. Hlavní výhodou tohoto zařízení je teoreticky neomezený hmotnostní dosah. Největšího využití zatím dosáhl ve spojení s ionizační technikou MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) v analýze biomolekul (proteiny, polysacharidy). TOF-analyzátor lze však najít i u techniky LC-MS pro analýzu vysokomolekulárních látek nebo v kombinaci s kvadrupólovými filtry u hybridních tandemových přístrojů [33].

### Detektory v hmotnostní spektrometrii

V hmotnostní spektrometrii se můžeme setkat se dvěma typy detektorů, a to s detektory pro přímá měření a násobičovými detektory. Detektory pro přímá měření detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů a používají se hlavně pro měření přesného izotopového zastoupení prvků. Mnohem větší význam mají násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a poskytují měřitelné signály dokonce pro jednotlivé ionty. Používají se u veškeré komerční instrumentace, včetně kombinovaných systémů GC/MS a LC/MS [30].

#### ○ *Spojení HPLC s hmotnostním detektorem*

HPLC/MS využívající rozhraní termospreje byla zkonstruována pro analýzu nízkomolekulárních fenolických látek v rostlinných materiálech. Větší citlivosti může být dosaženo pomocí volby negativního módu ionizace. Jiná studie zabývající se obdobným výzkumem použila k převedení vzorku v kapalně fázi do MS elektrosprej. Vzorek byl separován pomocí iontově párové chromatografie na fenylové koloně a poté byly hmotnostní spektrometrií v negativním módu stanoveny fenolové kyseliny a aldehydy. Během ionizace vznikají pouze deprotonované molekuly, takže mnohdy musí být struktura verifikována využitím MS<sup>n</sup>. ESI vykazuje jedenkrát až dvakrát lepší detekční limity než TSI s kladnými ionty [34]. Spojení HPLC s APCI bylo poprvé použito pro analýzu isoflavonů a jejich konjugátů v sojových potravinových výrobcích. Analýza byla provedena jak v kladném tak i záporném módu s mobilní fází obsahující methanol a vodný roztok mravenčanu amonného (pH 4) za gradientové eluce. Skoro ve všech případech byla lepší odezva na záporný mód. Na kvadrupólovém analyzátoru byly úspěšně detekovány isoflavony v kladném módu, ale při využití iontové pasti byly výsledky získané aplikací kladného módu při chemické ionizaci APCI neuspokojivé [34].

### **2.5.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie v systému LC/MS**

Zásadní nevýhodou použití sprejových ionizačních technik je povětšinou zanedbatelný rozsah fragmentace vznikajících iontů. Pro účely podrobnější strukturních studií je nutno použít komplexní systémy tandemové hmotnostní spektrometrie, sdružující dvojici hmotnostních analyzátorů oddělených kolizní celou. Klasickým instrumentálním uspořádáním tohoto typu je tandemový hmotnostní spektrometr, kde jsou spojeny dva magnetické hmotnostní analyzátorů. V prvním analyzátoru je volbou intenzity magnetického pole vybrán ion určitého  $m/z$  (tzv. mateřský ion), jež je následně řízeně fragmentován v kolizní cele. Vzniklé fragmentované ionty (dceřinné ionty) jsou podle  $m/z$  rozděleny v druhém magnetickém analyzátoru a následně detekovány. Vhodnější pro spojení se separačními metodami je systém se třemi kvadrupóly.

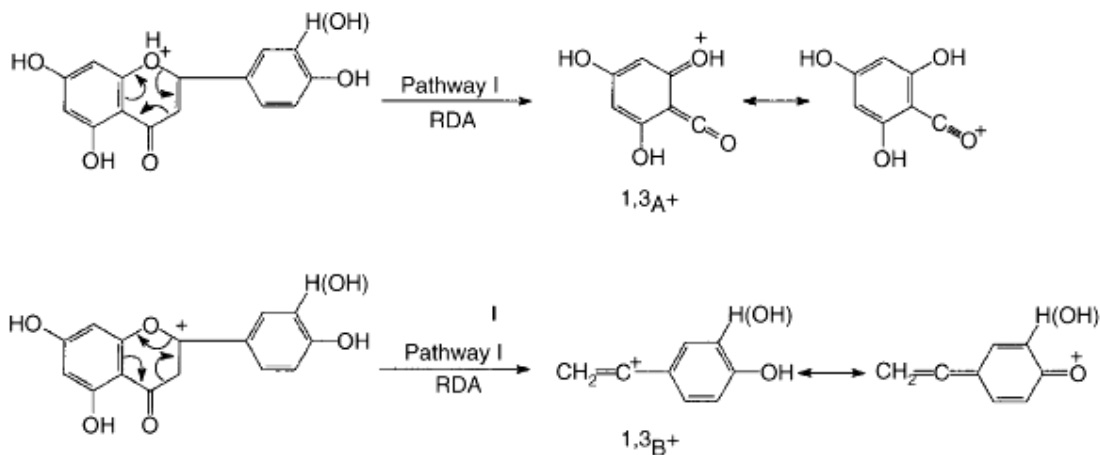
První kvadrupól slouží pro výběr mateřského iontu, do druhého kvadrupólu se přivádí pod vhodným tlakem inertní plyn a slouží jako kolizní cela pro řízenou fragmentaci mateřského (prekurzorového) iontu, skenováním třetího kvadrupólu se rozdělí vzniklé dceřinné ionty. Pro určení strukturní analýzy velkých molekul byly vyvinuty hybridní systémy vyznačující se vysokým dosažitelným rozlišením a vysokou citlivostí, jež jsou vhodné pro spojení s kapalinovým chromatografem [30].

#### Identifikace a strukturální charakterizace pomocí fragmentace mateřského iontu [40]

Charakterizace sloučenin pomocí techniky LC/MS<sup>2</sup> je v současné době velmi rozšířena. Způsob fragmentace sloučenin je závislý na typu ionizace (ESI, APCI) a na typu použitého hmotnostního analyzátoru (kvadrupól, iontová past).

Nejdůležitější fragmentační reakcí flavonoidů jsou retro-Diels-Alderovy reakce. Retro-Diels-Alderovy (RDA) fragmenty jsou důležité především pro charakterizaci glykosidických a aglykonových šestičlenných cyklických struktur obsahujících dvojnou vazbu a 3 páry delokalizovaných elektronů. Pro snadnější orientaci ve štěpných produktech bylo navrženo názvosloví vzniklých fragmentů. Ionty vytvořené v kladném módu rozštěpením dvou vazeb na C-kruhu jsou označovány jako  $^{ij}A^+$  a  $^{ij}B^+$  v souvislosti s označením daného flavonoidního kruhu. Indexy  $i$  a  $j$  označují vazby na uhlíkatém kruhu, které byly přerušeny. V záporném módu se používá označení  $^{ij}A^-$  a  $^{ij}B^-$  se stejnou symbolikou jako v módu kladném.

Ve výsledku dochází k rozštěpení dvou  $\sigma$ -vazeb a k vytvoření dvou  $\pi$ -vazeb. Příkladem může být štěpení luteolinu se substituentem -OH na benzenovém kruhu B ( $m/z = 287$ ) či apigeninu se substituentem -H na stejné pozici kruhu B ( $m/z = 269$ ) v kladném módu (Obr. 14) – hodnota fragmentu  $^{1,3}A^+$  je  $m/z = 153$  a pro fragment  $^{1,3}B^+$  je hodnota  $m/z = 135$  pro luteolin resp. 119 pro apigenin.



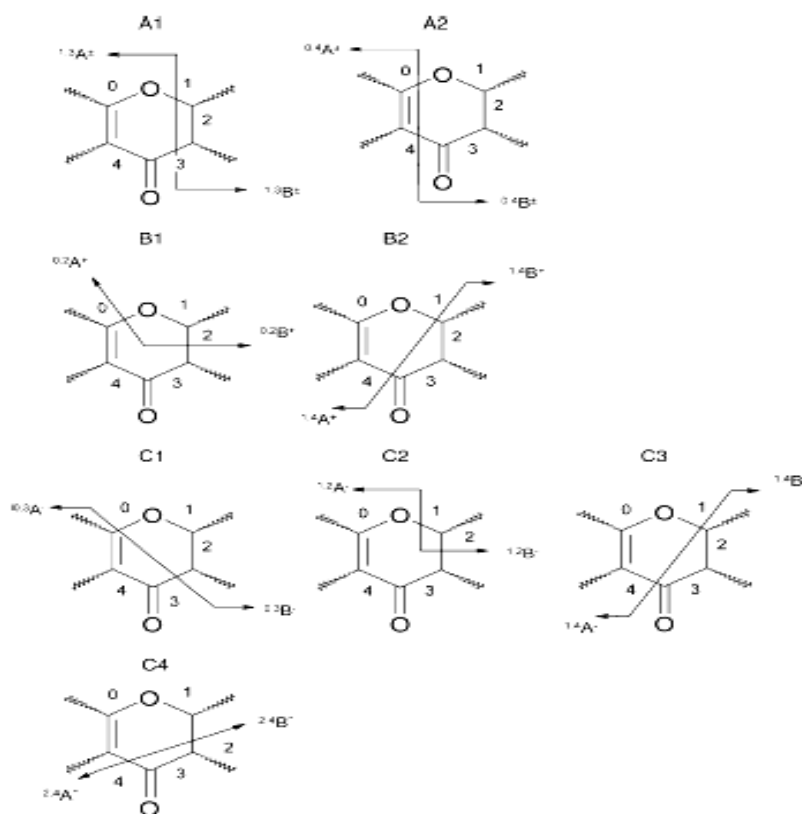
Obr. 14 - Štěpení luteolinu a apigeninu v kladném módu [40]

○ *Fragmentace v kladném módu*

Vybrané flavonoidní skupiny (flavony, izoflavony, flavonoly a flavanony) jsou charakteristické způsobem štěpení (Obr. 15). Diels-Alderovo štěpení a vznik  $^{1,3}A^+$  fragmentu je typické především pro flavony (luteolin a apigenin), dále pro flavonoly (kaempferol) a flavanony (naringenin a hesperetin). Fragment typu  $^{1,3}B^+$  je u zmíněných struktur také pozorován, ale ve zvýšené míře pouze u flavanonu naringenin. U flavonů a flavonolů dochází také k štěpení  $^{0,2}B^+$  a příslušný štěp  $^{0,2}A^+$  se vyskytuje pouze u flavonolů, což může sloužit jako rozlišovací prvek. Štěpení vazeb 0, 4 není u těchto sloučenin příliš běžné. Diels-Alderova fragmentace u sloučenin s methoxy substituentem probíhá jen v omezené míře.

○ *Fragmentace v záporném módu*

RDA štěpení uhlíkatého skeletu v záporném módu poskytuje hlavně fragmenty typu  $^{1,3}A^-$  a  $^{1,3}B^-$  (speciálně u flavonolů). Vyskytují se i případy, kdy vzniklé štěpy jsou ve tvaru  $^{0,3}A^-$  a/nebo  $^{0,3}B^-$ . Tento typ štěpení byl pozorován však pouze u izoflavonů (daidzein a genistein). Dalším možným typem je štěpení vazeb 0, 4, které však není typické pro všechny flavonoidy. Bylo pozorováno pouze u několika sloučenin – apigenin, kvercetin, kaempferol, naringenin či izosakurametin. Fragmenty typu  $^{1,2}A^-$  jsou charakteristické pro spektrum kvercetinu a fisetinu.



Obr. 15 - Štěpení čtyř základních typů flavonoidů v kladném módu (flavony, isoflavony, flavonoly a flavanony) [40]

### 2.5.3 Separace proteinů

Kromě výše uvedených chromatografických technik a CZE, jsou pro analýzu proteinů nejvyužívanější zejména další elektroforetické metody, hmotnostní spektrometrie, metody imunochemické, popřípadě – v případě zájmu o trojrozměrnou strukturu pivovarských bílkovin – i nukleární magnetická rezonance či rentgenová krystalografie.

#### 2.5.3.1 Elektromigrační (elektroforetické) metody

Elektroforéza představuje orientovaný pohyb elektricky nabitých částic (iontů, koloidních částic atd.) v roztoku, vynucený stejnosměrným elektrickým polem. Uspořádání elektroforézy může být v trubičkách nebo v tenké vrstvě, přičemž úspěch separace látek ze směsi lze předpokládat jen tehdy, budou-li mít separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti [41].

Využití elektroforézy pro dělení proteinů poprvé popsal roku 1937 švédský biochemik Arne Tiselius. Ve své metodě použil tzv. volnou elektroforézu, při níž se roztok proteinů umístí do trubice tvaru U a převrství pufrem neobsahujícím proteiny. Částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou rychlostí, která je úměrná velikosti jejich náboje. Velikost náboje společně s gradientem napětí tedy určují rychlost migrace i vzájemnou separaci.

Jelikož u volné elektroforézy docházelo ke konvekčnímu míchání putujících proteinů, což vyžadovalo použití složitých přístrojů a velkého množství vzorku, byla tato metoda nahrazena zonovou elektroforézou, při níž se vzorek pohybuje na pevném podkladu, jako je filtrační papír, celulósa nebo různé typy gelů (škrob, agar, agarosa, polyakrylamidový gel).

Metody patřící do zonových elektroforetických technik jsou obzvláště vhodné pro analytické využití. Protože jsou molekuly ve svém pohybu omezovány též přítomným gelem, je separace účinnější – separace probíhá na základě velikosti náboje a současně i velikosti molekuly. Rychlost jejich pohybu závisí na velikosti pórů v gelu. Velké molekuly jsou zpomalovány více než molekuly malé, protože gel zcela vyplňuje vymezený prostor (trubička, desky mezi dvěma skly). Pohyb se zastaví teprve, až dojde k úplnému rozdělení [42].

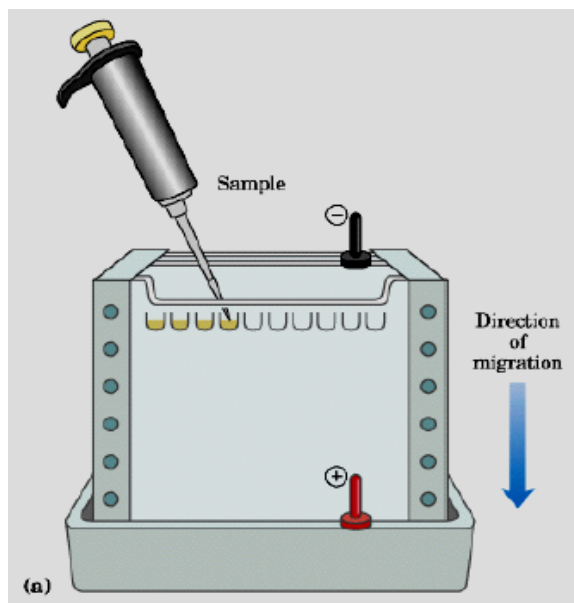
#### PAGE a PAGE-SDS elektroforéza

Technika PAGE využívá jako nosič polyakrylamidový gel (PAGE = polyacrylamide-gel-electrophoresis) a pro separaci proteinů je nejběžnější. Provádí se ve speciálních aparaturách, kdy se gel, společně se vzorkem, umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud. Putující molekuly bílkovin ovlivňuje hustota polymerizovaného gelu vytvořeného polymerací monomeru akrylamidu ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ; zkr. AA), zesíťovacím činidlem (N,N-methylen-bis-akrylamid, zkr. BIS;  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}=\text{CH}-\text{CH}_2$ ), které se zabudovává do lineárního řetězce polymeru, a iniciačním činidlem persíranem amonným (ammonium persulfate; APS). Jako katalyzátor reakce se používá N,N'-tetramethyldiamin ( $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , TEMED). Čím je větší hustota polymerizovaného gelu, tím jsou molekuly více zpomalované [43, 44].

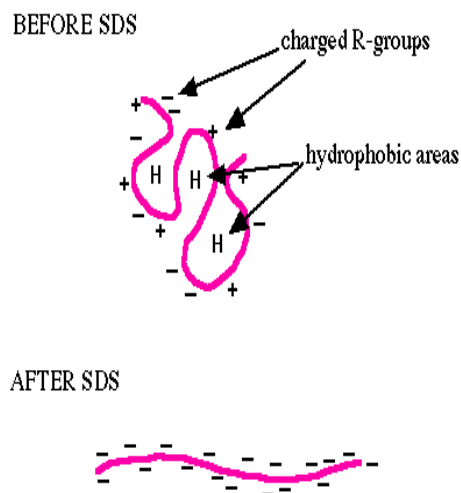
Kyslík jako inhibitor této reakce se odstraňuje z roztoku nejčastěji sonifikací. Běžný polyakrylamidový gel je průhledný, pružný a dostatečně pevný. Se vzrůstem hustoty polymerních vláken se pohyblivost molekul bílkovin v gelu snižuje. Elektroforézu ovlivňuje i pH pufru (jímž

je zajištěno vodivé prostředí), nebo přítomnost dodecylsulfátu sodného (SDS), který uděluje proteinům uniformní záporný náboj a jejich pohyblivost je pak dána velikostí molekuly. Bílkoviny mají schopnosti vázat SDS v množství asi 1,4 g SDS na gram bílkovin. Metoda je intenzivně využívána na stanovení relativní molekulové hmotnosti neznámých bílkovin [41].

Po skončení elektroforézy se provádí detekce – nejčastěji pomocí barviv s vysokou afinitou k molekulám bílkovin – jako je Amidočern 10B, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ponceau S. Nejcitlivější je metoda barvení stříbrem, která je až 100krát citlivější než barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 s detekčním limitem méně než 1 ng proteinu [41].



Obr. 16 - Uspořádání PAGE elektroforézy [43]



Obr. 17 -Detergent dodecylsulfát sodný (SDS) před a po zahřátí s merkaptoethanolem

## 2D elektroforéza (IEF) [41]

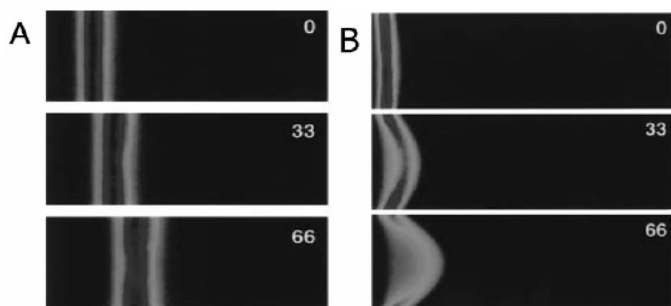
Dvojrozměrná neboli 2D elektroforéza je na stanovení proteinových vzorků taktéž hojně využívána. Jde o kombinaci dvou izoelektroforetických dělení, kdy se nejdříve vzorek rozdělí izoelektrickou fokusací na základě izoelektrických bodů. V kolmém směru se potom elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS jednotlivé bílkoviny rozdělí na základě molekulové hmotnosti. Tímto způsobem je možno analyzovat velmi komplexní směsi obsahující desítky bílkovin. Díky této mimořádné dělicí schopnosti patří dvojrozměrná elektroforéza k základním technikám umožňujících identifikaci rozmanitých biopolymerů.

## Mikročipová elektroforéza

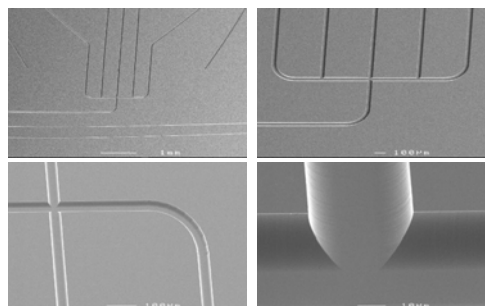
Narůstající zájem o minaturizaci procesů v posledních letech vedl k zavedení elektroforetických technik na mikročipech. Původní produkty pro mikroelektroniku našly uplatnění i v chemickém a biochemickém průmyslu. Mikrofluidní zařízení slouží na manipulaci s nepatrnými množstvími tekutin popř. s nepatrným množstvím biologických jednotek přes separační rozvětvený mikrokanálek, který dovoluje integraci různých chemických

a biochemických procesů v rychlém a automatickém jednodílném mikroproudovém systému [44]. Mikročipová elektroforéza je stále se vyvíjející technika, která umožňuje spojení více separačních technik dohromady. Nejpoužívanější je pro analýzu biomakromolekul a to především nukleových kyselin, bílkovin a sacharidů.

Celá analýza probíhá v mikročipu. Existuje celá řada druhů čipů a také celá řada možností jejich přípravy. Jejich funkce je však univerzální. Všechny musí být schopny především v mikromnožstvích kontrolovat tok tekutiny. Analýza však může na jednom čipu proběhnout jen jednou [45, 46]. V čipu fungují na základě elektrokinetického principu mikropumpy, přičemž pumpování je prováděné buď z vnějšku nebo je pumpa integrovaná do mikročipu ve formě mikrokomponenty [47].



Obr. 18 - Vizualizace tokových profilů:



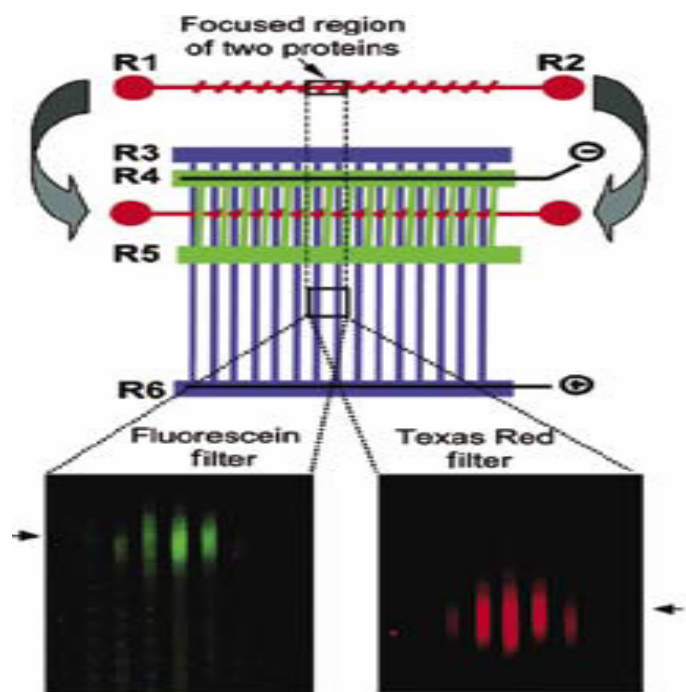
Obr. 19 - Mikrokanálky [41]

A) elektroosmotický tok B) tlakem hnaný tok [41]

Původně byly mikrofluidní techniky navrženy pro použití i v chromatografických technikách. Avšak v této oblasti vývoje nastal útlum a začlenění mikročipů se tu neujalo. Naproti tomu v oblasti metod elektroforézy se mikrofluidní techniky začínají uplatňovat velmi intenzivně. V současné době jsou však stále předmětem rozvoje. Separace pomocí mikročipů začala být realizována nejdříve u jednodušších experimentů jako je např. 1D separace za použití gelu s přísadkou SDS, v současnosti se však výzkum více zaměřuje především na 2D elektroforetické systémy [41].

Nejběžnější metoda s použitím čipu je kapilární elektroforéza, pak také izoelektrická fokusace a gelová elektroforéza. Aplikace elektroforézy zahrnuje jak použití polyakrylamidových gelů, tak agarosy, nebo i dalších materiálů s vlastnostmi molekulového síta. Při vlastní analýze je třeba dávat pozor na výskyt bublin, které mohou zabránit správnému zpolymerování gelu. Mezi nejspolehlivější metody detekce patří optické metody, které jsou i nejpoužívanější, dále metody elektrochemické a v neposlední řadě detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Z optických metod je nejběžnější fluorescence. Malé rozměry mikrokanálku a malé objemy dávkovaného vzorku vyžadují použití citlivého detektoru, proto se nejčastěji využívá laserem indukovaná fluorescence, kdy jsou proteiny označeny sloučeninami jako fluorescein isothiokyanát (FITC) nebo tetramethylrhodamin isothiokyanát (TRITC), které reagují s aminoskupinami proteinů [41].

Protože proteiny jsou chemicky velmi komplexní, je jejich analýza pomocí mikročipů náročnější než analýza DNA. Analýza proteinů pomocí mikročipů nachází uplatnění v širokém rozmezí různých aplikací i v technických výzkumech včetně imunoanalýz a enzymových analýz [48].

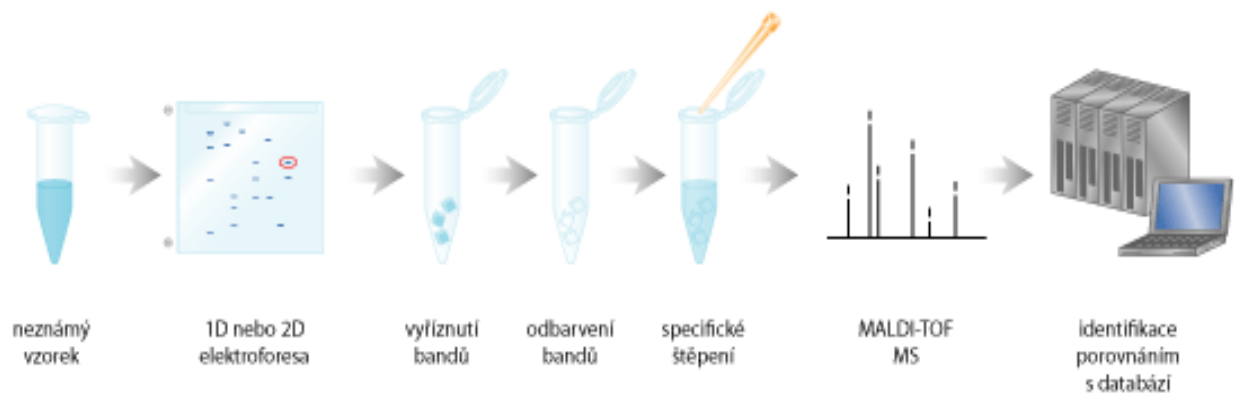


Obr. 20 - Detekce proteinů fluorescenční metodou u mikročipové elektroforézy [47]

### 2.5.3.2 Hmotnostní spektrometrie v analýze proteinů [48]

Hmotnostní spektrometrie je praktickou technikou také pro sekvenování peptidových fragmentů obsahujících až 25 aminokyselinových zbytků. Donedávna bylo použití v analýze velkých organických molekul omezeno, protože bylo obtížné je odpařovat, aniž by se tepelně rozložily (vzorky analyzované hmotnostní spektrometrií musí být v plynné fázi). Tato překážka byla odstraněna vývojem ionizační techniky (bombardování rychlými atomy), kam se řadí desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI).

Zdenaturovaný peptidový řetězec proteinu, jehož disulfidové můstky jsou přerušeny redukcí (obvykle dithiotreitem) a blokovány alkylací (obvykle jodacetamidem) jsou za přísně kontrolovaných podmínek specificky rozštěpeny (nejčastěji se zde využívá trypsin – štěpí řetězec za bazickými aminokyselinami Lys a Arg) nebo chymotrypsinem (štěpí za aromatickými aminokyselinami). Tím vznikne směs peptidů, jejichž přesné molekulové hmotnosti se určí metodou hmotnostní spektrometrie. Získá se tak řada hodnot, které se zadají do veřejně přístupné databáze. Automaticky se pak databáze prohledává a spektrum změřených hmotností se porovná s teoretickými. Tato metodika je poměrně jednoduchá a lze ji při běžných laboratorních podmínkách zvládnout za 2 – 4 hodiny.



*Obr. 21 - Schéma identifikace proteinů z gelu po elektroforese [48]*

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

#### 3.1.1 Standardní chemikálie

Proteinová směs 4, Serva (SRN), složení: fosforyláza B, hovězí albumin, vaječný albumin, karboanhydráza

Proteinová směs 5, Serva (SRN), složení: karboanhydráza, sojový trypsin inhibitor, cytochrom C, hovězí trypsin inhibitor

Proteinová směs 6, Serva (SRN), složení: fosforyláza B, hovězí albumin, vaječný albumin, karboanhydráza, sojový trypsin inhibitor, cytochrom C, hovězí trypsin inhibitor

Kyselina L-askorbová - Sigma-Aldrich (Německo)

2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl (DPPH) - Sigma-Aldrich (Německo)

(-)-Katechin - Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (Německo)

Rutin hydrát, 95% - Sigma-Aldrich (Německo)

Morin hydrát - Sigma-Aldrich (Německo)

Luteolin - Sigma-Aldrich (Německo)

Kvercetin dihydrát, 98%, HPLC - Sigma-Aldrich (Německo)

(±)-Naringenin approx. - Sigma-Aldrich (Německo)

Kaempferol, >96%, BioChemika (ČR)

Katechin gallát - Sigma-Aldrich (Německo)

Epikatechin - Sigma-Aldrich (Německo)

Epikatechin gallát - Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina ferulová p.a. - Fluka, Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina chlorogenová 95% - Sigma-Aldrich (Německo)

#### 3.1.2 Chemikálie – stanovení koncentrace bílkovin

Folin-Ciocalteu činidlo, Jan Kulich (ČR)

Hovězí albumin, Amresco (USA)

Hydroxid sodný, Lachema (ČR)

Síran měďnatý, Lachema (ČR)

Uhličitan sodný, Lachema, (ČR), Sigma – Aldrich (SRN)

Vínan sodno-draselný, Lachema (ČR)

### 3.1.3 Chemikálie pro elektroforézy

Akrylamid, Serva (SRN)  
β –merkapt ethanol, Serva (SRN)  
Bromfenolová modř, Serva (SRN)  
Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva (SRN)  
Dodecylsírán sodný (SDS), Serva (SRN)  
Ethanol, Lachema (ČR)  
Glycerol, Penta (ČR)  
Glycin, Penta (ČR)  
Kyselina octová, Lach-Ner (ČR)  
Kyselina chlorovodíková, Lachema (ČR)  
Methanol, Lachema (ČR)  
N,N'-methylenbisakrylamid, Serva (SRN)  
N,N'-tetramethylendiamin (TEMED), Sigma (SRN)  
Persírán amonný (APS), Serva (SRN)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Serva (SRN)  
Deionizovaná voda ReadyPrep proteomic grade water, Bio-Rad (USA)  
Experion Pro260 Analysis Kit, Bio-Rad (USA)

### 3.1.4 Ostatní chemikálie

Kyselina octová - LachNer (ČR)  
Kyselina octová p.a., 99,8% - LachNer (ČR)  
Octan sodný trihydrát p.a. - Lachema (ČR)  
Kyselina chlorovodíková p.a., 35% - Lachema (ČR)  
Ethylacetát p.a. - LachNer (ČR)  
Ethanol - LachNer (ČR)  
Isooktan - Sigma-Aldrich (Německo)  
Methanol - LachNer (ČR)  
Methanol pro HPLC - LachNer (ČR)  
Dusitan sodný - Lachema (ČR)  
Chlorid hlinitý - Lachema (ČR)  
Hydroxid sodný - LachNer (ČR)  
Uhličitan sodný p.a. - LachNer (ČR)  
Acetonitril pro MS - ULC/MS, Biosolve (Holandsko)  
Kyselina octová pro MS - Biosolve (Holandsko)  
Acetonitril pro HPLC - LachNer (ČR)  
„Total Antioxidant Status kit“ - Randox Laboratories Ltd. (USA)

### 3.1.5 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy - Boeco (Německo)  
pH-metr - HI221 Calibration Check, Microprocessor pH meter, Hanna instruments (USA)  
Magnetická míchačka - Color squid HARRY, IKA (Německo)  
Ultrazvuk - PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)  
Spektrofotometr - Helios  $\delta$ , Unicam (VB)  
Vortex - Genius 3, IKA Vortex (Německo)  
Předvážky - Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)  
Filtry - Stříkačkový filtr PROFIL 25 mm, PTFE, porozita 0,2  $\mu\text{m}$   
Vakuová odparka - HB4 Basic, HBA Labortechnik  
Centrifuga - U-32-R, Boeco (Německo)  
Mikropipety - BioHit Proline (Finsko)  
Mikropipety - Discovery (Německo)  
Soustava HPLC/MS  
Termostat - LCO 101, Column Oven  
Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR  
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR  
Hmotnostní spektrometr - LCQ Advantage MAY, Finnigan  
Kolona - ULTRA Aqueous, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm  
Automatická elektroforetická stanice Experion, Bio-Rad (USA)  
Experion priming station, Bio-Rad (USA)  
Zdroj napětí pro elektroforézu, Series 90, Mid Range Power Supplies (USA)  
Kamera Harrison 52 mm, Srew-In (USA)  
Elektrický vařič ETA (ČR)  
Elektroforetická aparatura P9DS, Owl Separation Systems (USA)  
UltraLum, Inc. Electronic Dualware Transilluminátor (USA)  
UltraLum, Inc. Ultra Viewer (USA)  
Vodní lázeň EL-20D, Kavalier (ČR)

### 3.2 Materiál – analyzované vzorky piva a surovin

Pro izolaci a analýzu polyfenolických látek bylo vybráno celkem 14 značek pivních lahvových ležáků, z nichž 6 náleželo k zahraniční produkci (Heineken, Stella Artois, Zlatý Bažant, Arany Ászok, Borsodi, Szalon) a 8 k produkci české (Tab. 2). K šesti značkám byla navíc zakoupena tatáž piva v plechovkovém balení. Dalšími srovnávacími vzorky byla 3 piva nealkoholická a vybraná odrůda českého chmele – Sládek. Všechna piva byla zakoupena v běžné obchodní síti.

Tab. 2 - Seznam testovaných značek piv typu LEŽÁK

Značka a typ piva		Minimální trvanlivost	Obsah alkoholu
<b>PIVA ČESKÁ</b>			
Bernard	lahev	15. 6. 2009, 22. 7. 2009	5,0
	lahev nealkoholický	15. 5. 2009	max. 0,5
Braník	lahev	7. 7. 2009, 27. 7. 2009	5,0
	plechovka	14. 9. 2009, 8. 11. 2009	5,0
Budvar Budweiser	lahev	6. 7. 2009, 21. 7. 2009	5,0
	plechovka	15. 1. 2010, 29. 1. 2009	5,0
	lahev nealkoholický	21. 1. 2010	max. 0,5
Březňák – lahev		7. 5. 2009, 7. 5. 2009	5,1
Gambrinus	lahev	9. 8. 2009, 26. 8. 2009	5,0
	plechovka	24. 8. 2009, 5. 9. 2009	5,0
Plzeň	lahev	29. 7. 2009, 25. 2. 2010	4,4
	plechovka	4. 9. 2009, 19. 9. 2009	4,4
Staropramen nealko - lahev		13. 8. 2009	max. 0,5
Velkopopovický Kozel	lahev	26. 7. 2009, 2. 9. 2009	4,8
	plechovka	4. 9. 2009, 19. 9. 2009	4,8
<b>PIVA ZAHRANIČNÍ</b>			
Arany Ászok		2. 9. 2009	4,5
Borsodi		14. 7. 2009	4,6
Heineken		2. 12. 2009, 2. 12. 2009	5,0
Stella Artois	lahev	21. 7. 2009, 21. 7. 2009	5,2
	plechovka	26. 11. 2009, 2. 12. 2009	5,2
Szalon		4. 12. 2009	4,6
Zlatý Bažant		16. 8. 2009, 2. 9. 2009	5,0

### 3.2.1 Zpracování vzorků pro analýzy

#### 3.2.1.1 Zpracování vzorků piva

Pro výběr optimálního způsobu úpravy vzorku bylo vybráno pivo značky Plzeň jakožto tradiční česká značka.

Pro stanovení celkových antioxidačních parametrů a technologických charakteristik byly vzorky piva pouze sonifikovány po dobu 20 min za účelem odstranění oxidu uhličitého. Pivo bylo naředěno podle citlivosti příslušné metody.

Za účelem analýzy individuálních flavonoidů byly realizovány 4 způsoby úpravy:

a) rozpuštění lyofilizovaného vzorku v roztoku ACN 1% kyselina octová 1:1 (0,0638 g v 1,5 ml mobilní fáze)

b) prosté přefiltrování přes mikrofiltr (průměr 0,2)

c) několikanásobná extrakce 35 ml hydrolyzovaného vzorku (1M HCl 1:1) ethylacetátem s následným vakuovým odpařováním na rotační vakuové odparce a rozpuštěním odparku v 1 ml mobilní fáze

d) SPE extrakce

U všech postupů bylo cílem dostatečné a efektivní zakoncentrování flavonoidních sloučenin.

#### 3.2.1.2 Optimalizace SPE extrakce

Při aplikaci SPE extrakce byly k dispozici kolonky se stacionární fází amid-2. Tyto kolonky byly nejprve promyty 2 ml MeOH, kondicionovány 2 ml H<sub>2</sub>O, a poté na ně byl aplikován vzorek piva, jež byl smíchán v různých poměrech s 2% HCl (Tab. 3). Vzorek zachycený na koloně byl promyt 2,5 ml H<sub>2</sub>O. Pro eluci látky zadržované na kolonci byl použit MeOH (doporučeno výrobcem). Rozpouštědlo bylo následně odpařeno na vakuové rotační odparce, odparek byl znovu rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze, přefiltrován přes jednorázový mikrofiltr typu PRE CUT a poté ihned nanášen na chromatografickou kolonu.

Tab. 3 - Optimalizace poměru HCl a vzorku piva při SPE extrakci

Celkový objem (ml)	Vzorek piva + 2% HCl	
	pivo	2% HCl
1	0,5	0,5
3	1,5	1,5
6	3	3

#### 3.2.1.3 Úprava vzorku chmele

1,5 g vzorku chmele bylo dezintegrováno drcením a extrahováno směsí methanol:voda (1:1) 45 minut za tepla (40°C) na vodní lázni. Rozmočené chmelové šišťice byly odfiltrovány a získaný roztok byl buď přímo použit k analýze polyfenolů nebo extrahován dle 3.2.1.1 b) a až poté podroben LC/MS analýze.

### 3.2.2 Stanovení skupinových antioxidačních parametrů

#### 3.2.2.1 Stanovení celkových polyfenolů

K 1 ml Folin-Ciocaltovu činidlu zředěnému vodou (9:1) byl přidán 1 ml vody, 50  $\mu$ l vzorku a po promíchání a 5-ti minutovém odstátí byl přidán nasyčený roztok uhličitanu sodného. Po promíchání a 15-ti minutovém odstátí byla měřena absorbance při 750 nm. Kalibračním roztokem byla 0,6 M kyselina gallová.

#### 3.2.2.2 Stanovení celkových flavonoidů

Byl připraven 5 % roztok dusitanu sodného, 10 % roztok chloridu hlinitého 1 M roztok hydroxidu sodného. Následně bylo 0,5  $\mu$ l čerstvého vzorku smícháno s 1,5 ml vody a 0,2 ml roztoku NaNO<sub>2</sub>. Po promíchání a 5-ti minutovém odstátí bylo přidáno 0,2 ml roztoku Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> po promíchání a pětiminutovém odstátí bylo přidáno 1,5 ml roztoku NaOH a ihned 1 ml vody. Po 15-ti minutách byla měřena absorbance při 510 nm proti fyziologickému roztoku. Kalibračním roztokem byl 1 M katechin.

#### 3.2.2.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity byla použita diagnostická souprava Total Antioxidant Status (TAS, Randox, USA). Stanovení bylo provedeno dle postupu přiloženého k diagnostické soupravě výrobcem.

10  $\mu$ l roztoku vzorku bylo napipetováno do zúžené kyvety a smícháno s 0,5 ml chromogenu. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 600 nm proti vzduchu. Ke směsi v kyvetě bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátu (peroxid vodíku) a přesně po třech minutách byla opět měřena absorbance. Stejným způsobem byly proměřeny absorbance také u standardu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-karboxylová kyselina) a blanku, místo vzorku byla použita deionizovaná voda.

Z rozdílu absorbancí standardu a blanku byl dle návodu výrobce vypočten faktor. Z hodnoty faktoru a rozdílu absorbancí u vzorku byla vypočtena celková antioxidační kapacita.

$$\text{faktor} = \frac{\text{koncentrace standardu}}{(\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ standard})} \quad (1)$$

$$\text{TAS (mmol/l)} = \text{faktor} \cdot (\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ vzorek}) \quad (2)$$

#### 3.2.2.4 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH [49]

Byly připraveny roztoky kyseliny octové ( $c = 0,1$  mol/l) a octanu sodného ( $c = 0,1$  mol/l), 130 ml roztoku kyseliny octové bylo smícháno se 70 ml roztoku octanu sodného a nastaveno pH přesně na 4,3 pomocí NaOH. Ve směsi ethanol-acetátový pufr (2 : 1 obj.) byl připraven roztok DPPH o koncentraci  $1,86 \cdot 10^{-4}$  M (7,34 mg/100 ml roztoku), navážka činidla a acetátového pufru byla rozpouštěna nejprve mícháním magnetickým míchadlem a poté umístěním v ultrazvukové lázni. Rozpuštění činidla probíhalo po dosažení absorbance roztoku konstantní hodnoty -

přibližně 1,600 absorbančních jednotek. Při vlastním stanovení (AVZ) bylo smícháno 2,8 ml činidla DPPH s 0,2 ml vzorku. Po promíchání a po 10 minutách byla měřena absorbance při 525 nm. Stejným způsobem se postupovalo u stanovení slepého stanovení vzorku (ASL), kdy byl smíchán vzorek jen se směsí ethanol-acetátový pufr. Při stanovení slepé hodnoty činidla (AČ) bylo smícháno 2,8 ml činidla a 0,2 ml destilované vody a po 10 minutách byla proměřena absorbance při 525 nm proti destilované vodě. Redukční aktivita byla vypočtena z hodnoty  $RADPPH = AČ + ASL - AVZ$ , po dosazení do regresní rovnice (Tab. 9) získané standardizací na kyselinu askorbovou.

### 3.2.3 Stanovení pivovarských parametrů a charakteristik

#### 3.2.3.1 Stanovení celkových hořkých látek (JH – jednotek hořkosti) [50]

10 ml vzorku bylo zbaveno oxidu uhličitého sonifikací (20 minut) a pipetováno do centrifugační kyvety. Bylo přidáno 0,5 ml 6 M HCl, 20 ml isooktanu a několik skleněných kuliček (3 – 5). Kyvety byly třepány 15 minut při 20 °C na třepačce a poté odstředovány 3 minuty při frekvenci 3000 ot./min. Hořkost byla vypočtena ze vztahu

$$\text{Jednotky hořkosti (JH)} = 5000 \cdot A \quad (3)$$

kde A – absorbance isooktanového extraktu vzorku při 275 nm měřená proti čistému isooktanu.

#### 3.2.3.2 Stanovení isosloučenin [50]

K 10 ml vzorku zbaveného oxidu uhličitého sonifikací (20 minut) byl přidán 1 ml 3 M HCl a 20 ml isooktanu, směs byla třepána 5 minut na třepačce. Po pětiminutovém odstátí byla opět určena absorbance isooktanového extraktu při 275 nm měřená proti čistému isooktanu.

$$\text{Isosloučeniny} = 57,2 \cdot A - 5,9 \quad (4)$$

#### 3.2.3.3 Stanovení skutečného a zdánlivého extraktu, obsahu alkoholu, stupňovitosti a skutečného a zdánlivého prokvašení [50]

Vzorky piva (300 až 500 ml) byly temperovány na vodní lázni na teplotu 20 °C, zbaveny oxidu uhličitého a přefiltrovány přes suchý skládaný filtr pro zbavení pěny. Prvních asi 50 ml filtrátu bylo vylito. Do destilační baňky o objemu bylo naváženo 100 g piva zbaveného oxidu uhličitého, přidáno 50 ml destilované vody, do zvážené předlohy bylo dáno 5 až 10 ml destilované vody a poté bylo pivo předestilováno. Destilace byla ukončena po destilování 85 až 90 ml (30 až 60 minut). Obsah předlohy byl dovážen vodou na 100,0 g. Relativní hustota destilátu byla stanovena pyknometricky. Zbytek v destilační baňce, který zůstal po oddestilování alkoholu, byl ochlazen na teplotu 20 °C a dovážen destilovanou vodou na původní hmotnost 100,0 g. Po promíchání byla stanovena relativní hustota roztoku rovněž pyknometricky. Relativní hustota byla stanovena dále u vytřepaného vzorku piva (opět pyknometricky). V pivovarských tabulkách byly vyhledány odpovídající hodnoty hmotnostního zlomku extraktu.

Relativní hustota destilátu, zbytku po destilaci a zdánlivého extraktu byla vypočtena podle vztahu:

$$d_{20/20} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}, \text{ kde} \quad (5)$$

$m_1$  = hmotnost prázdného pyknometru (g),

$m_2$  = hmotnost pyknometru s vodou (g)

$m_3$  = hmotnost pyknometru s destilátem, zbytkem po destilaci nebo vytřepaným pivem (g)

Hmotnostní zlomek konvenčního extraktu  $W_p$  – stupňovitost byla vypočtena podle Ballingova vzorce:

$$p = \frac{(2,0665 \cdot W_A + W_n) \cdot 100}{100 + 1,0665 \cdot W_A}, \text{ kde} \quad (6)$$

$W_p$  – hmotnostní zlomek konvenčního extraktu (%),

$W_A$  – hmotnostní zlomek alkoholu (%),

$W_n$  – hmotnostní zlomek skutečného extraktu (%),

2,0665 a 1,0665 – koncentrační konstanty podle Ballinga

nebo dle

$$p = 2A + n + K, \text{ kde} \quad (7)$$

$A$  – alkohol

$n$  – skutečný extrakt

$K$  – korekční faktor pro danou hustotu uvedený v pivovarských tabulkách

Stupeň prokvašení byl vypočten podle:

$$\text{Zdánlivý stupeň prokvašení} = P_z = \frac{p - m}{p} \cdot 100 \quad (8)$$

$$\text{Skutečný stupeň prokvašení} = P_s = \frac{p - n}{p} \cdot 100, \text{ kde} \quad (9)$$

$m$  – hodnota zdánlivého extraktu (%)

### 3.3 Analýza polyfenolických látek pomocí LC/ESI-MS analýzy

#### 3.3.1 Analýza standardních látek - optimalizace separační metody RP-HPLC/ESI-MS

Optimalizace analýzy probíhala s využitím směsi dostupných standardních sloučenin flavonoidů (kyselina ferulová, chlorogenová, gallová, katechin, epikatechin, naringenin, morin, rutin), kdy 0,0015 g standardu bylo rozpuštěno v 1,5 ml směsi 1% kyseliny octové a acetonitrilu v poměru 1:1. Roztok byl naředěn na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml. Veškerá měření

probíhala na Surveyor Plus LC systému od firmy Thermo Finningan sestávajícím z dvojpístové MS pumpy se zabudovaným degaserem, rozpouštědlové platformy, PDA („photo diode array“) detektoru a hmotnostního spektrometru LCQ Advantage Max. Pro jednodušší identifikaci složek vzorku byly použity oba typy detekce (spektrofotometrická i hmotnostní). Nejdříve byla provedena optimalizace chromatografické separace bez připojeného hmotnostního analyzátoru, po té byl do sestavy přidán hmotnostní spektrometr a proběhla optimalizace MS analýzy. Výhodou PDA detektoru je, že umožňuje nejen snímat celé absorpční spektrum zvolenou rychlostí, avšak navíc též absorbanci při více konkrétních vlnových délkách samostatně.

### 3.3.1.1 Optimalizace složení mobilní fáze pro chromatografickou separaci polyfenolů

Jako základní mobilní fáze byla zvolena soustava rozpouštědel acetonitril a voda jakožto vhodná kombinace uváděná pro analýzy látek polyfenolického typu [30, 51]. V první fázi optimalizace byla prováděna isokratická eluce připraveného standardního preparátu (složení mobilní fáze se během separace neměnilo), kdy byly aplikovány různé poměry zmíněných základních rozpouštědel. Ve druhé fázi bylo zkoušeno několik různých programů gradientové eluce (složení mobilní fáze se během separace měnilo) uvedených v odborné literatuře [52], které byly následně modifikovány. Využívaným rozpouštědlem byl rovněž MeOH.

### 3.3.1.2 Výběr chromatografické kolony pro separaci směsí standardních látek

Optimální nastavení gradientu pro separaci standardních látek (kap. 3.3.1.1) bylo aplikováno kromě HPLC kolony Restek i na další dostupné chromatografické kolony, jejichž parametry jsou uvedeny v *Tab. 4*. S ohledem na tlak byl pro kolonu s vnitřním průměrem 2,1 mm (Polaris) nastaven průtok mobilní fáze na 0,15 ml/min a pro kolony s průměrem 4,6 mm 0,4 ml/min.

*Tab. 4 - Parametry použitých kolon pro separaci látek*

<i>Název kolony</i>	<i>Typ stacionární fáze</i>	<i>Rozměry (mm)</i>	<i>Zrnitost (μm)</i>	<i>Předkolona</i>
Polaris	C18	150 x 2,1	3	ano
Kromasil	C18	250 x 4,6	7	ano
Restek	C18 Ultra Aqueous	250 x 4,6	5	ano

### 3.3.2 Kalibrace a optimalizace (ladění) hmotnostního spektrometru [53]

Za účelem měření s hmotnostní detekcí byl připojen hmotnostní spektrometr LCQ Advantage Max vybavený elektrosprejem (iontový zdroj), iontovou optikou složenou ze tří oktapólů, analyzátozem iontovou pastí a elektronásobičem jako vlastním detektorem. Optimalizace tohoto zařízení zahrnovala kalibraci a tzv. tuning (ladění). Celý systém byl řízen softwarem Xcalibur.

#### 3.3.2.1 Kalibrace MS detektoru

Kalibrace přístroje byla provedena automaticky zadáním v řídicím systému Xcalibur pomocí výrobcem dodávaných kalibračních roztoků, které představují kofein ( $m/z = 195$ ), (pro kalibraci je používán přímo komerční roztok o koncentraci 1 mg/ml v methanolu), tripeptid L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanin acetát monohydrát (Met-Arg-Phe-Ala neboli MRFA)

a proteinový vzorek s komerčním názvem Ultramark ( $m/z = 1\ 022, 1\ 122, 1\ 222, 1\ 322, 1\ 422, 1\ 522, 1\ 622, 1\ 722$  a  $1\ 822$ ).

### 3.3.2.2 Příprava zásobního roztoku MRFA

Pro kalibraci byl postupným ředěním připraven 1 ml zásobního roztoku MRFA o koncentraci 5,73  $\mu\text{mol/ml}$  ve směsi methanolu a vody v poměru 50:50. Průměrná relativní molární hmotnost MRFA je 523,6.

### 3.3.2.3 Zásobní roztok Ultramarku

Pomocí syringe stříkačky bylo odměřeno 10  $\mu\text{l}$  komerčního roztoku Ultramark, který byl naředěn do 10 ml acetonitrilu. Výsledná koncentrace zásobního kalibračního roztoku Ultramark tak byla 0,1 obj. %.

### 3.3.2.4 Příprava kalibrační směsi a vlastní kalibrace přístroje

Ze zásobního komerčního roztoku kofeinu o koncentraci 1 mg/ml bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  do suché a čisté zkumavky. K roztoku kofeinu bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  zásobního kalibračního roztoku MRFA (kap. 3.3.2.2) a 2,5 ml zásobního kalibračního roztoku Ultramark (kap. 3.3.2.3). Další nezbytnou složkou byla ledová kyselina octová přidaná v objemu 5  $\mu\text{l}$ . Kalibrační roztok byl naředěn 2,34 ml směsi methanolu a vody v poměru 50:50. Takto připravený roztok byl využíván ke kalibraci hmotnostního detektoru. Dílčí kroky kalibrace přístroje LCQ Advantage Max probíhaly automaticky podle nastavení v řídicím softwaru Xcalibur. Přístroj byl nakalibrován v okamžiku, kdy veškeré kalibrační úrovně proběhly úspěšně.

## 3.3.3 Ladění hmotnostního detektoru a stanovení MS spektra reserpinu

### 3.3.3.1 Příprava ladícího roztoku a jeho aplikace

Pro vyladění metody byl postupným ředěním zásobního roztoku reserpinu o koncentraci 1 mg/ml v roztoku methanol:voda (50:50) připraven roztok o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ . Tato směs byla do MS detektoru dávkována kontinuálně pomocí integrované syringe pumpy. Ladění (tunning) přístroje probíhala opět po nastavení v programu Xcaliburu automaticky. Výsledkem ladění byla metoda (tune file) uložená v softwaru, jenž zahrnovala optimální nastavení parametrů přístroje pro reserpin (Tab. 5). Ladění bylo provedeno v kladném i záporném módu.

Tab. 5 - Ladící parametry pro reserpin v kladném i záporném módu.

<i>Parametr MS</i>	<i>Kladný mód</i>	<i>Záporný mód</i>
Množství sušícího plynu [arb]	20	45
Napětí na kapiláře ESI [kV]	5.00	4.00
Teplota na vstupní kapiláře [°C]	250	250
Napětí na vstupní kapiláře [V]	3.00	-11.00

### 3.3.3.2 Stanovení MS spekter reserpinu

Dávkovacím ventilem integrovaným v hmotnostním detektoru s dávkovací smyčkou 2  $\mu\text{l}$  byl přiveden do MS detektoru standardní roztok reserpinu o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.3.3.1. Byla použita mobilní fáze o složení methanol:1% kyselina octová v poměru 80:20 pro kladný mód, pro záporný mód směs methanol:0,25% amoniak rovněž v poměru 80:20. Byla získána spektra v režimech MS full scan a MS/MS full scan s kolizní energií 45 % pro kladný mód a 40 % pro záporný mód.

## 3.4 Optimalizace podmínek MS detekce u vybraných polyfenolických látek

Naladěním hmotnostního detektoru na reserpin je sice možné měřit široké spektrum látek, ale bez dostatečného rozlišení cílového analytu. Proto je velmi žádoucí doladit přístroj pomocí strukturně podobné sloučeniny, čímž se docílí zvýšení citlivosti detekce.

### 3.4.1 Polyfenolické sloučeniny – kyselina chlorogenová a epikatechin

Následná optimalizace parametrů přístroje probíhala automaticky nastavením v programu Xcalibru pomocí standardních sloučenin vybraných s ohledem na stanovované skupiny látek ve vlastních vzorcích.

Ze skupiny látek s flavonoidním typem skeletu byla vybrána kyselina chlorogenová – doporučovaná jako nejvhodnější pro následně prováděné typy analýz a epikatechin, který měl nejlepší odezvu při chromatografické separaci. Ladicí roztoky vybraných polyfenolů byly připraveny v rozmezí koncentrací 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – 1  $\text{ng}/\text{ml}$  rozpuštěním ve směsi voda acetonitril v poměru 1:1. Roztoky byly postupně - od nejnižší koncentrace - dávkovány přímo do hmotnostního detektoru a byl sledován snímání záznam přítomných iontů. V případě kyseliny chlorogenové nebyl v kladném ani záporném módu pozorován dostatečný odpovídající signál, tj.  $m/z$  355 při žádné z připravených koncentrací – analýza byla značně zkreslena řadou interferujících iontů pravděpodobně z důvodu nedostatečné čistoty použitého standardu. V případě epikatechinu byl detekován intenzivní kvazi-molekulární ion o  $m/z = 291$ , a to při koncentraci 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{mg}/\text{ml}$  v kladném módu za podmínek uvedených v Tab. 6, proto byl epikatechin využit pro nastavení optimálních parametrů pozdějších analýz se současně připojeným kapalinovým chromatografem.

Tab. 6 - Ladicí parametry pro epikatechin v kladném i záporném módu.

<i>Parametr</i>	<i>Kladný mód</i>	<i>Záporný mód</i>
množství sušícího plynu (arb)	40	45
napětí na kapiláře ESI (kV)	5	4
napětí na vstupní kapiláře (V)	40	-6
teplota na vstupní kapiláře (°C)	250	250

Pro následnou chromatografickou separaci byl přístroj naladěn pomocí externího gradientového čerpadla HPLC a směšovače (T-kus). T-kus umožnil smíchání standardního roztoku epikatechinu (dávkovaného syringe pumpou) s mobilní fází (dávkovanou pomocí čerpadla HPLC sestavy) před vstupem do iontového zdroje (ESI). Koncentrace ladícího roztoku epikatechinu byla 100 µg/ml, průtok mobilní fáze byl 400 µl/min a složení mobilní fáze acetonitril:1% kyselina octová 1:1 (kladný mód) – *Tab. 13* Optimální nastavení detektoru proběhlo automaticky v systému Xcalibur a je uvedeno v *Tab. 7*.

*Tab. 7 - Ladící parametry pro epikatechin v kladném módu hmotnostního spektrometru pro chromatografické analýzy*

<i>Parametr</i>	<i>Kladný mód</i>
množství sušícího plynu (arb)	30
napětí na kapiláře ESI (kV)	4
napětí na vstupní kapiláře (V)	-47
teplota na vstupní kapiláře (°C)	250

### 3.4.2 Stanovení MS/full scan a MS/MS/full scan spekter

Metoda MS/full scan poskytuje hmotnostní spektrum, ve kterém jsou vidět veškeré kvazi-molekulární ionty, které vznikly při ionizaci analytu. Používaný hmotnostní analyzátor však umožňuje měřit i v MS<sup>n</sup> režimu, kdy vzhledem k elektrosprejové ionizaci dochází ke štěpení kvazi-molekulárního iontu (nebo jeho fragmentů) a lze tak následně identifikovat izomerní nebo strukturně podobné látky na základě jejich charakteristických štěpů.

#### 3.4.2.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie (režim MS<sup>n</sup>) standardních sloučenin

Technika MS<sup>n</sup> byla vyzkoušena na vybraných dostatečně čistých preparátech standardních fenolických látek, které byly připraveny v koncentracích 10 ng/ml – 10 µg/ml. Fragmentace byla provedena v kladném i záporném módu s využitím ladění na epikatechin (kap. 3.3.3.2 a 3.4.1 *Tab. 6*). Vzorky standardů byly dávkovány přes dávkovací ventil integrovaný v hmotnostním detektoru s dávkovací smyčkou 2 µl. Jako mobilní fáze byla využita směs acetonitril:1% kyselina octová 50:50. Přídavek kyseliny octové do mobilní fáze umožňoval jednodušší ionizaci analytu na kladné ionty. Optimální štěpení všech testovaných standardů bylo shledáno při koncentraci 10 µg/ml. Pro štěpení zvoleného iontu bylo nutné optimalizovat pouze dva základní parametry: hodnotu kolizní energie (E) a molekulovou hmotnost parentálního iontu. Vhodná kombinace hodnot těchto parametrů byla hledána manuálně pomocí řídicího softwaru Xcalibur do okamžiku, kdy byl kvazi-molekulární iont dokonale rozštěpen. Kolizní energie použité pro jednotlivé standardní preparáty jsou uvedeny v *Tab. 8*.

Tab. 8 - Aplikovaná kolizní energie při MS/MS full scan standardů

<i>Standardní sloučenina</i>	<i>Aplikovaná kolizní energie [%]</i>
Rutin	60
Morin	35
Kaemferol	45
Katechin	50
Epikatechin	40

### 3.5 Analýza intracelulárních bílkovin

#### 3.5.1 Stanovení celkových proteinů Lowryho metodou

Byly připraveny roztoky roztoky:

*Roztok 1* 50 ml 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v 0,1 mol/l NaOH + 2 ml 0,5% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O v 1% vínanu sodno-draselném

*Roztok 2* směs Folinového-Ciocaltenového činidla a vody v poměru 1 : 2

1 g lyofilizovaného vzorku plzeňského ležáku bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody ve zkumavce, bylo odměřeno 0,1 až 0,5 ml bílkovinného vzorku a doplněno fyziologickým roztokem na 3 ml. Poté bylo přidáno 5 ml *roztoku 1* a po deseti minutové inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 0,5 ml *roztoku 2*. Po důkladném promíchání a po 10 minutách byla změřená absorbance při vlnové délce 600 nm proti slepému vzorku (bez vzorku piva). Kalibračním standardem byl hovězí albumin - kalibrační křivka je přiložena v příloze č. 4

#### 3.5.2 Elektroforéza bílkovin metodou PAGE-SDS

K elektroforetickému rozdělení bílkovin byla použita vertikální soustava P9DS složená z elektroforetické vany Shelton a elektroforetických zdrojů EHC 250-90, SH 300 a Series 90 Midi Range Power Supplies. Nosičem byl polyakrylamidový gel v dělicím pufru. Jako elektrolyt byl použit 0,025 mol/l Tris-glycinový pufr s přísadkou SDS.

##### Roztoky

*Zásobní roztok:* AA:BIS [(40% AA) : (3,3% BIS) = 29 : 1]

*Separáčnı pufr:* 1,5 mol/l Tris-HCl pH 8,8 (na 100 ml redestilované H<sub>2</sub>O – 18,1 g Tris, cca 2,8 ml 32% HCl na úpravu pH )

*Zaostřovací pufr:* 0,5 mol/l Tris-HCl pH 6,8 (na 100 ml redestilované H<sub>2</sub>O – 6,1 g Tris, cca 2,5 ml 32% HCl na úpravu pH )

*Elektrodový pufr:* 0,025 mol/l Tris/glycin-SDS (na 1 000 ml redestilované H<sub>2</sub>O – 3 g Tris; 14,4 g glycinu; 1 g SDS)

*Vzorkovací pufr:* 2,5 ml 0,5 mol/l Tris-HCl pH 6,8; 4 ml 10% SDS; 2,5 ml glycerolu; 0,5 ml 2-merkaptoethanolu; 1 mg bromfenolové modři (doplněno na 10 ml redestilovanou vodou)

*Iniciační činidlo:* 25% APS v redest. vodě (připraven vždy čerstvý roztok)

### **3.5.2.1 Příprava polyakrylamidového gelu**

#### Separáčn  gel

10 ml směsi akrylamidu (AA) a N,N-metylen-bis-akrylamidu (BIS) (40% AA : 3,3% BIS v poměru 29:1) bylo smícháno s 10 ml separáčního pufru (1,5 mol/l Tris-HCl v redestilované vodě, pH 8,8) a 17,1 ml redestilované vody. Roztok byl 3 minuty sonifikován při 40 Hz. Poté bylo opatrně a po kapkách přidáno 0,4 ml SDS a 0,06 ml TEMED (N,N'-tetrametylendiamin). Nakonec bylo přidáno 0,24 ml iniciačního činidla APS (čerstvě rozpuštěný 25% persíran amonný v redestilované vodě). Po opatrném zamíchání byl gel nalit do prostoru mezi dvěma skly v nalévacím stojanu a převrstven destilovanou vodou.

#### Zaostřovací gel

1,25 ml směsi AA:BIS bylo smícháno s 2,5 ml zaostřovacího pufru (0,5 mol/l Tris-HCl v redestilované vodě, pH 6,8) a 6,15 ml redestilované vody. Roztok byl opět sonifikován a bylo k němu přidáno 0,1 ml SDS, 0,045 ml TEMED a 0,12 ml APS.

Po ztuhnutí prvního separáčního gelu v aparatuře byla destilovaná voda z povrchu odlita a zbytek odsát filtračním papírem. Na separáčn  gel byl nalit gel zaostřovací, do kterého byl vložen hřeben na vytvoření jamek pro nanášení vzorků.

### **3.5.2.2 Příprava vzorků**

Vzorky bílkovin byly zahuštěny a zakoncentrovány na lyofilizací, smíchány se vzorkovacím pufrům (2,5 ml 0,5 mol/l Tris-HCl pH 8,8; 4 ml 10% SDS; 2,5 ml glycerolu; 1 mg bromfenolové modři, 1 ml redestilované vody) v poměru 1:1 a povařeny na vodní lázni 3 minuty.

### **3.5.2.3 Provedení elektroforézy**

Skleněné desky s gelem byly přeneseny do elektroforetické aparatury, upevněny šrouby a do elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr (0,025 mol/l Tris/glycin-SDS, tzn. 3 g Tris; 14,4 g glycinu; 1 g SDS na litr redestilované vody). Po odstranění hřebínku byly do jamek nanášeny vzorky. Elektrodová vana byla uzavřena, bylo zapnuto chlazení a zdroj elektrického proudu. Po doputování barevné zóny bromfenolové modři ke spodnímu okraji byla elektroforéza ukončena a gel byl obarven.

### **3.5.2.4 Barvení (detekce) bílkovin pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250**

Gel byl přenesen do nádoby s 96% ethanolem, následně byl opláchnut destilovanou vodou a ponořen na 5 minut do barvicí lázně (45 ml ethanolu; 10 ml kyseliny octové; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 – na 100 ml destilované vody). Nakonec byl gel opět ponořen do 7% kyseliny octové a odbarvován na třepačce 12 hodin.

### 3.5.2.5 Vyhodnocení gelů

Vyhodnocení výsledků vertikální PAGE-SDS elektroforézy bylo provedeno pomocí dokumentačního systému Ultralum složeného z duálního transluminátoru, integrující CCD kamery, řídicí jednotky a analytického softwaru Ultralum TotalLab pro 1D analýzu. Systém používá počítačovou verzi NIH Image pro operační software.

### 3.5.3 Mikročipová elektroforéza

Mikrofluidika je technika, která se zabývá separacemi látek ve velmi malém měřítku. Do praxe je zaváděna především díky své časové nenáročnosti – na rozdíl od metody PAGE-SDS, která je však na stanovení proteinových vzorků doposud nejčastěji využívána. Analýza pomocí mikrofluidních elektroforetických systémů slouží prozatím hlavně jako metoda porovnávací ke klasické separaci bílkovin .

#### 3.5.3.1 Zařízení Experion pro stanovení bílkovin mikrofluidní technikou

Systém Experion se skládá z automatické elektroforetické stanice, nanášecí stanice pro gel, kitu pro analýzu bílkovin a programu na zpracování a vyhodnocování dat.

Analýza vzorků bílkovin je prováděna pomocí Experion Pro260 Analysis Kit, který obsahuje reagenty a mikrofluidní čipy. Systém dokáže detekovat bílkoviny od 10 – 260 kDa. Celá analýza trvá max. 30 minut. Experion Pro260 analysis kit obsahuje proteinový standard Pro260 protein ladder, vzorkovací pufr, roztok gelu Pro260 gel, fluorescenční barvivo Pro260 stain, membránové filtry a jednorázové mikrofluidní čipy. Každý čip může analyzovat 10 vzorků.



Obr. 22 - Zařízení na mikročipovou elektroforézu od firmy Bio-Rad

#### 3.5.3.2 Příprava vzorků a roztoků

Všechny roztoky byly uchovávané v ledničce, proto bylo třeba před použitím ustálit jejich teplotu na laboratorní. Poté byly jemně vortexovány a centrifugovány 3 – 5 sekund. V průběhu manipulace bylo třeba zabránit kontaktu roztoků se světlem.

#### Příprava barvicího roztoku, separačního gelu a vzorkového pufru

20  $\mu\text{l}$  Pro260 stain bylo přidáno k 520  $\mu\text{l}$  Pro260 gel do zkumavky s gelem. Směs byla vortexována a krátce centrifugována. Gelový roztok byl přefiltrován přes membránový filtr při 10 000 ot/min po dobu 5 minut. (Takto přefiltrovaný gelový roztok se může používat 4 týdny, potom je třeba jej znova přefiltrovat). Pro separování za redukčních podmínek se přidává do 30  $\mu\text{l}$  roztoku vzorkového pufru 1  $\mu\text{l}$   $\beta$ -merkptoethanolu. Za neredukujících podmínek se používá 1  $\mu\text{l}$  deionizované vody na 30  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru.

#### Příprava vzorků a proteinového standardu

Proteinový standard, který je součástí dodávané soupravy, byl připraven smícháním 2  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru a 4  $\mu\text{l}$  *Pro260 ladder* v mikrozkuavce. Stejně tak byly i ke vzorkům přidávány 2  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru. Směsi byly jemně vortexovány a krátce stočeny. Poté byly všechny vzorky povařeny 3 – 5 minut. Po vychladnutí byly opět krátce centrifugovány. Následně bylo přidáno 84  $\mu\text{l}$  deionizované vody *ReadyPrep™ proteomic grade water*. Po další centrifugaci byly vzorky připravené k nanášení na čip.

#### **3.5.3.3 Nanášení gelu a vzorků**

Čip byl nasazen na nanášecí gelovou stanicí a do jamky GS (nanášecí jamka) bylo napipetováno 12  $\mu\text{l}$  gelového roztoku. Nanášecí stanice byla uzavřena a byly nastaveny podmínky tlaku a času dle návodu k soupravě. Přístroj byl spuštěn a během jedné minuty byl gel připraven na použití.

Poté bylo opět 12  $\mu\text{l}$  přefiltrovaného gelového roztoku naneseno do čtyř jamek GS včetně jamky první. Stejný objem byl nanesen i do jamky G. Dále bylo naneseno 10 vzorků do jamek 1 – 10 vždy po 6  $\mu\text{l}$ . Každá jamka musela být zaplněna, jinak by analýza neproběhla.

#### **3.5.3.4 Analýza**

Byla spuštěna automatická elektroforetická stanice a následně také Experion software, čip byl umístěn dovnitř stanice na vyhrazené místo. V programu byla zvolena nová analýza *New run* a protokol *Experion Pro260*. Po stlačení tlačítka *Start* nastala analýza. Po skončení analýzy program oznámil ukončení nápisem *Run complete*. Na závěr bylo třeba očistit elektrody, naplnit čistící čip 800  $\mu\text{l}$  deionizované vody a tento umístit do automatické elektroforetické stanice, kde byl ponechán po dobu přibližně 60 sekund.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem předložené práce je detailní analýza jednotlivých aktivních látek obsažených v pivech různého původu a vyrobených odlišnou technologií. Práce byla koncipována jako screeningová studie, jejímž primárním záměrem bylo vytipovat analytické charakteristiky vhodné k posouzení autenticity českého piva a k jeho jednoznačnému odlišení od zahraničních piv vyrobených jinou než tradiční technologií. Jako potenciální markery autenticity byly posuzovány zejména fenolické látky a v podstatně menším rozsahu rovněž proteiny.

### 4.1 Chemická analýza hotového piva

V souvislosti s experimenty zaměřenými na identifikaci, kvantitativní analýzu a pokus o stanovení autenticity piva pomocí moderního instrumentálního vybavení bylo nejprve provedeno v sérii analyzovaných vzorků stanovení hlavních sladařsko-pivovarských parametrů charakterizujících kvalitu analyzovaných piv a surovin pro jeho výrobu. Do této skupiny analýz bylo zařazeno i stanovení skupinových parametrů – celkových plynfenolů celkových flavonoidů a celkové antioxidační aktivity.

#### 4.1.1 Antioxidační aktivita, celkové polyfenoly a celkové flavonoidy

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno u všech pokusných vzorků a dále u vybrané odrůdy českého chmele Sládek pomocí dvou chemických metod – ABTS a DPPH. Obě metody patří mezi metody nepřímé – výsledky nepostihují skutečný antioxidační potenciál piva *in vivo* (po jejich požití), ale jsou mu pouze úměrné.

V souvislosti s měřením antioxidační aktivity bylo u testovaných piv i chmele stanoveno množství celkových polyfenolů a flavonoidů, které jsou za antioxidační vlastnosti piva i antioxidační vlastnosti pivovarských surovin primárně zodpovědné. Obsah polyfenolů a flavonoidů byl navíc měřen ve dvou várkách sledovaných piv s výjimkou maďarských vzorků, jichž bylo k dispozici jen omezené množství (viz dále).

První metoda byla založena na reakci barevného radikálu 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazylu, který je v etanolovém roztoku v barevné radikálové formě. Jeho redukce se projevila odbarvením roztoku, které bylo měřeno spektrofotometricky při 525 nm, druhá testovaná využívala zhasení radikálového kationtu ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát), jenž byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem v poměru 2:1 za vzniku modrozeleného roztoku, jehož odbarvení vlivem antioxidantů bylo měřeno při 600 nm. Úbytek absorbance byl úměrný antioxidační aktivitě. V případě DPPH testu byla provedena kalibrace na kyselinu askorbovou a výsledky (získané z regresní rovnice kalibrační přímky uvedené v příloze č. 1) jsou proto vztaženy na tuto kyselinu.

Stanovení celkového obsahu polyfenolů bylo provedeno standardní, všeobecně doporučovanou a používanou fotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem (kap.3.2.2.1). Standardem byla kyselina gallová rozpuštěná v dest. vodě jako 0,6 M roztok.

Stanovení celkového obsahu flavonoidů bylo uskutečněno pomocí metody s hlinitou solí a dusitanem (kap.3.2.2.2), standardem byl 1 M roztok katechinu.

Kalibrační přímký kyseliny gallové a katechinu jsou součástí přílohy č. 2 a 3.

Tab. 9 - Výsledky stanovení skupinových antioxidačních parametrů zkoušených piv

Značka piva	Celková antioxidační aktivita		Celkové polyfenoly (mg/l)		Celkové flavonoidy (mg/l)		% flavonoidů z celkových polyfenolů
	ABTS (mmol/l)	DPPH (mg KA/l)	1.várka	2.várka	1.várka	2.várka	
<b>Piva česká lahvová</b>							
Bernard	0,840	-33,38 ±0,01	215,716 ±0,001	211,759 ±0,001	108,002 ±0,000	106,563 ±0,001	50,1
Bernard nealko	0,883	3,5 ±0,06	191,125 ±0,000	-	114,227 ±0,001	-	59,8
Braník	0,628	-2,78 ±0,02	176,327 ±0,001	175,493 ±0,000	88,050 ±0,001	87,764 ±0,000	49,9
Březňák	0,730	-2,75 ±0,02	167,782 ±0,001	175,077 ±0,004	80,762 ±0,000	81,433 ±0,000	48,1
Budvar Budweiser	0,801	-4,15 ±0,01	181,175 ±0,001	179,245 ±0,001	112,702 ±0,000	111,264 ±0,001	62,01
Budvar Budweiser nealko	1,078	-3,4 ±0,01	186,654 ±0,001	-	114,141 ±0,000	-	61,19
Gambrinus	1,036	-3,94 ±0,04	209,258 ±0,003	211,968 ±0,001	111,743 ±0,000	108,194 ±0,001	53,40
Plzen	0,611	-4,6 ±0,01	211,342 ±0,001	210,717 ±0,001	118,745 ±0,000	118,170 ±0,001	56,19
Staropramen nealko	0,730	-2,72 ±0,01	184,247 ±0,001	-	11222 ±0,001	-	60,91
Velkopopovický Kozel	1,078	-3,4 ±0,01	176,744 ±0,004	183,622 ±0,001	98,507 ±0,001	100,521 ±0,000	55,49
<b>Piva zahraniční lahvová</b>							
Heineken	0,526	-0,90 ±0,01	124,429 ±0,001	125,472 ±0,000	79,707 ±0,001	77,309 ±0,000	64,01
Stella Artois	0,552	-0,97 ±0,06	143,381 ±0,001	145,063 ±0,001	82,680 ±0,000	83,735 ±0,000	57,19
Zlatý Bažant	0,594	-2,66 ±0,07	163,196 ±0,001	168,407 ±0,000	97,067 ±0,000	98,219 ±0,000	61,19

Piva česká a zahraniční plechovková							
Braník	0,730	-2,84 ±0,04	176,744 ±0,002	174,868 ±0,001	108,002 ±0,000	106,564 ±0,000	50,32
Budvar Budweiser	1,095	-3,40 ±0,03	170,908 ±0,001	164,447 ±0,001	88,052 ±0,001	87,764 ±0,000	50,01
Gambrinus	1,052	-4,36 ±0,01	173,826 ±0,001	178,411 ±0,001	80,762 ±0,000	81,433 ±0,000	46,51
Plzen	0,781	-3,93 ±0,01	175,910 ±0,002	182,580 ±0,001	112,702 ±0,000	111,264 ±0,000	61,61
Velkopop. Kozel	0,764	-3,65 ±0,01	165,6 ±0,000	159,236 ±0,001	79,707 ±0,000	77,597 ±0,000	51,04
Arany Ászok	0,747	-3,48 ±0,01	165,906 ±0,001	-	83,064 ±0,001	-	56,08
Borsodi	0,781	-3,39 ±0,02	166,531 ±0,001	-	80,187 ±0,000	-	57,72
Stella Artois	0,526	-1,73 ±0,01	148,190 ±0,001	144,438 ±0,001	94,478 ±0,001	96,684 ±0,000	58,32
Szalon	0,798	-3,52 ±0,01	167,782 ±0,001	-	81,050 ±0,000	-	54,74
regresní rovnice	-	$y = -4,649x + 0,553$	$y = 1,5993 x$	$y = 3,4752 x$	-	-	-

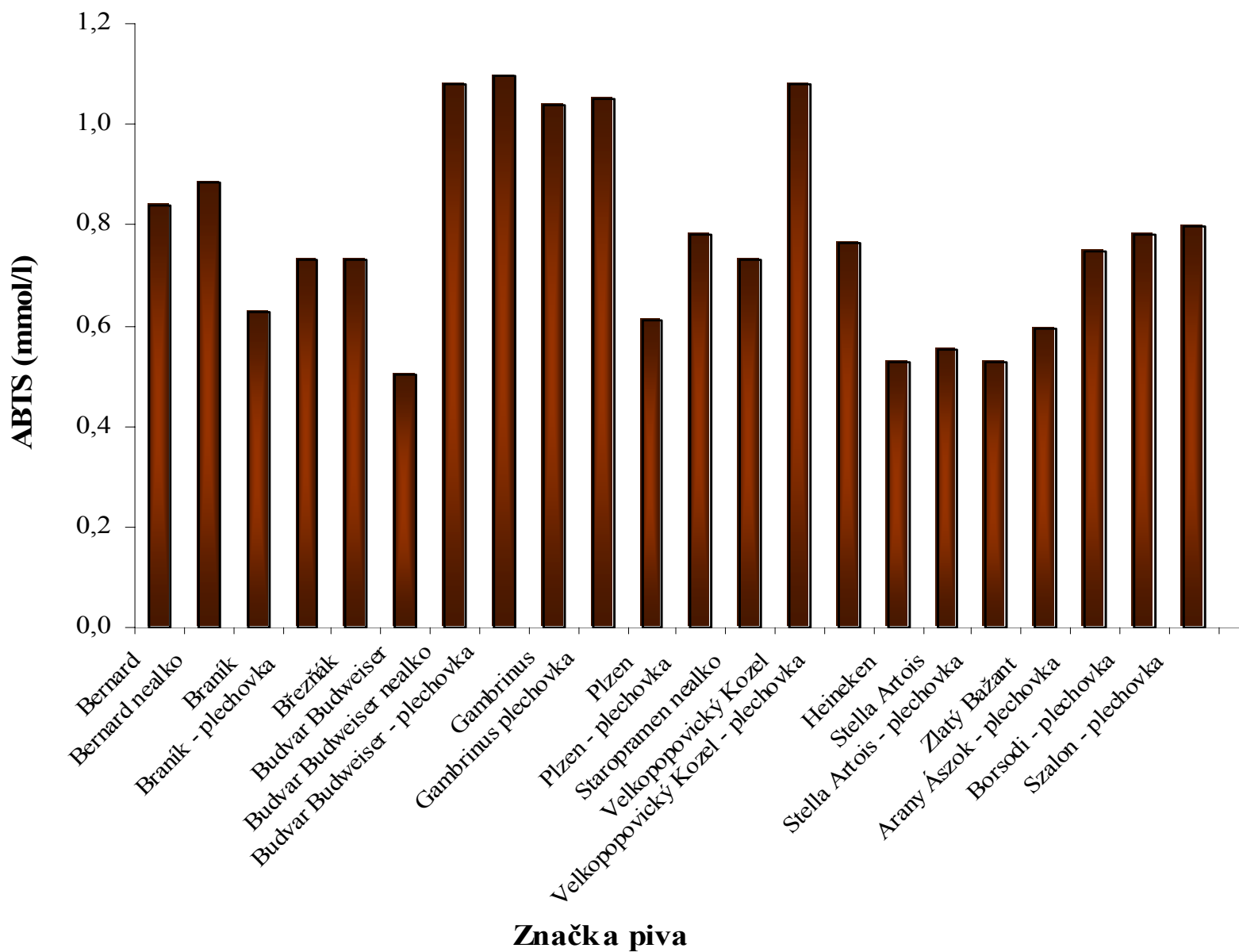
Tab. 9 uvádí získané výsledky včetně regresních rovnic a směrodatných odchylek s výjimkou ABTS stanovení, kdy všechny hodnoty byly u každého vzorku proměřeny jen jednou, kalibrační rovnice u ABTS není třeba.

Obsah celkových polyfenolů v českých pivech byl zjištěn v rozmezí 165,906 – 215,716 mg/l, obsah flavonoidů v rozmezí 78,615 - 118,745 mg/l. V případě zahraničních značek bylo rozmezí 124,429 -168,407 mg/l pro celkové polyfenoly a 77,309 - 98,219 mg/l pro celkové flavonoidy. U všech zahraničních značek byla tedy zaznamenána menší koncentrace uvedených látek. Získané hodnoty dále naznačují, že množství sledovaných látek se u různých šarží stejných značek pív významně nemění, stejně jako se neliší obsah látek v pivu lahvovém v porovnání s plechovkovým. Dle výpočtu procentuálního zastoupení flavonoidů z celkového množství polyfenolů vyplývá, že flavonoidy tvoří přibližně 50 – 60 % z celkového obsahu fenolických látek. Tento výsledek je však nutno posuzovat s určitou opatrností a považovat spíše za orientační, neboť stanovení obou skupin přírodních látek, zejména flavonoidů, fotometrickou metodou je málo specifické - převedení těchto látek do roztoku během extrakce není úplné, nerozlišuje se přítomnost volných a glykosidicky vázaných forem (v extraktech jsou v převaze glykosidy) a nelze zcela eliminovat jejich enzymatickou oxidaci, kterou se snižuje počet hydroxylových skupin. Minimální rozdíly mezi oběma várkami a různými značkami pív jsou patrné z grafů 2 – 5 sestrojených zvlášť pro láhve a zvlášť pro plechovky.

Zjištěné hodnoty antioxidační aktivity získané pomocí metody ABTS se pohybují v rozpětí hodnot 0,611 – 1,095 mmol/l pro česká piva a v rozpětí 0,526 – 0,798 mmol/l u zahraničních. Antioxidační aktivita všech proměřených zahraničních druhů piv je tedy opět nižší, než-li aktivita piv českých, což je v souladu se stanoveným nižším obsahem fenolických sloučenin. Rozdíly antioxidační aktivity zkoušených značek a jejich variant (láhev, nealko, plechovka) zobrazuje *graf 1*.

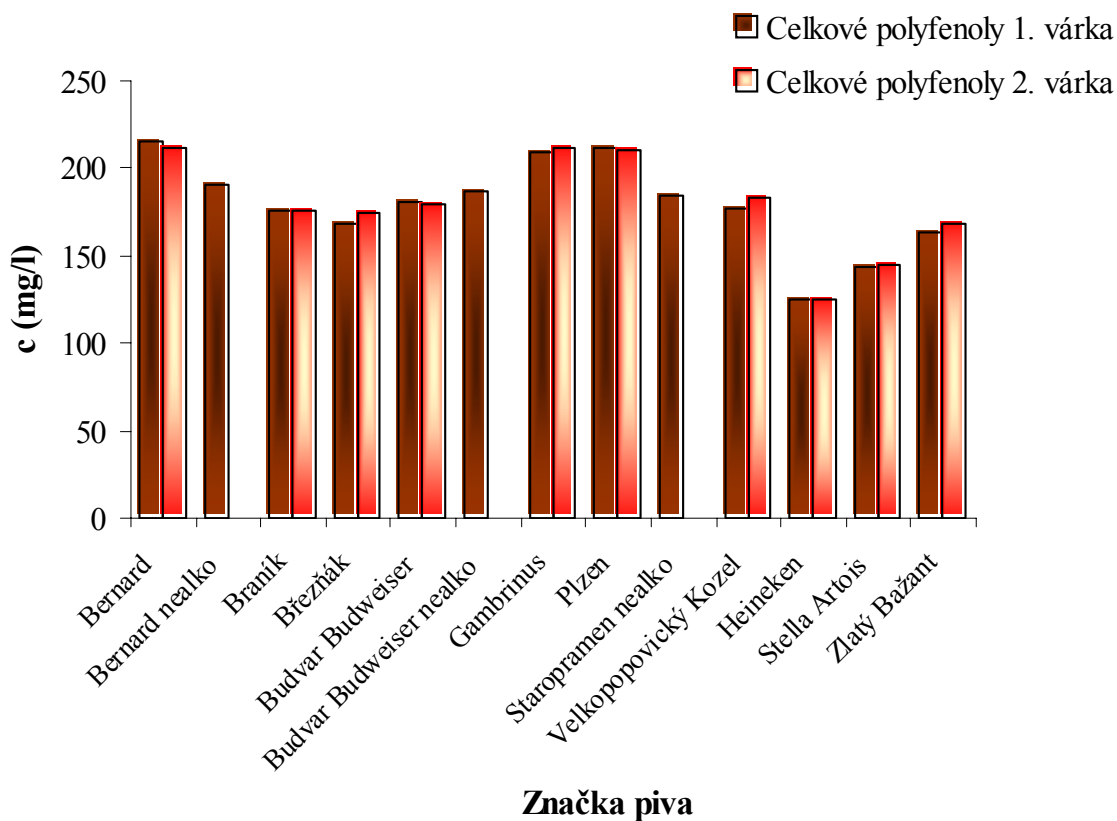
Výsledky testování antioxidačních vlastností pomocí metody DPPH poskytlo u všech vzorků záporné hodnoty (*Tab. 9*), což je dáno samotnou podstatou a provedením testu. Přestože byl postup proveden dle příručky pro pivovarnictví, s ohledem na získané výsledky se DPPH test jeví být pro hodnocení v pivovarnictví omezeně použitelný. Výsledky analýz jsou uvedeny pouze pro ilustraci.

# Antioxidační aktivita (ABTS v mmol/l) testovaných značek piv



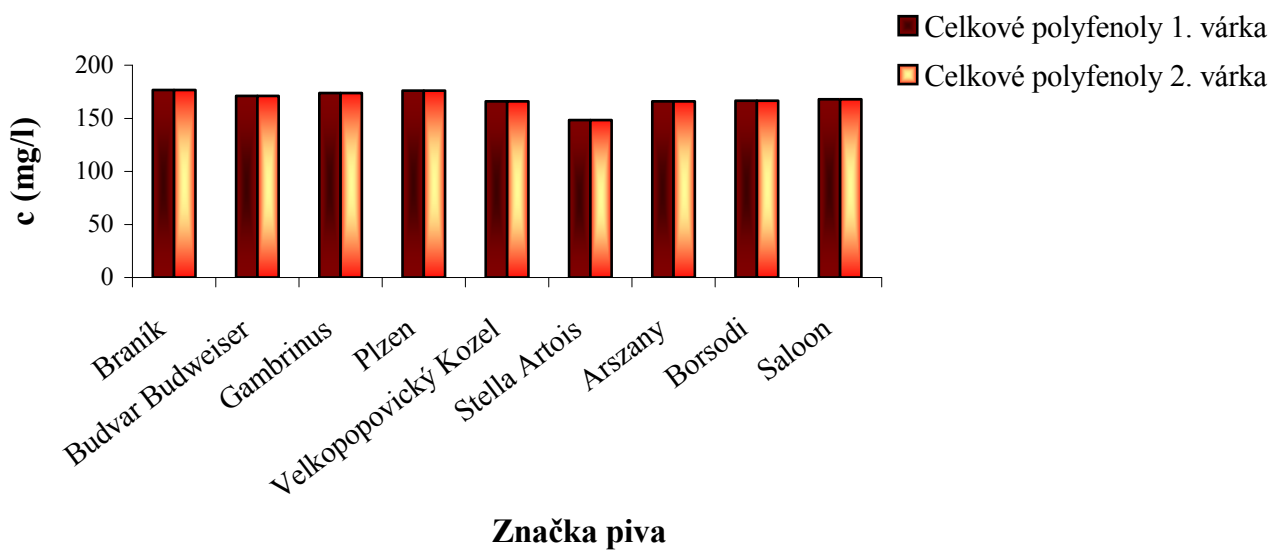
Graf 1 - Výsledky testu ABTS

### Celkové polyfenoly - lahvová piva



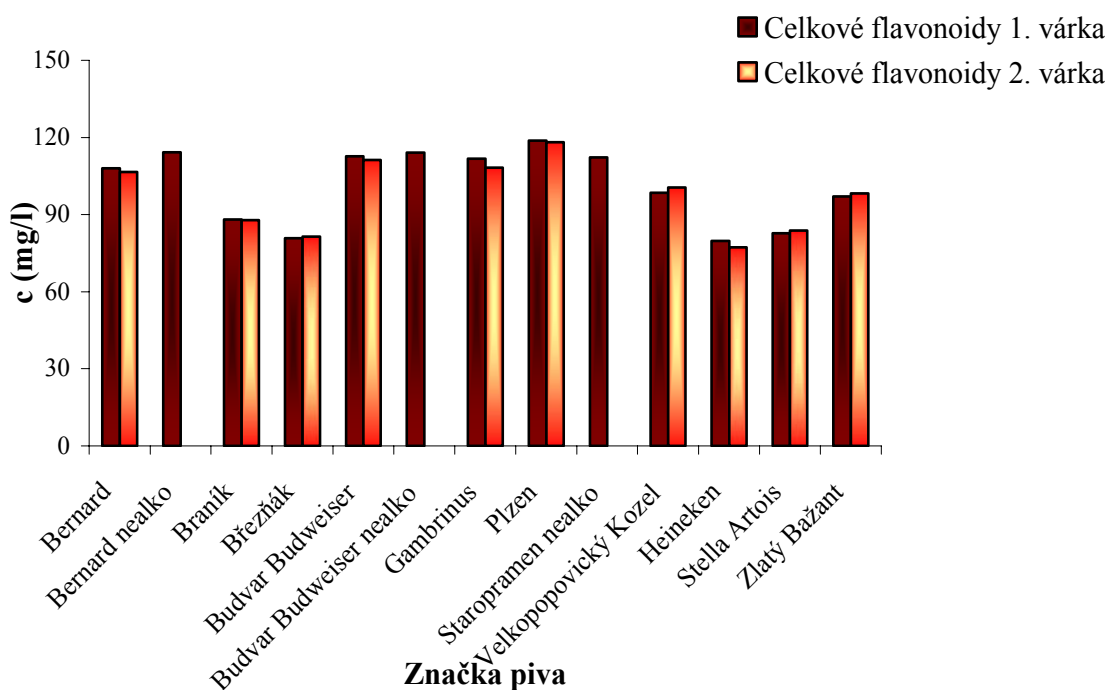
Graf 2 - Výsledky stanovení celkových polyfenolů u lahvových piv

### Celkové polyfenoly - plechovková piva



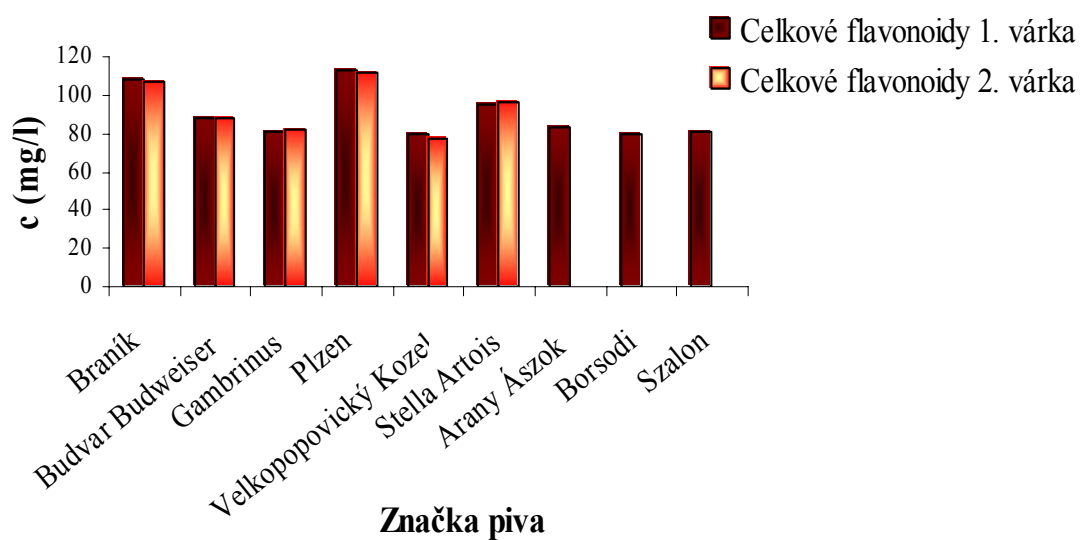
Graf 3 - Výsledky stanovení celkových polyfenolů u plechovkových piv

## Celkové flavonoidy - lahvová piva



Graf 4 - Výsledky stanovení celkových flavonoidů lahvových piv

## Celkové flavonoidy - plechovková piva



Graf 5 - Výsledky stanovení celkových flavonoidů u plechovkových piv

#### 4.1.2 Hořké látky

Pro studium hořkých látek byly vzorky piva upraveny dle kap. 3.2.1.3. V získaném isooktanovém extraktu bylo stanoveno celkové množství jednotek hořkosti podle EBC (kap.3.2.3.1) (1 jednotka EBC odpovídá přibližně 1 mg hořkých látek v jednom litru piva) a podíl isosloučenin metodou podle Klopopera (kap. 3.2.3.2) dle vztahů uvedených ve studované literatuře (50). Výsledné hodnoty jsou shrnuty v *Tab. 10, 11* a naznačují, že i v hořkosti existují rozdíly mezi českými pivy a pivy jiných typů. Nejvyšší množství hořkých látek bylo zjištěno u piva značky Bernard – tj. 28 EBC, z čehož 93 % tvoří isosloučeniny, nejnižší koncentrace byla stanovena u piva Heineken, kde isosloučeniny představovaly 81,80 %. Srovnání výsledků pro jednotlivé značky zachycují *grafy 6 a 7*.

Zdrojová data pro výpočty těchto parametrů (absorbance) byla měřena pomocí moderního poloautomatického spektrometru, díky němuž směrodatná odchylka stanovení nepřesáhla 0,1 %, proto nejsou v tabulce *Tab. 9* směrodatné odchylky zaznamenány.

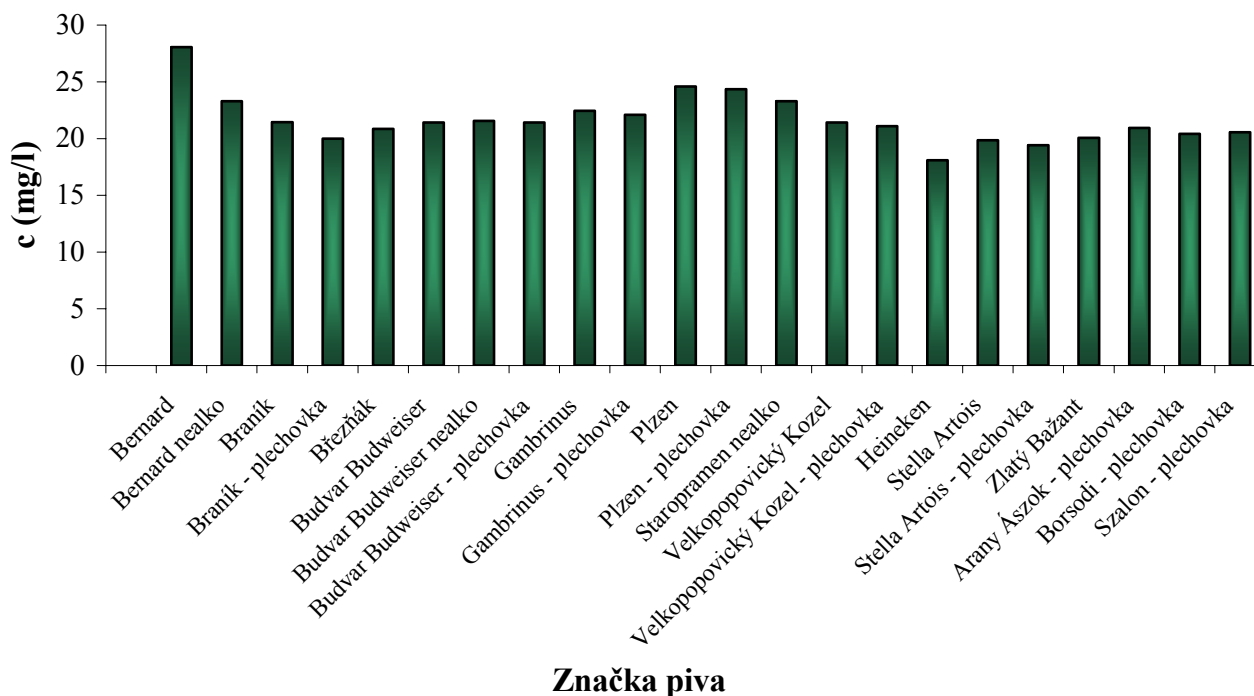
*Tab. 10 - Výsledky stanovení celkového množství hořkých látek a množství isosloučenin*

Značka piva	Isosloučeniny (mg/l)	Celkové hořké látky (mg/l)	% isosloučenin z celkového množství hořkých látek
<b>Piva česká lahvová</b>			
Bernard	26,19	28,05	93,37
Bernard nealko	26,13	23,30	86,89
Braník	18,64	21,45	93,33
Břežňák	17,95	20,85	86,10
Budvar Budweiser	18,58	21,40	86,83
Budvar Budweiser nealko	18,75	21,55	87,02
Gambrinus	19,78	22,45	88,12
Plzen	22,24	24,60	90,42
Staropramen nealko	20,76	23,3	89,08
Velkopopovický Kozel	18,58	21,40	86,83
<b>Piva zahraniční lahvová</b>			
Heineken	14,81	18,10	81,80
Stella Artois	16,81	19,85	84,68
Zlatý Bažant	17,04	20,05	84,97

Tab. 11 - Výsledky stanovení celkového množství hořkých látek a množství isosloučenin

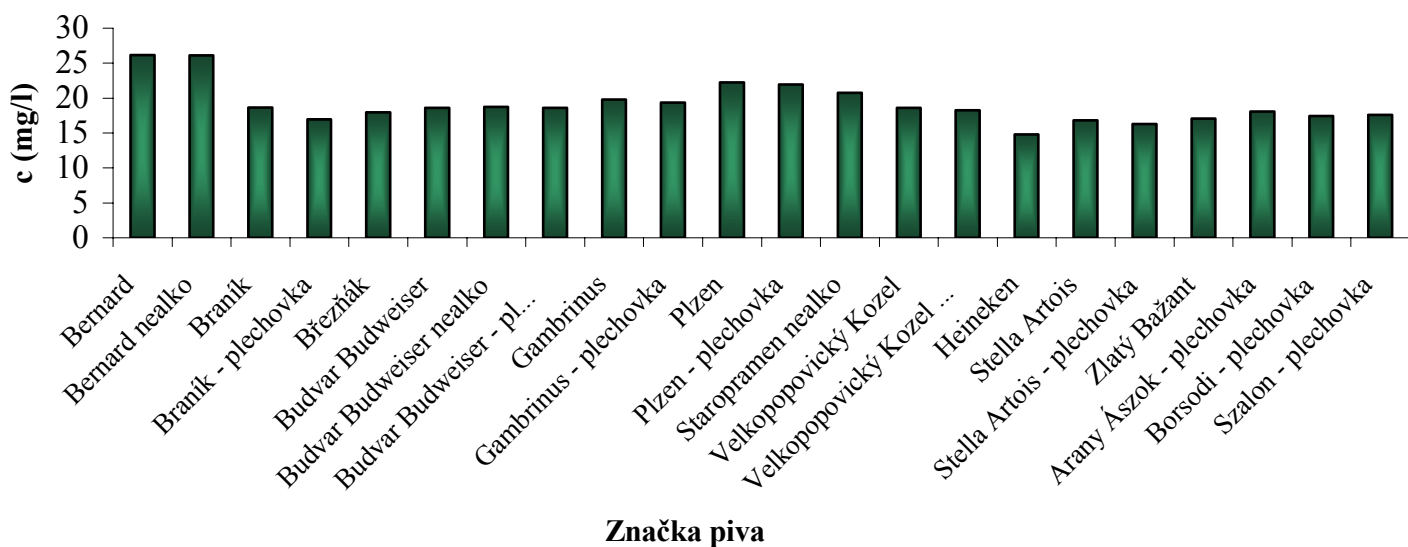
Piva česká a zahraniční plechovková			
Braník	16,98	20,00	84,90
Budvar Budweiser	18,58	21,40	86,83
Gambrinus	19,38	22,10	87,70
Plzen	21,97	24,35	90,17
Velkopopovický Kozel	18,24	21,10	86,44
Arany Ászok	18,07	20,95	86,24
Borsodi	17,44	20,40	85,48
Stella Artois	16,29	19,40	83,99
Szalon	17,61	20,55	85,70

### Celkové hořké látky



Graf 6 - Výsledky stanovení celkových hořkých látek u testovaných piv

## Isosloučeniny



Graf 7 - Výsledky stanovení isosloučenin u testovaných piv

Podíl isosloučenin z celkového množství hořkých látek se u všech zkoušených vzorků pohyboval přibližně kolem 90 %, což dokazuje, že hořkost piva je závislá právě na obsahu isosloučenin, které zahrnují především iso- $\alpha$ -hořké kyseliny a v menší míře i některé další deriváty hořkých kyselin chmele včetně jejich oxidačních produktů.

### 4.1.3 Stanovení podílu extraktu, obsahu alkoholu, stupňovitosti a stupně prokvašení

Za účelem analýzy pivovarských parametrů dominantně zodpovědných za nejdůležitější chuťovou vlastnost piva - plnost chuti byl ve zkoumaných vzorcích stanoven skutečný a zdánlivý extrakt, stupňovitost, skutečné a zdánlivé prokvašení a obsah alkoholu.

Pojem extrakt je velmi široký - zahrnuje nesčetné množství různých složek, proto je účelné rozlišovat pojem skutečný a zdánlivý. Skutečný extrakt je skutečným obsahem všech extraktivních látek v pivě a souvisí se stupněm prokvašení. Čím je prokvašení hlubší, tím je skutečný extrakt nižší. Ethanol snižuje číselnou hodnotu extraktu tím více, čím více alkoholu pivo obsahuje, a proto je zdánlivý extrakt vždy nižší než extrakt skutečný, neboť se měří v pivu téměř neupraveném.

Skutečný extrakt byl stanoven pyknometricky dle postupu uvedeného v kap. 3.2.3.3 po oddestilování alkoholu a doplnění destilovanou vodou na původní hmotnost vzorku. Zdánlivý extrakt byl stanoven rovněž pyknometricky v pivu zbaveném pouze oxidu uhličitého, alkohol byl stanoven taktéž pyknometricky v získaném destilátu. Na základě vztahů mezi těmito hodnotami byly dále vypočteny ostatní uvedená kritéria.

Tab. 12a: Výsledky stanovení podílu extraktu, obsahu alkoholu, stupňovitosti a stupně prokvašení

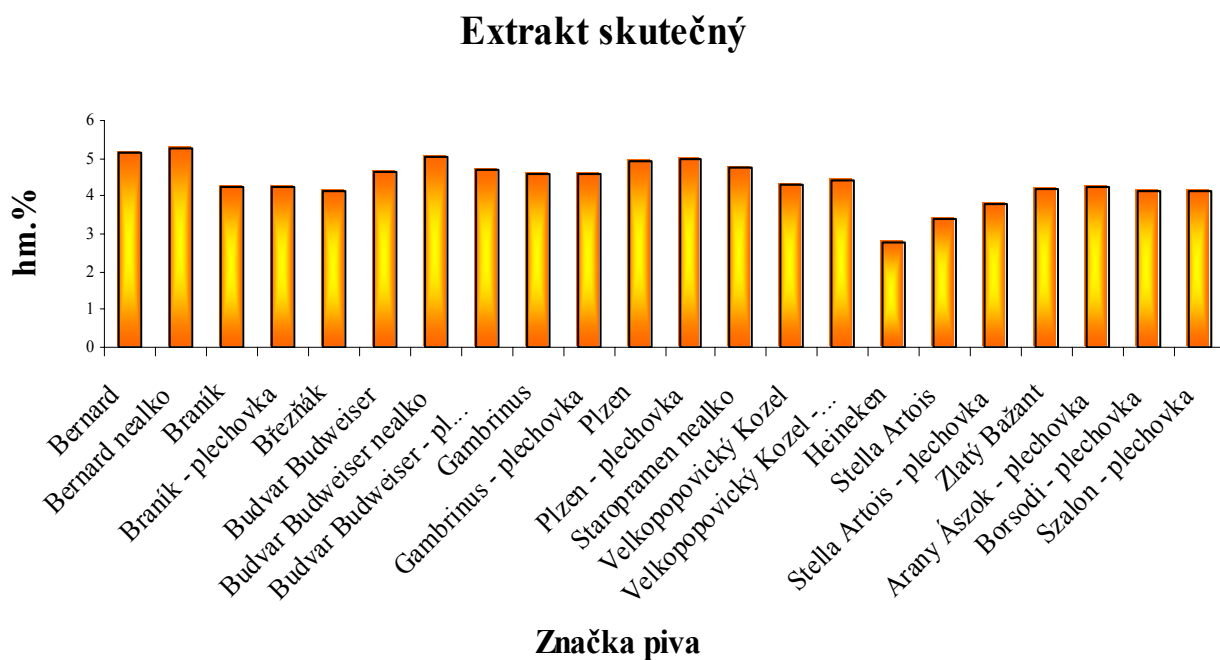
Značka piva	Extrakt (hm. %)		Obsah alkoholu (obj. %)	Stupňovitost	Prokvašení (hm. %)	
	skutečný	zdánlivý			skutečné	zdánlivé
<b>Piva česká lahvová</b>						
Bernard	5,14	3,88	3,44	11,96	56,55	67,20
Bernard nealko	5,27	4,08	0,01	-	55,71	65,71
Braník	4,27	3,69	3,90	12,22	63,81	68,72
Březňák	4,13	2,98	3,65	11,79	64,46	74,35
Budvar Budweiser	4,66	3,86	3,72	12,13	4,66	3,86
Budvar Budweiser nealko	5,06	4	0,00	-	57,26	66,21
Gambrinus	4,56	3,02	3,53	11,69	61,58	74,56
Plzen	4,93	3,48	3,76	12,08	58,85	70,95
Staropramen nealko	4,77	3,81	0,00	-	59,92	67,98
Velkopopovický Kozel	4,28	3,71	3,75	11,98	63,73	68,56
<b>Piva zahraniční Lahvová</b>						
Heineken	2,75	2,02	4,51	11,86	76,27	82,57
Stella Artois	3,4	3,05	4,18	11,70	71,14	74,11
Zlatý Bažant	4,2	3,38	3,93	11,91	64,04	71,06

Z výsledků získaných v této sérii experimentů je rovněž patrný poměrně významný rozdíl zahraničních značek piv od piv českých. Česká piva mají ve všech případech, s výjimkou značky Březňák, vyšší zdánlivý extrakt než-li ostatní – a tomu také odpovídá nižší obsah alkoholu. Nejvyšší zbytkový extrakt byl stanoven u piv nealkoholických, zřejmě díky odlišnému způsobu výroby, kdy kvašení bývá předčasné ukončeno.

Tab. 12b: Výsledky stanovení podílu extraktu, obsahu alkoholu, stupňovitosti a stupně prokvašení

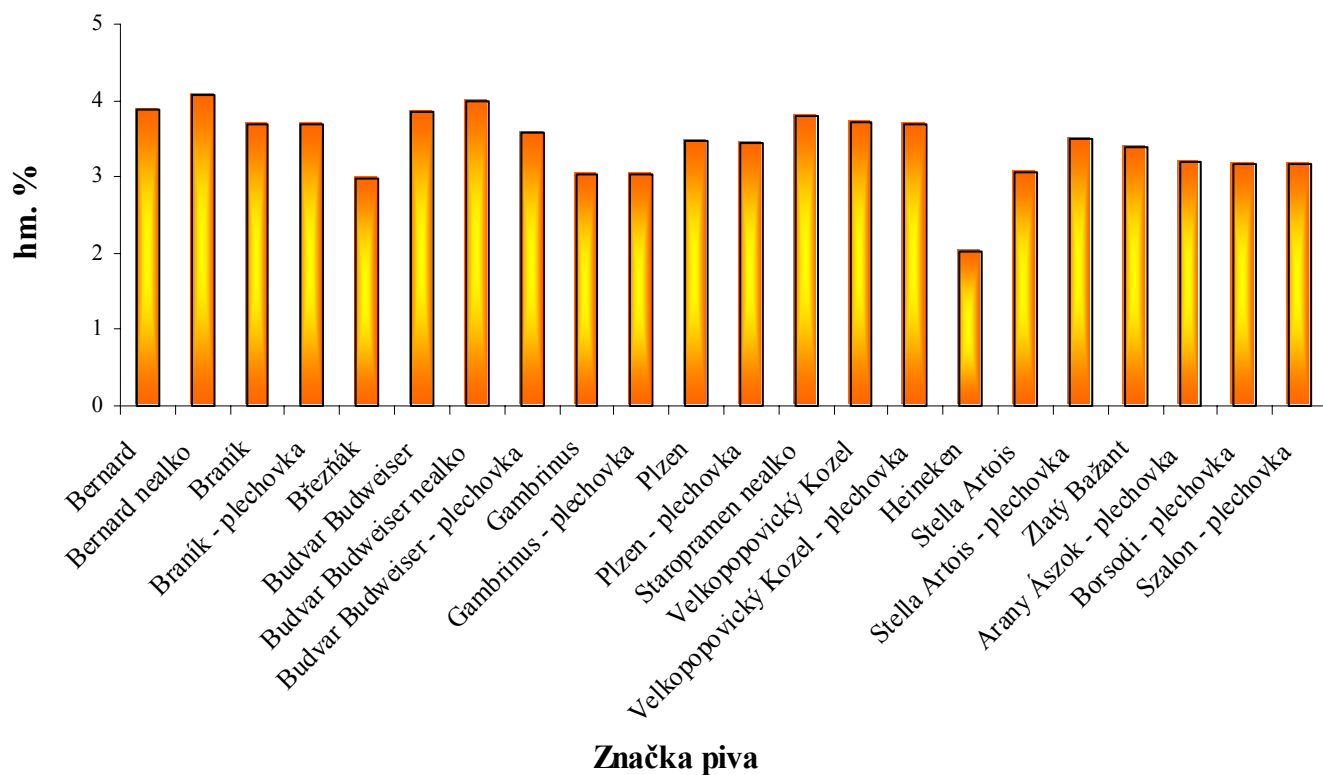
Piva česká a zahraniční Plechovková						
Braník	4,27	3,69	3,74	11,83	63,04	67,46
Budvar Budweiser	4,67	3,57	3,58	11,74	60,95	68,65
Gambrinus	4,56	3,02	3,70	12,00	59,58	72,94
Plzen	4,96	3,44	3,47	11,96	58,91	71,50
Velkopopovický Kozel	4,42	3,7	3,72	11,82	62,35	68,48
Arany Ászok	4,27	3,21	3,76	11,89	63,54	72,59
Borsodi	4,13	3,17	3,78	11,72	64,58	72,81
Stella Artois	3,79	3,49	4,00	11,75	68,31	70,82
Szalon	4,15	3,17	3,78	11,73	64,92	73,20

Výsledky vyhodnocení naměřených hodnot a jejich srovnání dokumentuje Tab. 12a,b a grafy 8 – 12.



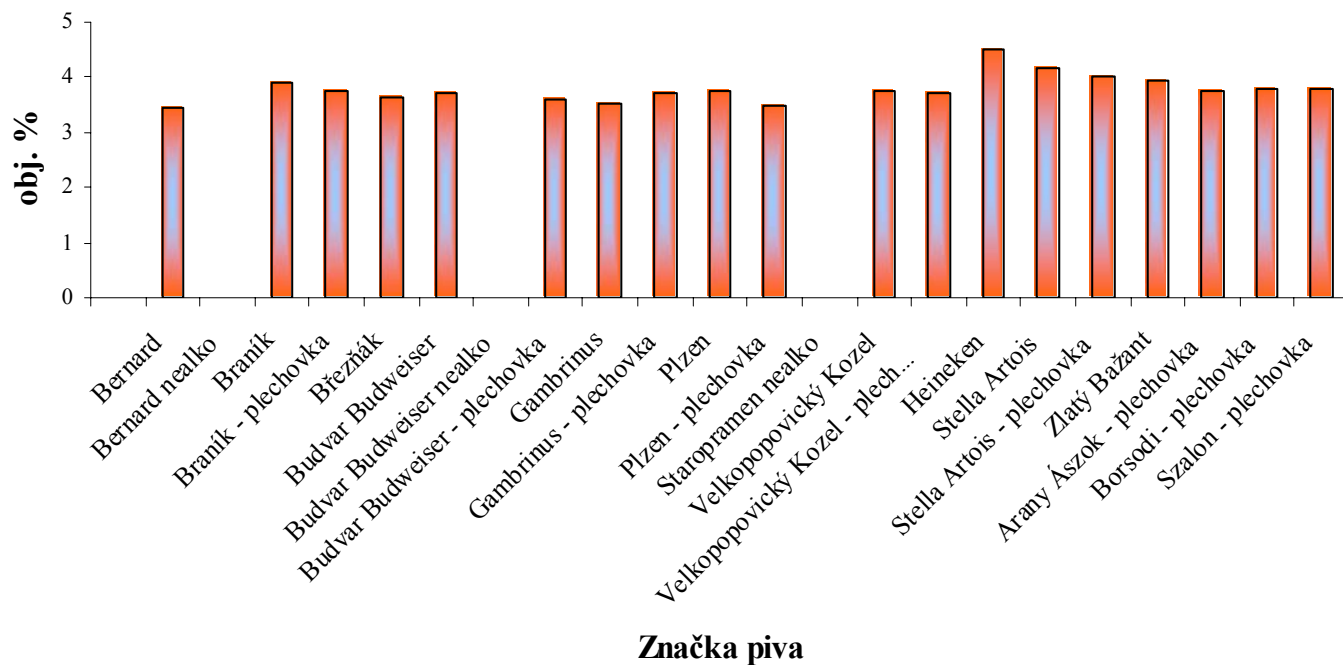
Graf 8 - Výsledky stanovení skutečného extraktu u testovaných piv

## Extrakt zdánlivý



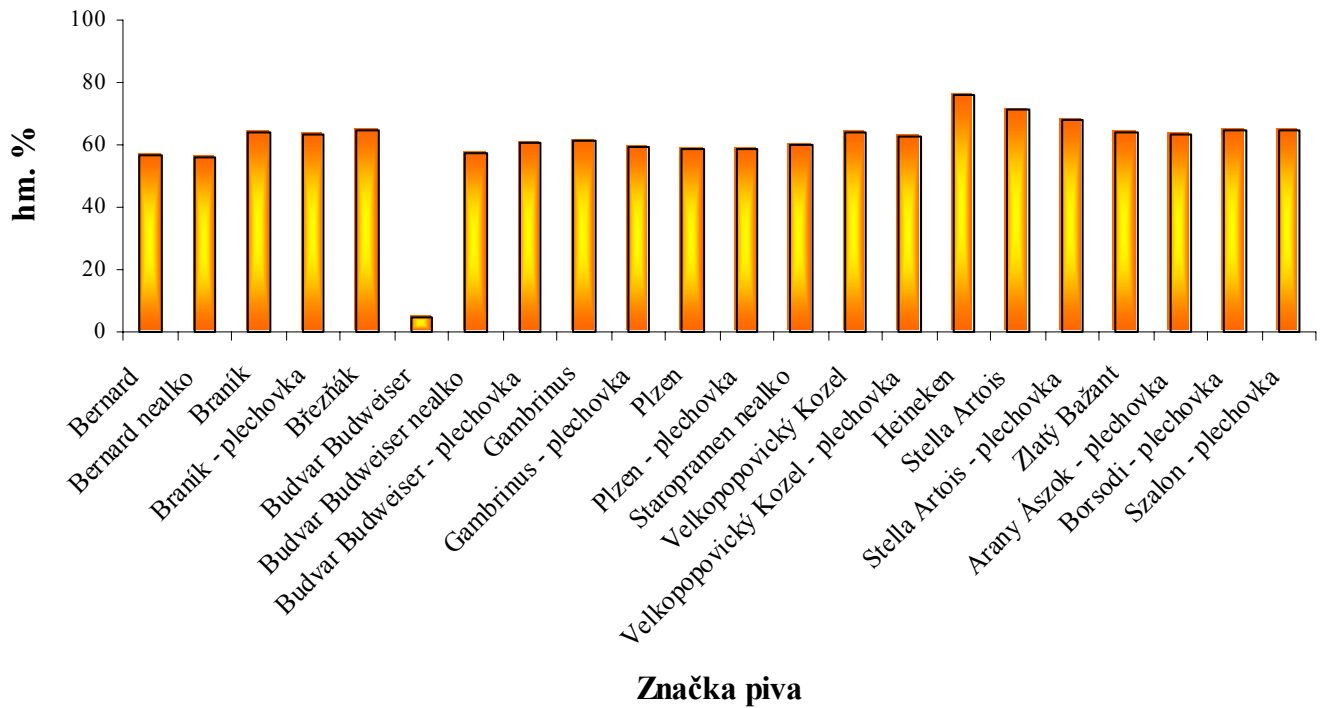
Graf 9 - Výsledky stanovení zdánlivého extraktu u testovaných piv

## Obsah alkoholu



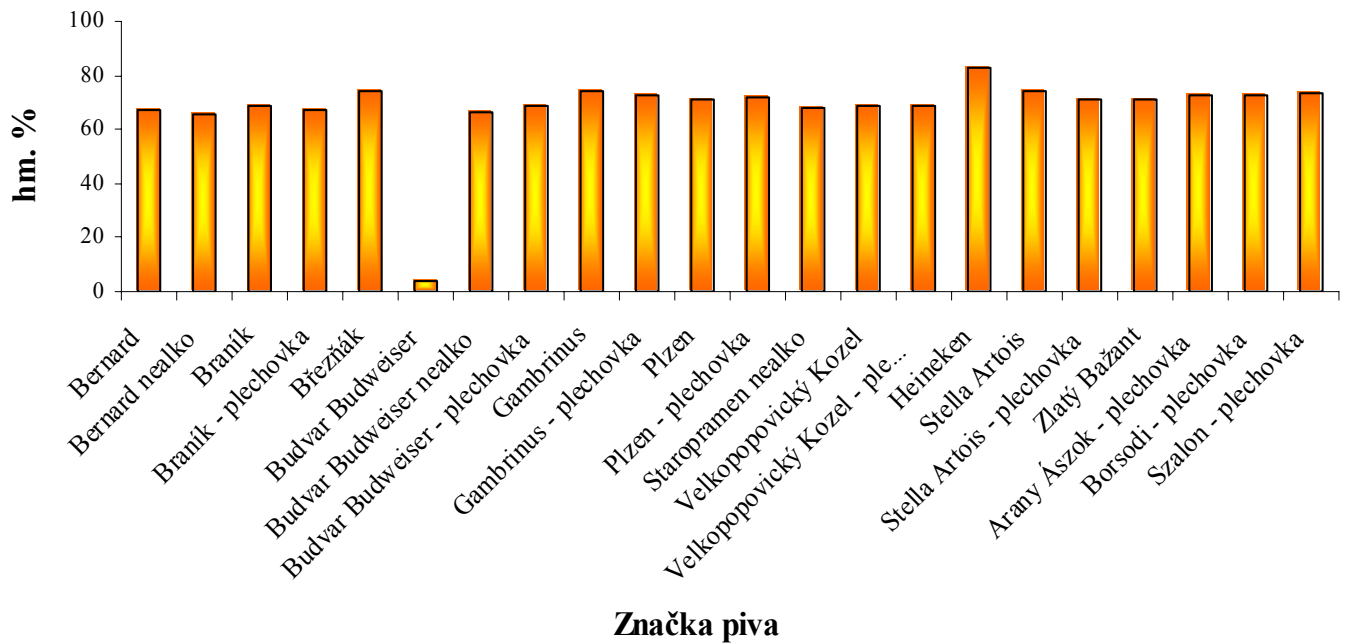
Graf 10 - Výsledky stanovení obsahu alkoholu u testovaných piv

## Prokvašení skutečné



Graf 11 - Výsledky stanovení skutečného prokvašení u testovaných piv

## Prokvašení zdánlivé



Graf 12 - Výsledky stanovení celkových celkových hořkých látek u testovaných piv

Výpočty skutečného i zdánlivého prokvašení vycházely ze stejných dat jako určení extraktu, proto jsou tyto hodnoty opět nejvyšší u značky Bernard nealko tj. 5,27, nejnižší u Heinekena tj. 2,75. Legislativním požadavkem je, aby skutečný stupeň prokvašení činil alespoň 50 % (pouze u piv speciálních, tmavých nebo přislažovaných cukrem a sirobem se připouští výjimka), a tak všechny zkoumané vzorky tuto podmínku splňují.

Stupňovitost byla stanovena pouze pro piva alkoholická, neboť pro piva bez alkoholu nebyly k dispozici příslušné hodnoty korekčních faktorů. Zjištěná stupňovitost je vyjádřením obsahu skutečného extraktu v mladině a je přibližně rovna součtu dvojnásobku přítomného alkoholu a skutečného extraktu v pivě. V souboru testovaných piv se pohybuje v rozmezí 11,69 – 12,22. Výpočet byl proveden podle Ballingova vzorce, kdy se ve výsledku opět připouští malá odchylka – tj. 0,5 %. I tento parametr byl tedy u všech piv dodržen. Pro vypočtenou stupňovitost graf z praktických důvodů sestrojen nebyl.

## 4.2 Chromatografické separace flavonoidních sloučenin

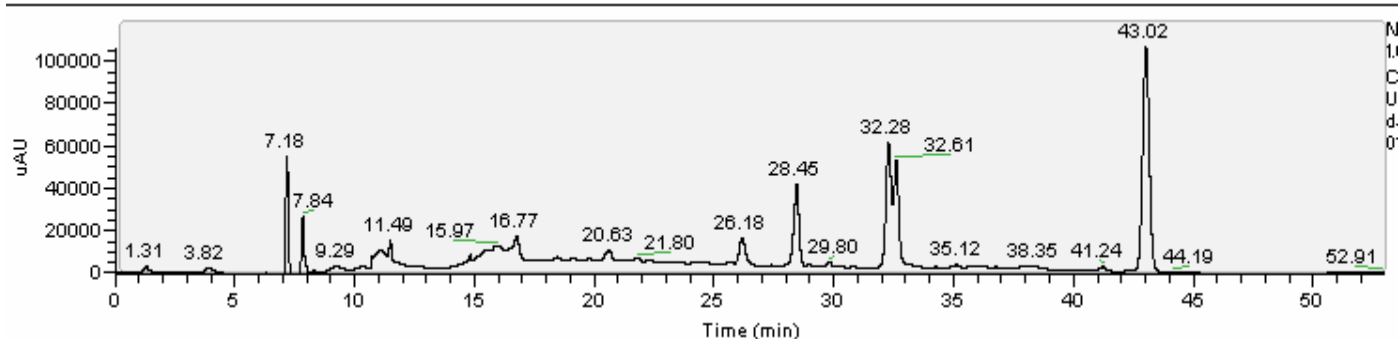
### 4.2.1 Optimalizace poměru rozpouštědel v mobilní fázi

Při optimalizaci separace jednotlivých látek bylo na chromatografickou kolonu aplikováno několik kombinací mobilních fází obsahujících kombinaci ACN + 1% kyselina octová nebo methanol + 1% kyselina octová v různých poměrech za isokratických i gradientových podmínek. Jako nejlepší byl vybrán gradient o pH 4 uvedený v *Tab. 13, Obr. 23*. Zvolené nastavení gradientové eluce směsi standardů pak umožnilo postupnou separaci polyfenolických sloučenin v reálných vzorcích.

Na vstupu A gradientového čerpadla byla dávkována 1% kyselina octová, na vstupu D byl dávkován acetonitril nebo methanol. Eluce probíhala na koloně Restek C18 Ultra Aqueous při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Analýza probíhala 10 -58 minut. Byly nastaveny 3 vlnové délky – 280 nm, 330 nm a 365 nm s frekvencí proměření 1 Hz. Absorpční maximum všech analyzovaných standardních látek bylo při 280 nm.

*Tab. 13 - Průběh gradientové eluce*

	<i>Časový úsek</i>	<i>Mobilní fáze: 1% kyselina octová :ACN</i>
1. Lineární gradient	3 min	60-57 % kys. Octové : 40-43 % ACN
2. Lineární gradient	20 min	57-55 % kys. octové:43-45 % ACN
3. Lineární gradient	10 min	55-45 % kys. octové:45-55 % ACN
4. Izokratický průtok	30 min	45 % kys. octové:55 % ACN



Obr. 23 - Separace směsi standardních látek při zvolené gradientové eluci

#### 4.2.2 Výběr chromatografické kolony

Separace polyfenolů byla dále testována na třech typech kolon (kap. 3.3.1.2, Tab. 4). Nejlepší separace složek směsi standardů za výše uvedených gradientových podmínek (kap. 4.2.1, Tab. 12) byla sledována při využití kolony Restek, proto byla tato kolona používána v dalších analýzách standardních i reálných vzorků.

#### 4.2.3 Optimalizace izolace polyfenolických látek z piva

Pro volbu vhodného zakoncentrování zkoumaných látek byly testovány 4 úpravy vzorků popsané v metodické části (kap 3.2.1). Po provedení LC/MS analýz vzorků získaných lyofilizací došlo k významným ztrátám mnohých fenolických látek, proto byl tato varianta z možných úprav vyloučena, stejně jako SPE extrakce, která byla celkově zhodnocena jako nejméně vhodný izolační postup, neboť získané výsledky byly značně neuspokojivé. Analýza byla velmi málo citlivá – zřejmě kvůli rozředění vzorku kyselinou chlorovodíkovou, přičemž množství přidané HCl nemělo na kvalitu získaných hmotnostních chromatogramů resp. spekter žádný výrazný vliv.

Nejlepší odezva detekovaných látek byla zaznamenána po extrakci ethylacetátem, kdy došlo především k odstranění nežádoucího šumu. Výjimku tvořily pouze látky ze skupiny katechinů (epikatechin, katechin, epikatechingallát, pigalokatechin, epigallokatechin gallát, katechin gallát), jež byly nejlépe separovány přímo ve vodné fázi po aplikaci mikrofiltrace, proto byla ve všech později prováděných analýzách a u všech zkoumaných vzorků využívána jak ethylacetátová extrakce, tak i mikrofiltrace.

### 4.3 Optimalizace parametrů MS detekce

Nejprve byla provedena kalibrace hmotnostního detektoru dle pokynů výrobce, a to pomocí standardních roztoků kofeinu, MRFA a směsi Ultramark (kap. 3.3.2).

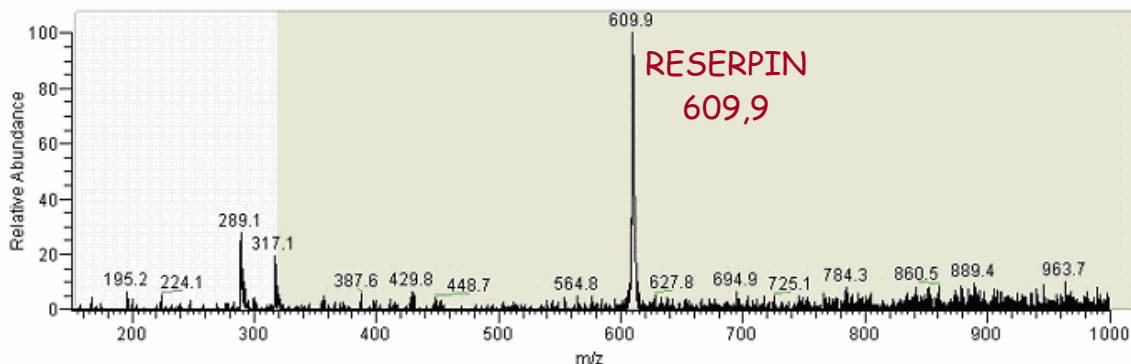
Kalibrace samotná k získání uspokojivých výsledků nestačí. Je nutné nastavit parametry analýzy tak, aby co nejvíce vyhovovaly struktuře sloučenin dané skupiny stanovovaných látek

a aby odezva i citlivost přístroje při snímání hmotnostního spektra byla co nejvyšší. Postupným laděním detektoru na určitý analyt dochází k nastavení optimálních hodnot parametrů přístroje.

Před laděním na požadovaný analyt je vhodné provést ladění pomocí výrobcem dodávaného standardu reserpinu. Výrobce garantuje, že po naladění přístroje na reserpin jsou parametry detektoru nastavené tak, aby bylo možné s určitou sníženou citlivostí stanovit většinu sloučenin detekovatelných daným typem ionizace.

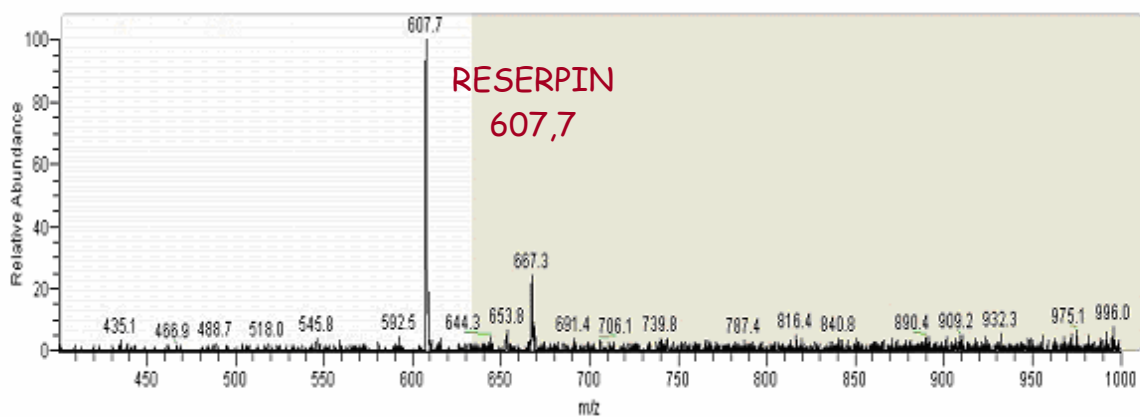
#### 4.3.1 Stanovení MS spekter reserpinu

Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.3.3 v *Tab. 5*. Použitou mobilní fází byla směs o složení methanol:1% kyselina octová v poměru 80:20 pro kladný mód a methanol:0,25% amoniak rovněž v poměru 80:20 pro záporný mód. Byla získána spektra v režimech MS full scan a MS/MS full scan po aplikaci kolizní energie 45 % pro kladný mód a 40 % pro záporný mód. Získaná hmotnostní spektra reserpinu ukazují *Obr.: 24 - 28*.



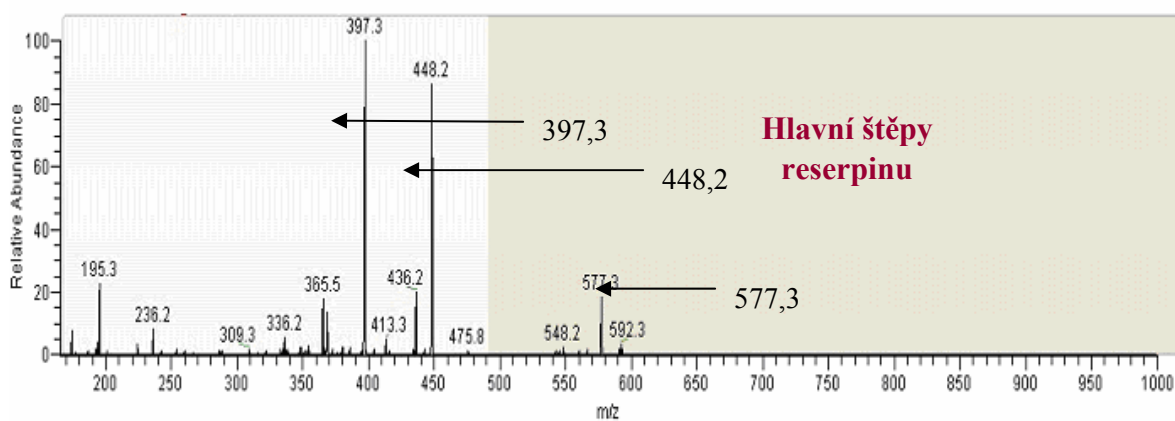
*Obr. 24 - Spektrum reserpinu-MS full scan, kladný mód*

V kladném módu se reserpin zobrazuje jako kladný ion s Mr 609,9, přičemž zvýšení relativní molární hmotnosti je důsledkem navázání vodíku (protonace molekuly na N-H skupině indolu) při ionizaci. Protože náboj vzorku je ve většině případů ionizace elektrosprejem roven 1, je poměr  $m/z$  odečtený ze spektra roven molární hmotnosti  $\pm 1$  v závislosti na snímání kladných nebo záporných iontů.



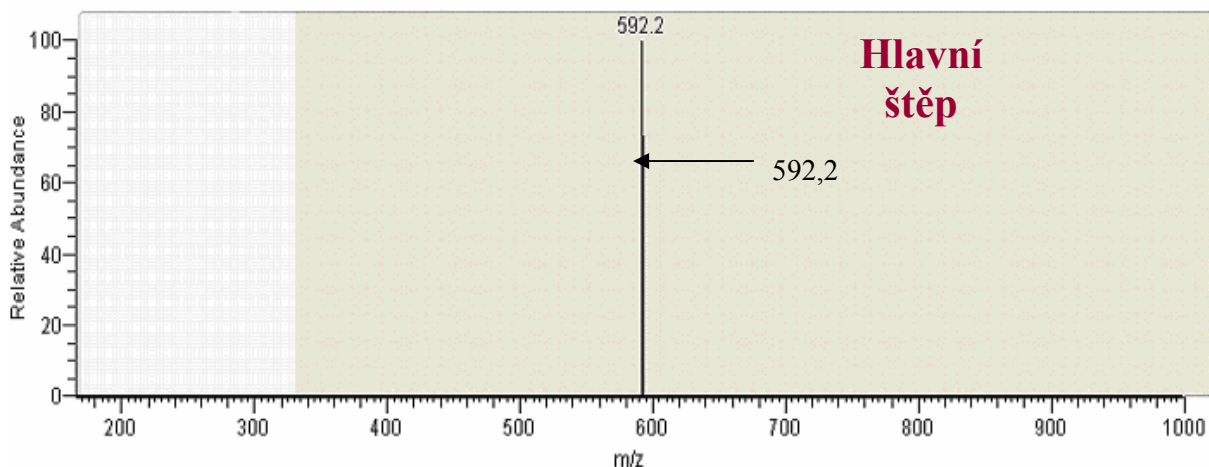
Obr.25 - Spektrum reserpinu-MS full scan, záporný mód

V záporném módu je reserpin ionizován odštěpením vodíku N-H skupiny na cyklu indolu, ve spektru je tak patrný v podobě záporně nabitého ionu s  $m/z$  607,7.



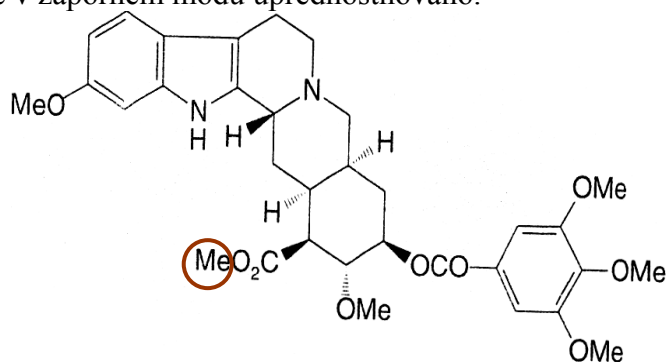
Obr. 26 - Spektrum reserpinu-MS/MS full scan, kladný mód

V případě reserpinu byly ve spektru opakovaně pozorovány štěpy 577,3; 448,2 a 397,3, čímž výrobce deklaruje, že naladění přístroje je správné.



Obr. 27 - Spektrum reserpinu-MS/MS full scan, záporný mód

V záporném módu byl zpozorován jen jeden fragment. Jestliže odečteme jeho Mr od Mr parentálního iontu, získáme hodnotu 15,5, která pravděpodobně značí odštěpení methylové skupiny (Obr. 28, jež je v záporném módu upřednostňováno).



Obr. 28 - Molekula reserpinu s vyznačenou odstupující methylovou skupinou [54]

#### 4.4 Optimalizace podmínek MS detekce polyfenolických látek

Naladěním hmotnostního detektoru na reserpin je sice možné měřit široké spektrum látek, avšak pro dostatečné rozlišení cílového analytu třeba doladit přístroj pomocí vybrané-strukturně podobné sloučeniny, za účelem zvýšení citlivosti detekce.

Ze skupiny polyfenolických látek byla nejprve vybrána kyselina chlorogenová – doporučovaná jako nejvhodnější pro následně prováděné typy analýz a poté epikatechin, který měl nejlepší odezvu při chromatografické separaci ([55]). Jelikož nebyl v kladném ani záporném módu pozorován dostatečný odpovídající signál kyseliny chlorogenové, (tj.  $m/z$  - 355) při žádné z připravených koncentrací, byl použit epikatechin, jehož záznam byl mnohem kvalitnější.

Pomocí epikatechinu byla automatickým nastavením v ovládacím softwarovém programu Xcalibur příkazem Tune plus → Control → Calibrate → Automatic vytvořena a uložena metoda se specifikovanými parametry uvedenými v kap. 3.4.1, tab. č. 7. Za optimální byl zvolen kladný

mód, v němž byl pozorován intenzivní a stálý *kvazi*-molekulární ion epikatechinu o  $m/z = 291$ , zatímco v módu záporném byl signál ( $m/z = 289$ ) velmi slabý a nestabilní.

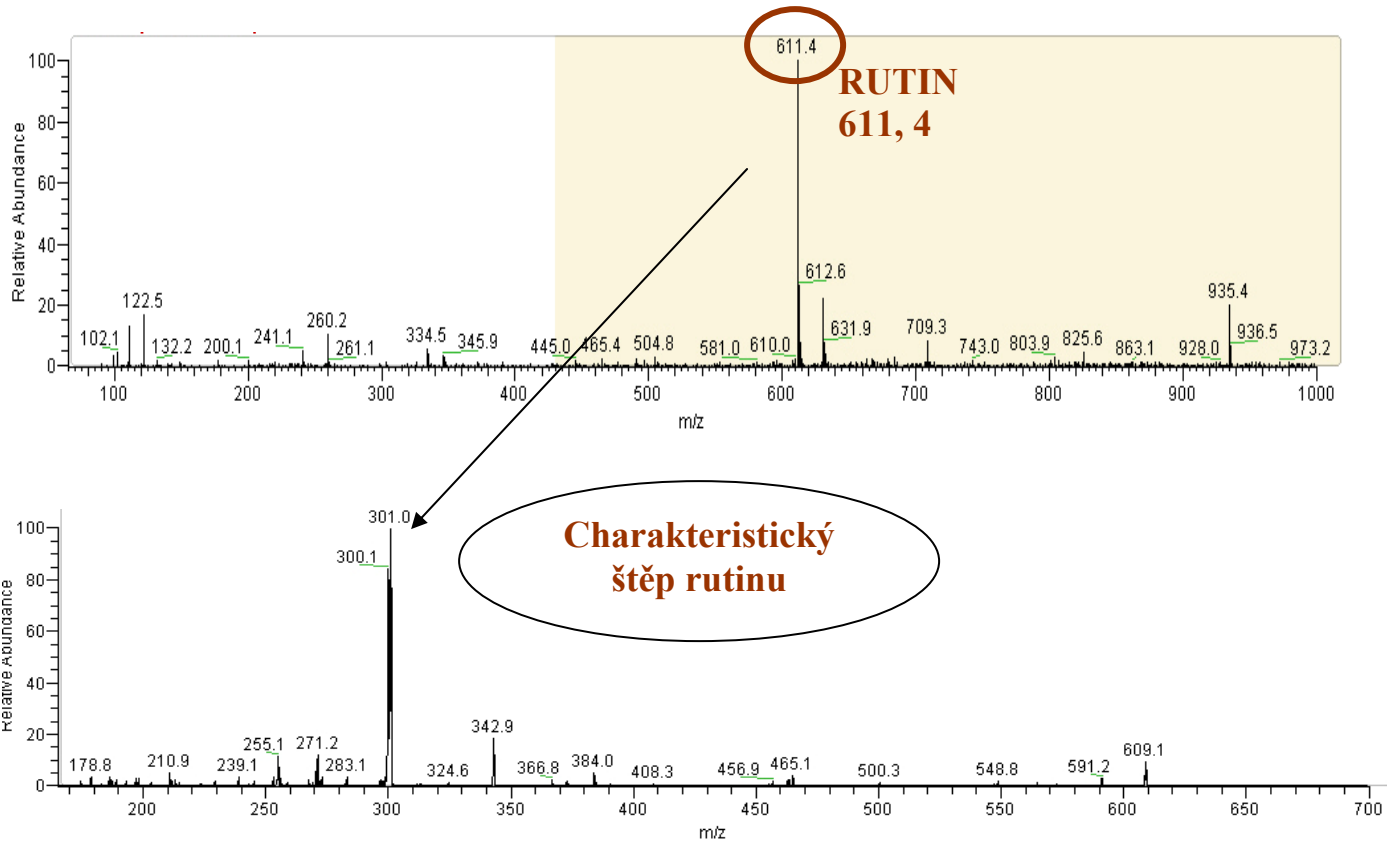
#### 4.5 Analýza standardních látek –MS<sup>n</sup> full scan

Za účelem kompletního otestování používaného softwarového vybavení byla na vybrané dostatečně čisté standardní sloučeniny aplikována metoda MS<sup>2</sup> full scan za podmínek uvedených v kapitole 3.3.3.2 a 3.4.2.1. Získané výsledky byly zpracovány do tabulky 14, která shrnuje štěpené *kvazi*-molekulární ionty a jejich jednotlivé fragmenty.

Příklad hmotnostního spektra rutinu ( $M_r = 610$ ), jenž poskytuje v MS<sup>2</sup> full scanu jen 1 fragment je na obr. 29. V tomto případě dochází pravděpodobně k rozštěpení vazby s cukernou složkou, což dokazuje odečtení  $m/z$  štěpu (301) od molekulového iontu ( $609,1$ ) = 308,1 kdy tato hodnota odpovídá  $M_r$  discharidu rutinosy [14].

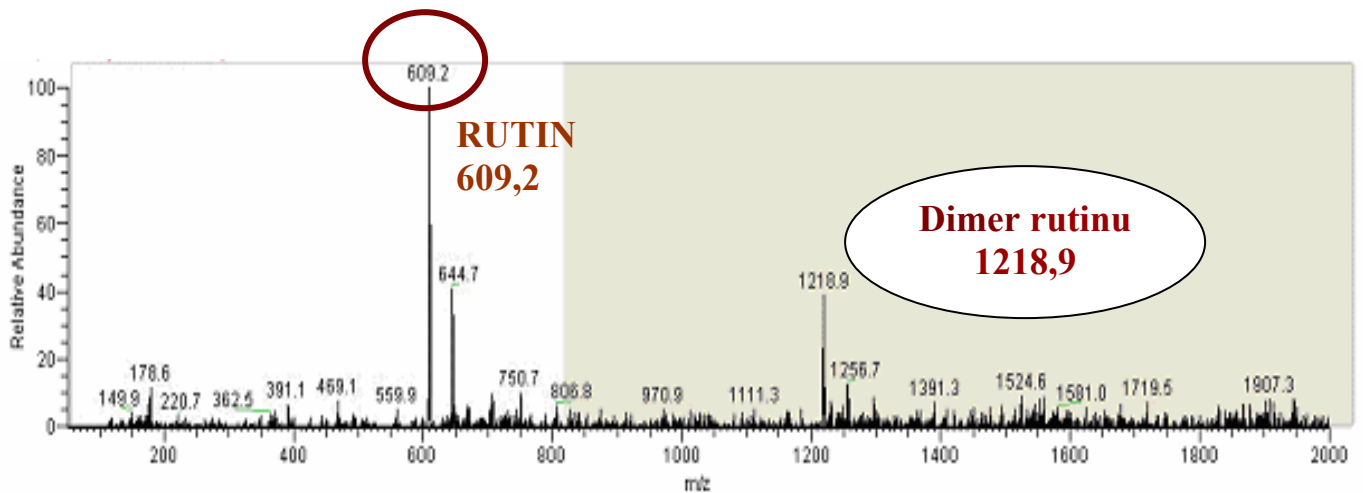
Tab. 14 - *Kvazi*-molekulární ionty a charakteristické fragmenty standardních látek

Standard	Rutin	Epikatechin	Kaempferol	Katechin	Morin
$[M+H]^+$	-	291	287	291	303
$^{0,2}A^+$	-	151	165	-	-
$^{0,2}B^+$	-	139	121	-	-
$^{1,3}A^+$	-	-	153	-	153
$^{1,4}B^+$	-	-	-	165	-
$[M+H-18]^+(-H_2O)$	-	273	-	273	285
$[M+H-42]^+(-C_2H_2O)$	-	-	-	249	-
$[M+H-46]^+(-CO-H_2O)$	-	-	241	-	257
$[M+H-56]^+(-CO-CO)$	-	-	231	-	-
$[M+H-74]^+(-CO-CO-H_2O)$	-	-	213	-	-
$[M-H-308]^-(-C_{12}O_9H_{20})$	301	-	-	-	-



Obr. 29 - Spektrum rutinu - MS full scan kladný mód a jeho odštěpený fragment po aplikaci MS<sup>2</sup>

V kladném módu byl identifikován *kvasi*-molekulární ion 611,4. Citlivost byla  $2,88 \cdot 10^6$ .



Obr. 30 - Spektrum rutinu-MS full scan, on-line analýza v záporném módu

Na obr. 30 je ukázán pík *kvasi-molekulového* iontu rutinu (609,2). Patrný je také pík dimeru rutinu (1218,9). Citlivost stanovení je  $5,12 \cdot 10^5$ .

Rijke a kolektiv [56] srovnávali odezvy několika flavonoidů v kladném a záporném módu při ionizaci ESI a APCI za detekce kvadrupólovým analyzátozem a iontové pastí. Rutin z tohoto srovnání vyšel jako nejhůře detekovatelná sloučenina, přičemž nejlepší odezvy byly na záporném módu u obou způsobů ionizací s využitím kvadrupólového analyzátozu. Je proto zajímavé, že ve výše uvedeném případě byl však rutin analyzován iontovou pastí s vyšší citlivostí v kladném módu, a to opakovaně.

#### 4.6 Analýza obsahu polyfenolů ve vybraných pivech typu ležák pomocí LC/MS analýzy

Všechny vzorky upravené výše popsaným způsobem (kap. 3.2.1), byly podrobeny hmotnostní RP-HPLC/ESI/MS analýze za podmínek uvedených v kap. 3.3 Se současně připojeným PDA i hmotnostním detektorem a byla sledována přítomnost i způsob separace různých fenolických látek vybraných na základě studované literatury. Separace probíhala při on-line propojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem, a tak ihned po separaci byly oddělené sloučeniny detekovány na základě poměru  $m/z$  v kladném módu (ladicí metoda epikatechin-tabulka 7, kap. 3.4.1).

##### 4.6.1 Kvantifikace

U dostatečně čistých standardních sloučenin byly zjištěny příslušné retenční časy a byla změřena jejich závislost plochy píku na koncentraci v roztoku mobilní fáze (*Tab. 15*). Hodnoty byly zpracovány do grafické závislosti, na základě regresní analýzy byly vypočteny koncentrace přítomných antioxidantů v jednotlivých vzorcích (kalibrační křivky uvedeny v příloze č. 4). byly stanoveny směrodatné odchylky (*tab. 16a, b a 17a, b*) a sestrojeny příslušné grafy (č. 13 – 24).

*Tab. 15: Dostupné flavonoidní standardní látky a jejich regresní rovnice*

Standard	Regresní rovnice	Standard	Regresní rovnice
epikatechin	$y = 233858x + 218928$	morin	$y = 149398x$
katechin	$y = 170986x + 326589$	rutin	$y = 4000000 + 179787$
naringenin	$y = 4\,000\,000x$	kyselina ferulová	$y = 15390x$
luteolin	$y = 221\,120x + 297416$	kyselina chlorogenová	$y = 13939x + 22735$
kaemferol	$y = 392964x + 247018$	kyselina gallová	$y = 15156x - 1300,7$
kvercetin	$y = 51512x$		

Tab. 16a - Obsah standardizovaných polyfenolů v testovaných pivech

Značka piva	Kyselina chlorogenová (mg/l)	Kyselina gallová (mg/l)	Kyselina ferulová (mg/l)	Naringenin (mg/l)	Katechin (mg/l)	Epikatechin (mg/l)
<i>Piva česká lahvová</i>						
<b>Bernard</b>	1,884 ±0,032	0,692 ±0,114	1,106 ±0,049	1,686 ±0,091	0,635 ±0,125	0,228 ±0,113
<b>Bernard nealko</b>	2,064 ±0,015	0,534 ±0,186	0,728 ±0,128	-	0,497 ±0,036	0,393 ±0,072
<b>Braník</b>	0,012 ±0,06	0,613 ±0,048	0,593 ±0,135	-	0,361 ±0,186	0,521 ±0,146
<b>Březňák</b>	1,926 ±0,114	-	-	-	0,665 ±0,156	-
<b>Budvar Budweiser</b>	2,381 ±0,083	0,826 ±0,186	0,681 ±0,256	-	0,769 ±0,019	0,671 ±0,052
<b>Budvar Budweiser nealko</b>	1,932 ±0,248	0,698 ±0,177	0,795 ±0,067	-	0,453 ±0,224	0,480 ±0,085
<b>Gambrinus</b>	1,957 ±0,147	1,468 ±0,068	1,197 ±0,096	1,936 ±0,182	0,186 ±0,026	0,617 ±0,032
<b>Plzen</b>	2,074 ±0,096	0,914 ±0,119	1,163 ±0,055	2,344 ±0,136	0,324 ±0,033	0,682 ±0,148
<b>Staropramen nealko</b>	0,035 ±0,089	0,691 ±0,218	1,040 ±0,038	1,607 ±0,236	0,547 ±0,015	0,319 ±0,057
<b>Velkopopovický Kozel</b>	1,562 ±0,017	-	0,804 ±0,119	-	0,530 ±0,157	0,446 ±0,049
<i>Piva zahraniční lahvová</i>						
<b>Heineken</b>	-	0,045 ±0,034	-	-	0,605 ±0,139	0,388 ±0,091
<b>Stella Artois</b>	1,943 ±0,075	0,725 ±0,126	-	-	0,426 ±0,283	-
<b>Zlatý Bažant</b>	1,981 ±0,119	-	1,264 ±0,097	-	0,544 ±0,289	0,590 ±0,137

Tab. 16b - Obsah standardizovaných polyfenolů v testovaných pivech

<i>Piva česká a zahraniční plechovková</i>						
<b>Braník</b>	-	0,626 ±0,019	0,628 ±0,058	-	0,381 ±0,149	0,550 ±0,098
<b>Budvar Budweiser</b>	2,182 ±0,085	0,749 ±0,144	0,691 ±0,129	-	0,693 ±0,033	0,386 ±0,257
<b>Gambrinus</b>	1,907 ±0,161	1,320 ±0,256	1,103 ±0,18	-	0,893 ±0,188	0,626 ±0,176
<b>Plzen</b>	1,763 ±0,135	0,856 ±0,022	0,834 ±0,157	2,103 ±0,065	0,680 ±0,037	0,659 ±0,275
<b>Velkopopovický Kozel</b>	1,562 ±0,044	-	0,683 ±0,259	-	0,459 ±0,112	0,531 ±0,097
<b>Arany Ászok</b>	1,955 ±0,078	0,724 ±0,256	0,537 ±0,159	-	0,551 ±0,13	0,358 ±0,165
<b>Borsodi</b>	1,937 ±0,143	0,688 ±0,027	0,592 ±0,048	0,558 ±0,136	0,435 ±0,024	-
<b>Stella Artois</b>	1,728 ±0,138	0,803 ±0,085	0,692 ±0,112	-	0,682 ±0,138	-
<b>Szalon</b>	1,915 ±0,189	0,764 ±0,138	0,704 ±0,261	-	0,311 ±0,279	0,186 ±0,158

Tab.16 - Obsah standardizovaných polyfenolů v testovaných pivech – pokračování

<i>Značka piva</i>	<i>Rutin (mg/l)</i>	<i>Morin (mg/l)</i>	<i>Kvercetin (mg/l)</i>	<i>Luteolin (mg/l)</i>	<i>Kaemferol (mg/l)</i>
<i>Piva česká lahvová</i>					
<b>Bernard</b>	0,517 ±0,028	0,442 ±0,141	0,156 ±0,130	0,163 ±0,099	0,170 ±0,17
<b>Bernard nealko</b>	0,458 ±0,086	-	-	-	-
<b>Braník</b>	0,293 ±0,345	-	-	-	-
<b>Březňák</b>	0,306 ±0,139	-	-	-	-
<b>Budvar Budweiser</b>	0,495 ±0,128	0,564 ±0,182	-	0,190 ±0,175	0,112 ±0,174

<b>Budvar Budweiser nealko</b>	0,383 ±0,069	-	-	-	-
<b>Gambrinus</b>	0,416 ±0,255	0,611 ±0,198	-	-	-
<b>Pilsener Urquel</b>	0,368 ±0,294	0,883 ±0,136	-	-	0,163 ±0,387
<b>Staropramen nealko</b>	0,390 ±0,15	-	-	-	-
<b>Velkopopovický Kozel</b>	0,320 ±0,115	0,261 ±0,046	-	0,194 ±0,058	0,128 ±0,182
<b><i>Piva zahraniční lahvoá</i></b>					
<b>Heineken</b>	0,210 ±0,066	-	0,111 ±0,118	-	-
<b>Stella Artois</b>	0,385 ±0,128	-	0,129 ±0,064	-	-
<b>Zlatý Bažant</b>	0,293 ±0,047	-	0,143 ±0,152	-	-

Tab.16 - Obsah standardizovaných polyfenolů v testovaných pivech – pokračování

<b><i>Piva česká a zahraniční plechovková</i></b>					
<b>Braník</b>	0,229 ±0,136	-	0,100 ±0,058	-	-
<b>Budvar Budweiser</b>	0,425 ±0,174	0,793 ±0,047	-	0,144 ±0,186	0,151 ±0,059
<b>Gambrinus</b>	0,362 ±0,083	0,827 ±0,182	-	-	-
<b>Pilsener Urquel</b>	0,387 ±0,116	-	0,083 ±0,071	-	0,140 ±0,035
<b>Velkopopovický Kozel</b>	0,321 ±0,081	-	-	-	0,132 ±0,212
<b>Arany Ászok</b>	0,283 ±0,316	-	-	-	-
<b>Borsodi</b>	0,432 ±0,139	-	-	-	-
<b>Stella Artois</b>	0,364 ±0,037	-	-	-	-
<b>Szalon</b>	0,452 ±0,338	-	-	-	-

#### 4.6.1.1 Majoritní flavonoidy

Fenolickou látkou vyskytující se v analyzovaných vzorcích v nejvyšších koncentracích byla stanovena kyselina chlorogenová – obecně velmi rozšířený flavonoid - a to jak v pivech českých tak i zahraničních, výjimkou byl český Braník v plechovce a Heineken, v nichž tato látka nebyla nalezena vůbec. Minimální množství bylo naměřeno také pro Braník (0,012 mg/l) v lahvi a pro nealkoholický Staropramen ( 0,035 mg/l ).

Budvar Budweiser alkoholický obsahoval 2,381 mg/l této kyseliny, tj. nejvyšší ze všech naměřených hodnot. Přibližně 2 g obsahovaly též ostatní česká alkoholická piva a u nealkoholických vzorků budějovický Budvar a Bernard (od 1,907 mg/l do 2,074 mg/l) i v pivu Stella Artois lahvovém (1,943 mg/l), Zlatém Bažantu (1,981 mg/l) a u všech maďarských piv (1,915 mg/l – 1,937 mg/l).

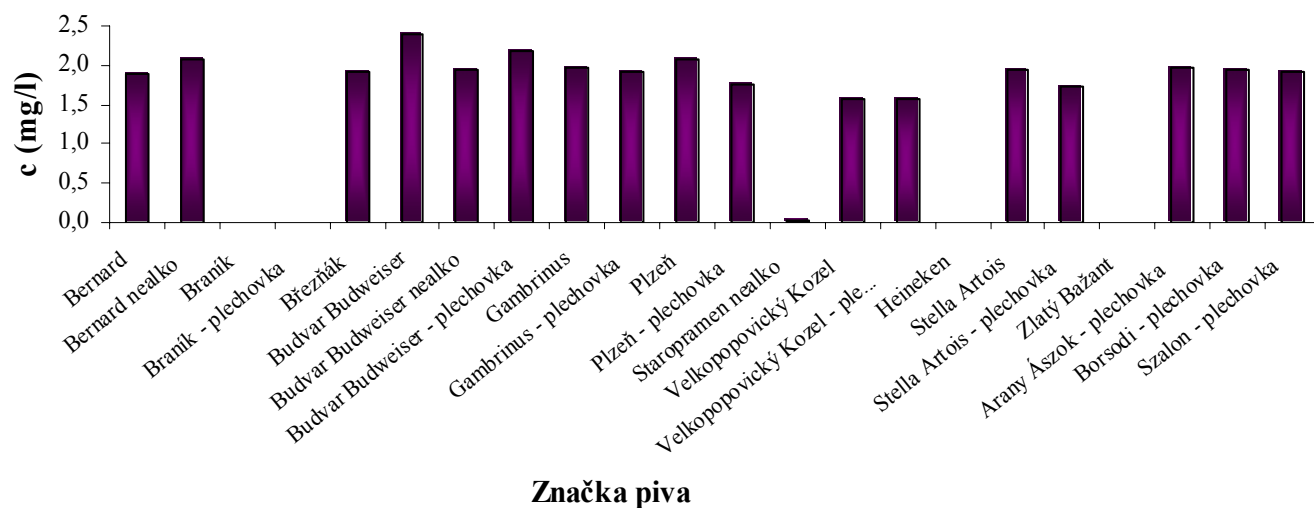
Kyselina gallová, prekurzor taninů a jako látka poskytující při reakci se železnatými solemi tzv. duběnkový inkoust, byla s výjimkou piva Břežňák, nealkoholického piva Bernard a Velkopopovického Kozla (lahve i plechovky) kvantifikována rovněž ve všech vzorcích. Z grafu č. 14 je patrné, že nejvyšší množství gallové kyseliny bylo stanoveno pro značku Gambrinus (plechovka 1,320 mg/l; láhev 1,468 mg/l), nejnižší u piva Heineken (0,045 mg/l). U ostatních vzorků se zjištěné množství pohybovalo do 1 mg/l).

Třetí analyzovanou fenolickou kyselinou je kyselina ferulová identifikovaná ve všech pivech českých - kromě značky Břežňák, ovšem v žádném pivu zahraničním – kromě značky Zlatý Bažant. Zlatý Bažant je dokonce značkou, v níž byla stanovena kyselina ferulová v nejvyšší koncentraci (1,264 mg/l). Množství vyšší než 1g/l bylo shledáno i u české značky Gambrinus (1,197 mg/l pro láhev a 1,103 mg/l pro plechovku), Bernard (alkoholický – 1,106 mg/l) a Pilsner Urquel (1,163 mg/l) a v nealkoholickém pivu Staropramen (1,040 mg/l).

Výskyt významného fytoestrogenu naringenin byl z českých piv potvrzen ve značce Pilsener Urquel láhev i plechovka, Gambrinus láhev a v nealkoholickém Staropramenu. U zahraničních piv s výjimkou maďarského Borsodi v pivu žádném. Zjištěné koncentrace jsou po kyselině chlorogenové druhými nejvyššími, což může být důkazem, že pivo - obzvláště české - má pozitivní účinky na lidské zdraví.

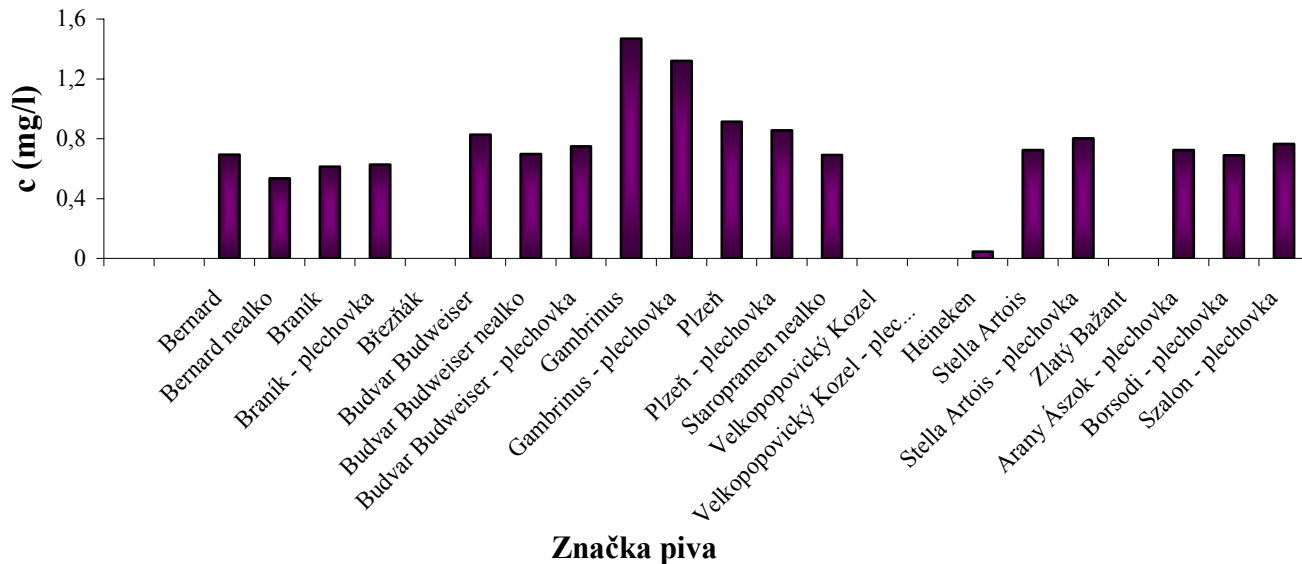
Celkově lze shrnout, že fenolické kyseliny byla prokázány prakticky ve všech pivech. Vzhledem k jejich vysokému výskytu v ječmeni a obecně v obilovinách lze předpokládat, že většina těchto derivátů pochází ze sladu.

## Kyselina chlorogenová (mg/l)



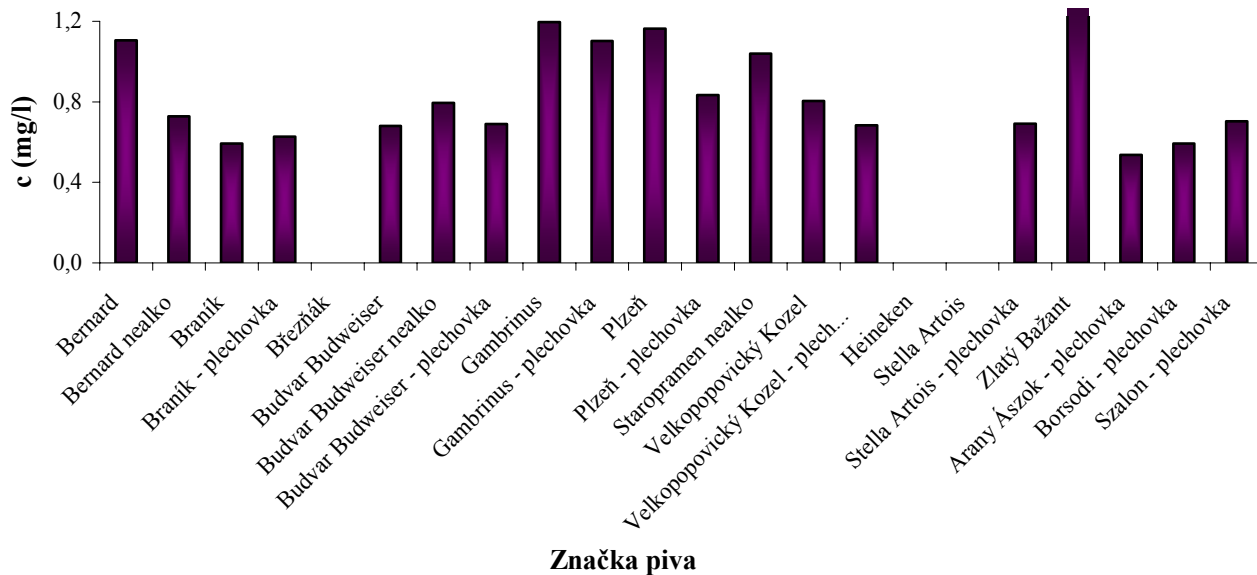
Graf 13 - Výsledky stanovení koncentrace kyseliny chlorogenné u testovaných piv

## Kyselina gallová (mg/l)



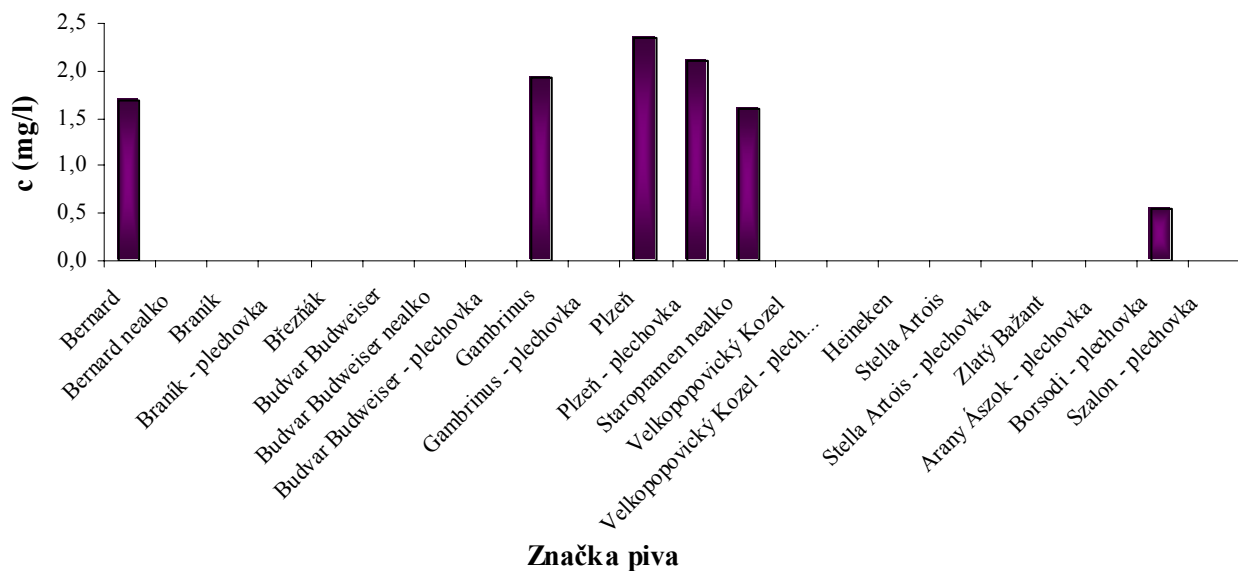
Graf 14 - Výsledky stanovení koncentrace kyseliny gallové u testovaných piv

## Kyselina ferulová



Graf 15 - Výsledky stanovení koncentrace kyseliny ferulové u testovaných piv

## Naringenin

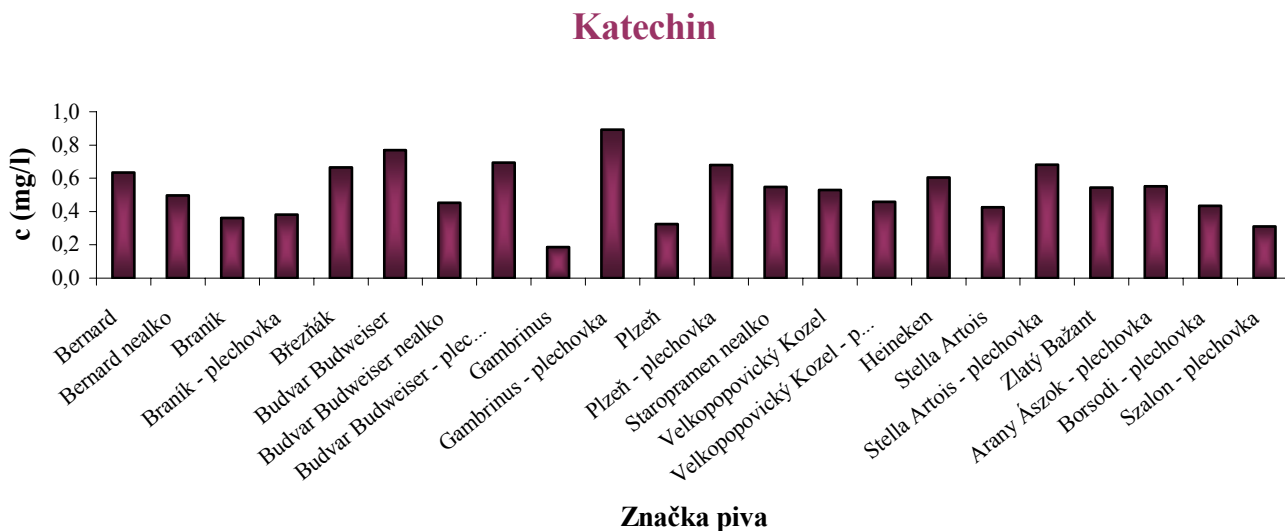


Graf 16 - Výsledky stanovení koncentrace naringenin u testovaných piv

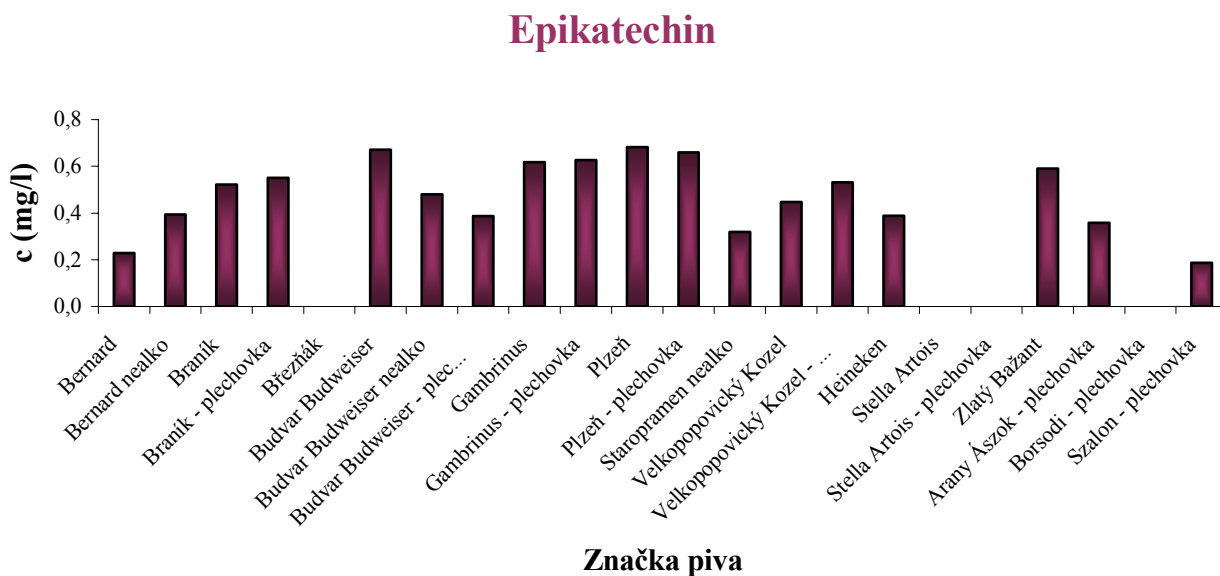
#### 4.6.1.2 Katechiny

Katechiny – stejně jako fenolické látky byly identifikovány v téměř všech vybraných vzorcích (katechin u všech 22 vzorků, epikatechin u 18 vzorků) – s výjimkou maďarského Borsodi, anglického piva Stella Artois a českého Břežňáku. Nejvyšší obsah katechinu byl zjištěn u piva Gambrinus plechovkového (0,893 mg/l) a nejvyšší obsah katechinu - 0,682 mg/l u plzeňského Pilsener Urquel lahvového.

Nejnižší množství obou typů katechinů bylo identifikováno v maďarské značce Szalon (0,311 mg/l katechinu a 0,186 mg/l epikatechinu).



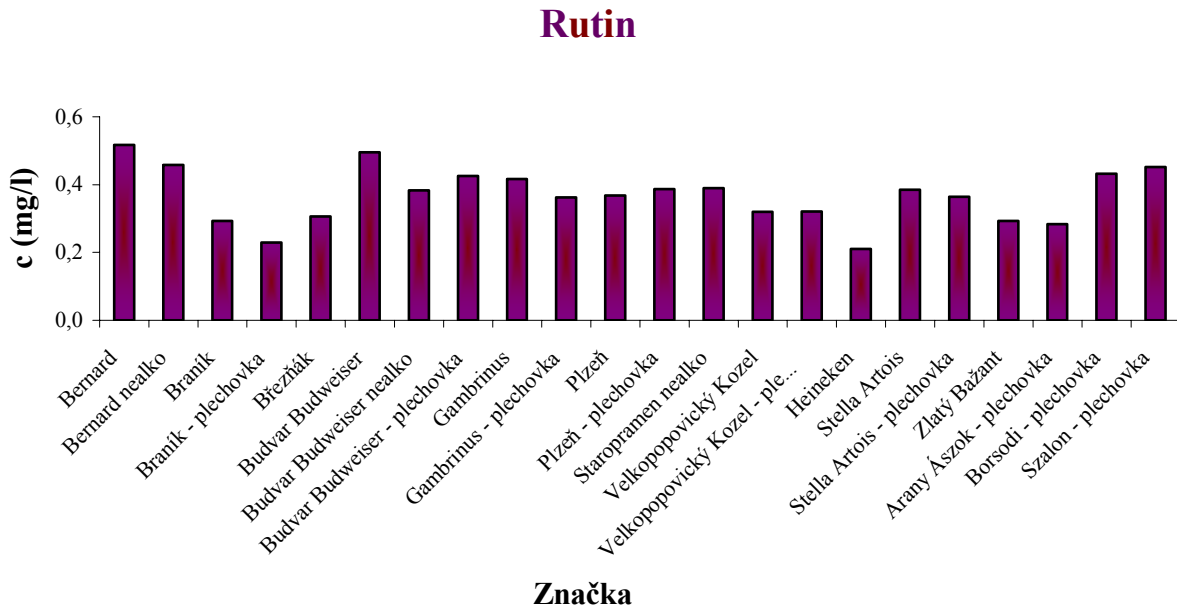
Graf 17 - Výsledky stanovení koncentrace katechinu u testovaných piv



Graf 18 - Výsledky stanovení koncentrace epikatechinu u testovaných piv

#### 4.6.1.3 Diglykosid rutin

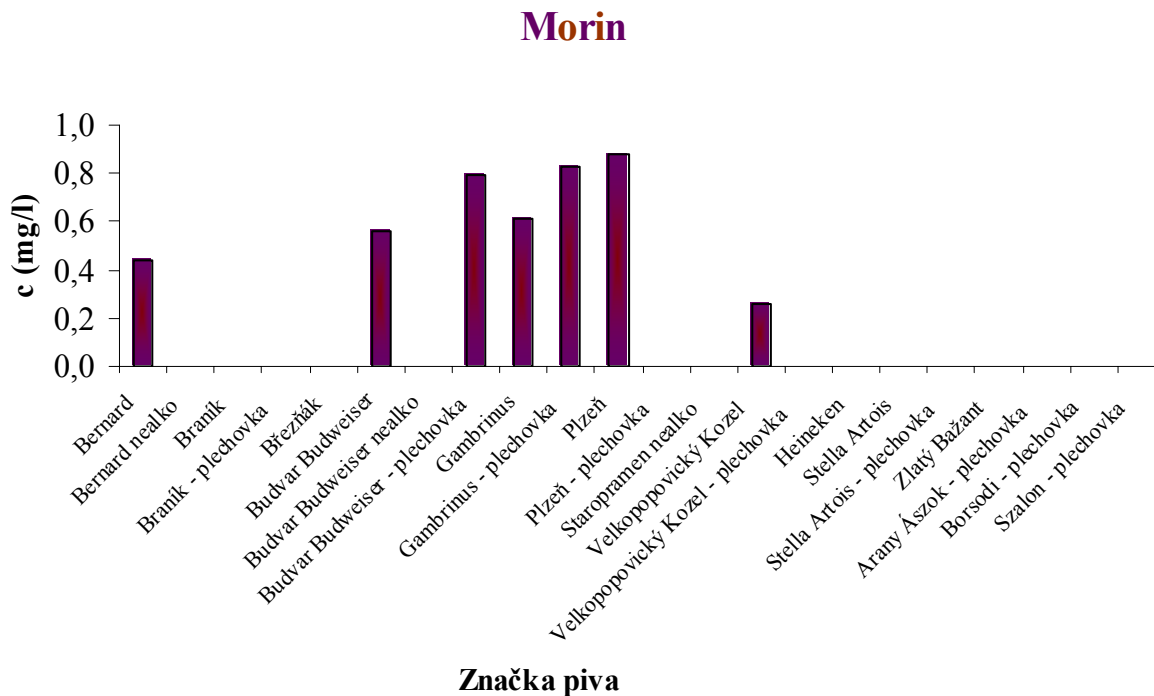
Obecně je prokázáno, že dobrým zdrojem rutinu a jeho glykosidů jsou červené hrozny a citrusové plody [57]. Provedená analýza však potvrdila, že tyto látky jsou rovněž skupinou antioxidantů vyskytujících se v pivu. Koncentrace rutinu sice nepřesáhla 0,517 mg/l, avšak byl nalezen ve všech vzorcích. Nejvyšší množství obsahoval alkoholický Bernard (0,517 mg/l), nejnižší plechovkový Braník (0,229 mg/l); u ostatních vzorků bylo rozmezí 0,283 mg/l – 0,495 mg/l. Původ rutinu přítomného v pivu lze rovněž přisoudit pravděpodobně sladu.



Graf 19 - Výsledky stanovení koncentrace rutinu u testovaných piv

#### 4.6.1.4 Morin

Morin je zástupcem flavanolových barviv, který byl identifikován v nejvyšší koncentraci u plzeňského Pilsener Urquel (0,883 mg/l) v nejnižší u Velkopopovického Kozla lahvového (0,261 mg/l). Určité množství obsahovaly také Gambrinus láhev i plechovka, Budvar Budweiser láhev i plechovka a Bernard alkoholický. V ostatních pivovarských vzorcích byla koncentrace tohoto flavanolu neměřitelná.



*Graf-20 - Výsledky stanovení koncentrace morinu u testovaných piv*

#### **4.6.1.5 Minoritní flavonoidy**

Mezi minoritní flavonoidní sloučeniny byly zařazeny luteolin, kaemferol a kvercetin, které byly identifikovány v méně než osmi vzorcích a navíc se většina z nich vyskytovala v celkově nejnižších koncentracích tj. nepřesáhla 0,170 mg/l.

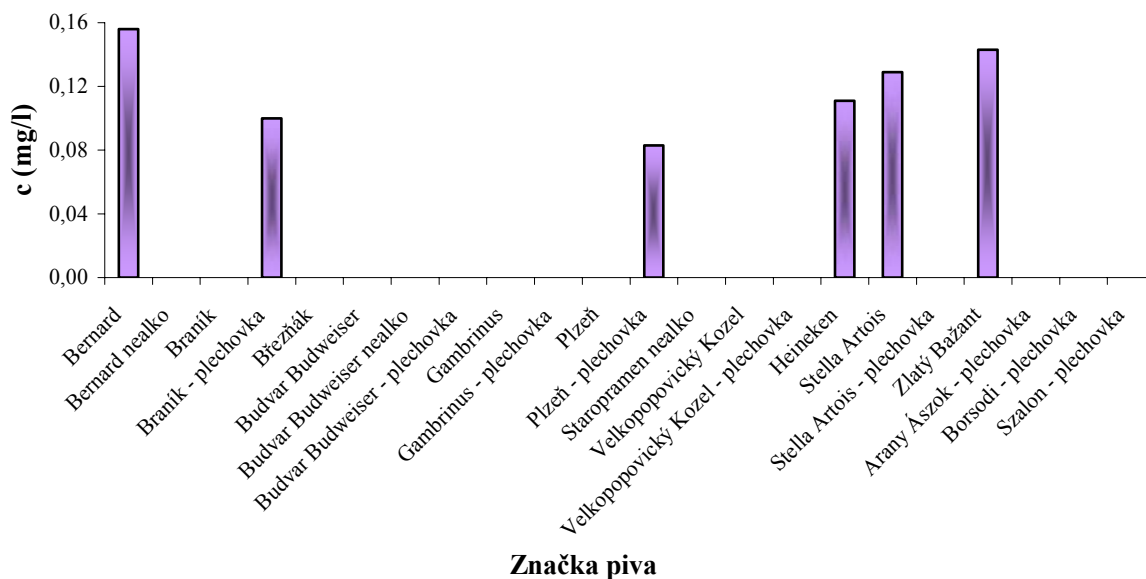
Kvercetin patří mezi téměř ubikvitní flavonoly. Je to látka se základní aglykonovou strukturou, od které lze ostatní deriváty odvodit pouhou záměnou substituentů na fenolických kruzích. Přesto však byla jeho nejvyšší detekovaná koncentrace 0,156 mg/l (Bernard alkoholický) Možným vysvětlením může být skutečnost, že se mnohem více vyskytuje ve formě glykosidů než jako volný aglykon [58].

Dalšími sledovanými sloučeninami byly luteolin, který se s jistotou vyskytoval pouze v Bernardu alkoholickém a Budějovickém Budvaru plechovkovém i lahvovém a kaemferol nalezen v týchž vzorcích a dále v plzeňském Pilseneru lahvovém i plechovkovém a Velkopopovickém Kozlu lahvovém i plechovkovém. Jejich nejvyšší obsah byl vypočten na 0,170 mg/l pro kaemferol ve značce Bernard alkoholický a 0,194 mg/l pro luteolin u značky Velkopopovický Kozel (láhev). Minimální výskyt lze vysvětlit faktem, že se jednalo o antioxidanty nově hledané v rámci předložené screeningové studie a nejedná se o polyfenoly typické pro pivo.

Koncentrace fenolických látek stanovené v předložené práci byly vesměs nižší než je uváděno v literatuře ([59, 60].), kde však kvantifikace bývá prováděna pomocí HPLC/UV-VIS analýzy. Důvodem je pravděpodobně skutečnost, že při spektrofotometrické detekci dochází ke zkreslení

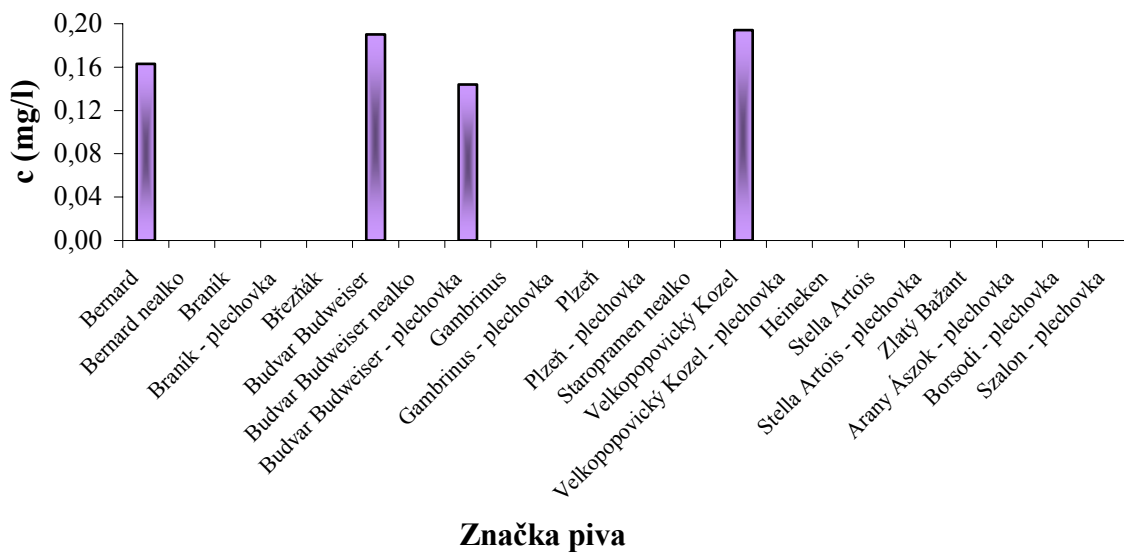
výsledků vlivem koeluce dalších derivátů spolu s píky standardů. V předložené práci byly získané výsledky využity především pro srovnání obsahu jednotlivých piv.

### Kvercetin



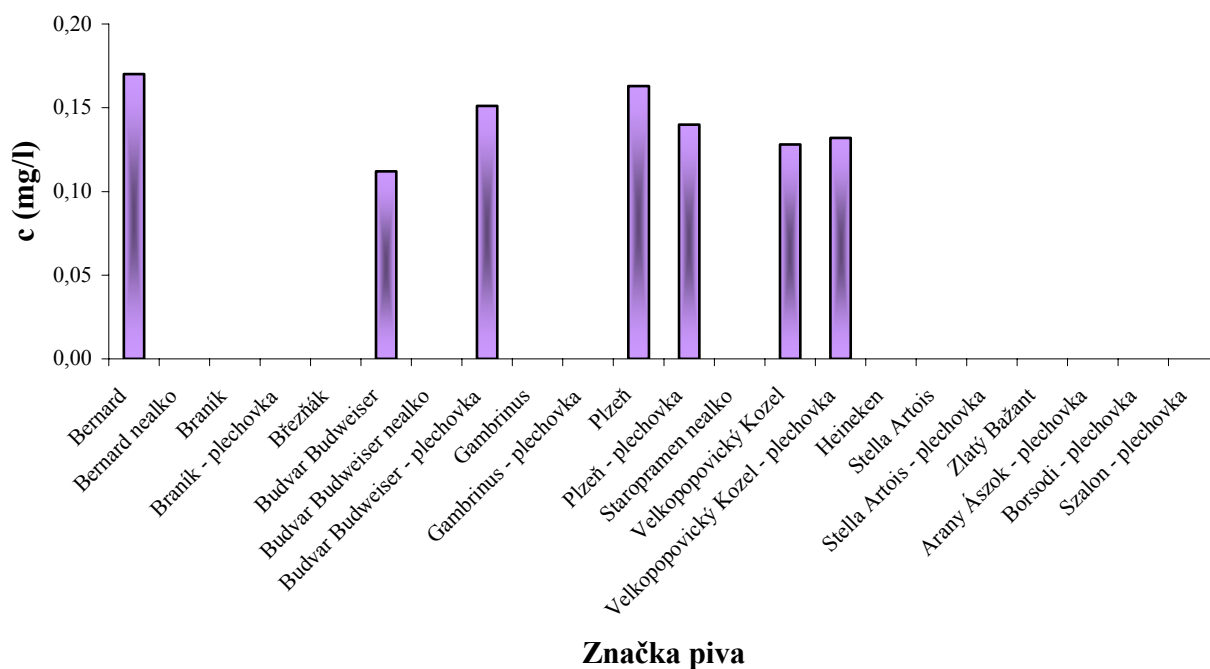
Graf 21 - Výsledky stanovení koncentrace kvercetinu u testovaných piv

### Luteolin



Graf 22 - Výsledky stanovení koncentrace luteolinu u testovaných piv

## Kaemferol



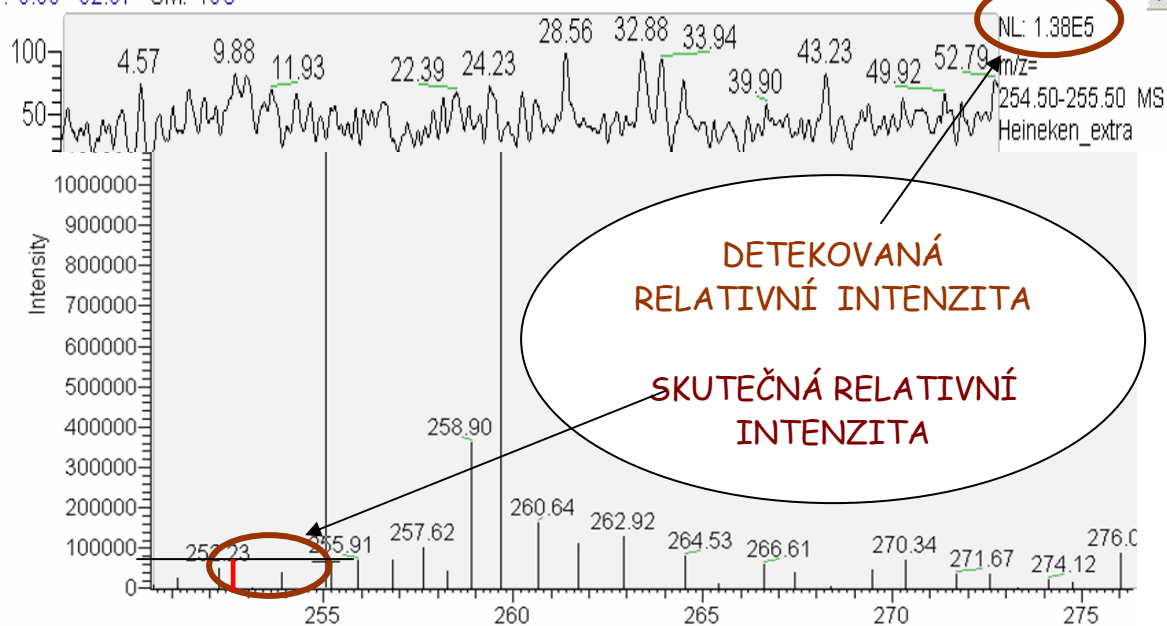
*Graf 23 - Výsledky stanovení koncentrace kaemferolu u testovaných piv*

### 4.6.2 Identifikace flavonoidů

Díky předchozí kvantifikaci bylo pro 11 detekovaných polyfenolických látek možno jednoznačně rozhodnout, zda jsou se v daných vzorcích přítomny či nikoliv (kap 4.6.1) Pro posouzení různorodosti analyzovaných piv však bylo současně nutné vytvořit další strategii s využitím všech dat, která kombinace LC-MS detekce poskytl.

Samotné kvalitativní vyhodnocení pak spočívalo ve srovnání celkových profilů výsledných chromatogramů vyfiltrovaných dle molekulových hmotnostní hledaných látek, přičemž srovnávány byly jednotlivé značky včetně piv nealkoholických. Rozdíly mezi pivem lahvovým a plechovkovým u téže značky byly minimální, proto nejsou tato piva uvažována samostatně. Uvedená relativní intenzita je vztažena k píku o nejvyšší intenzitě. V případech, kde nebylo možno jednoznačně posoudit, jde-li skutečně o pík detekované látky či o zkresení šumem, hodnocení bylo provedeno otevřením průběhu celého hmotnostního spektra v daném čase analýzy a ověřením přítomnosti této látky – př.: *Obr. 31*.

T: 0.00 - 52.97 SM: 15G



Obr. 31 - Ověření přítomnosti intenzity signálu sledovaných látek

Na základě podrobně provedených zhodnocení byly pro všechny vzorky sestaveny tabulky, jejichž ilustrativní ukázka pro testovaná zahraniční piva Stella Artois a Heineken je součástí přílohy 6 a z jejichž vzájemného porovnávání a opakovanými konfrontacemi s výchozími chromatogramy vyplynuly výsledky uvedené v následujícím textu.

#### 4.6.2.1 České pivo vs. zahraniční - unikátní rozdíly

Opakující se trendy byly zaznamenány především v detekci kyseliny ferulové, kyseliny gallové, naringenin, prenylnaringenin, xanthohumolu C a kyseliny salicylové, tyto látky se jeví být použitelnými jako molekulární markery pro rozlišení piva českého od piv zahraničních.

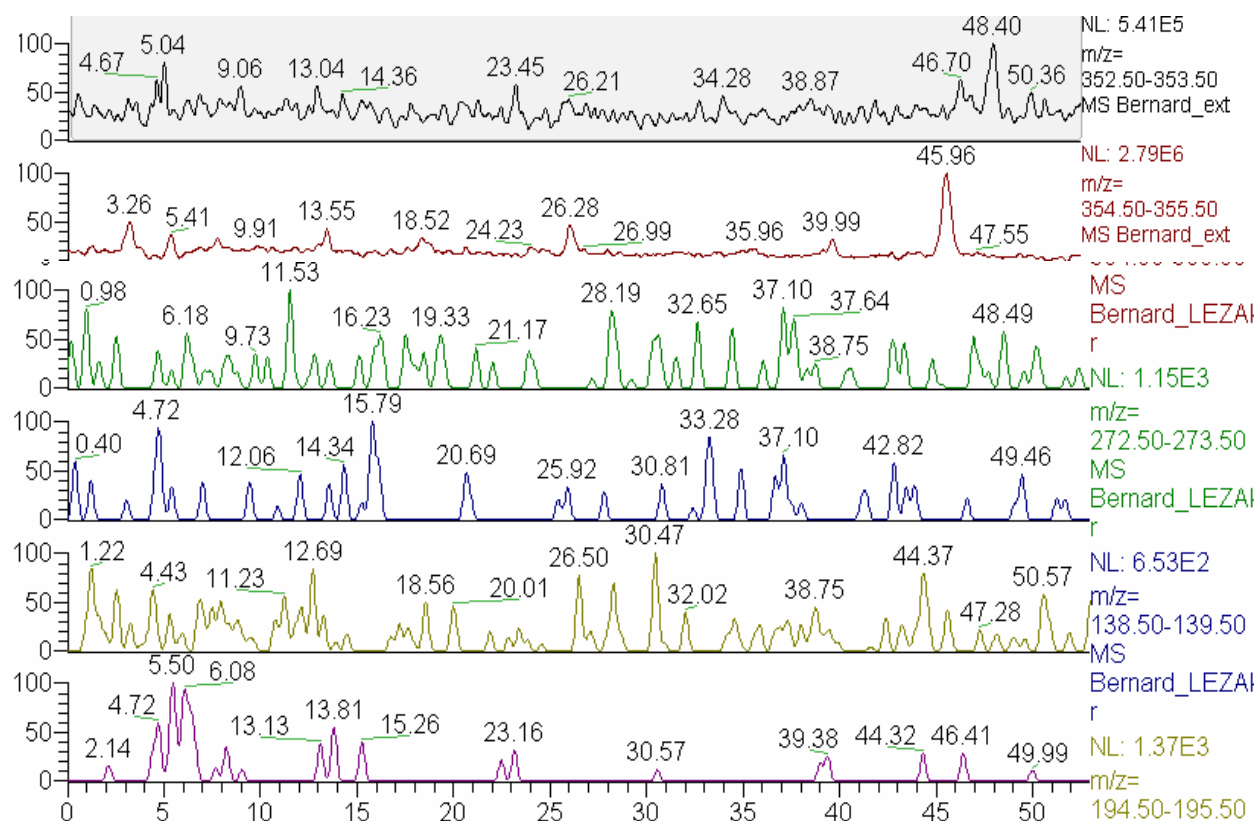
Předchozí kvantifikace umožnila přesnou kvantifikaci pro pět z uvedených látek – s výjimkou látek o m/z 352 a 340, pro něž byly nalezeny orientační retenční časy z literární rešerše [60, 61], a proto bylo možno uvažovat i přítomnosti těchto složek. Retenční čas kyseliny salicylové se zjistit nepodařilo, přesto však byl při srovnání chromatogramů získán zajímavý výsledek. Srovnáván byl celý časový záznam.

Z jedenácti chromatogramů českých analyzovaných piv se jich deset ukázalo být obsahově mnohem bohatších nežli vzorky zahraniční. Výjimku tvoří pivo Březňák, v němž lze spolehlivě identifikovat pouze přítomnost prenylovaného naringenin, o němž je známo, že k jeho eluci dochází přibližně ve 40. minutě. Ostatní látky vybrané pro charakterizaci se v tomto vzorku z žádné z provedených analýz nepodařilo odlišit od šumu a nelze tedy potvrdit jejich přítomnost.

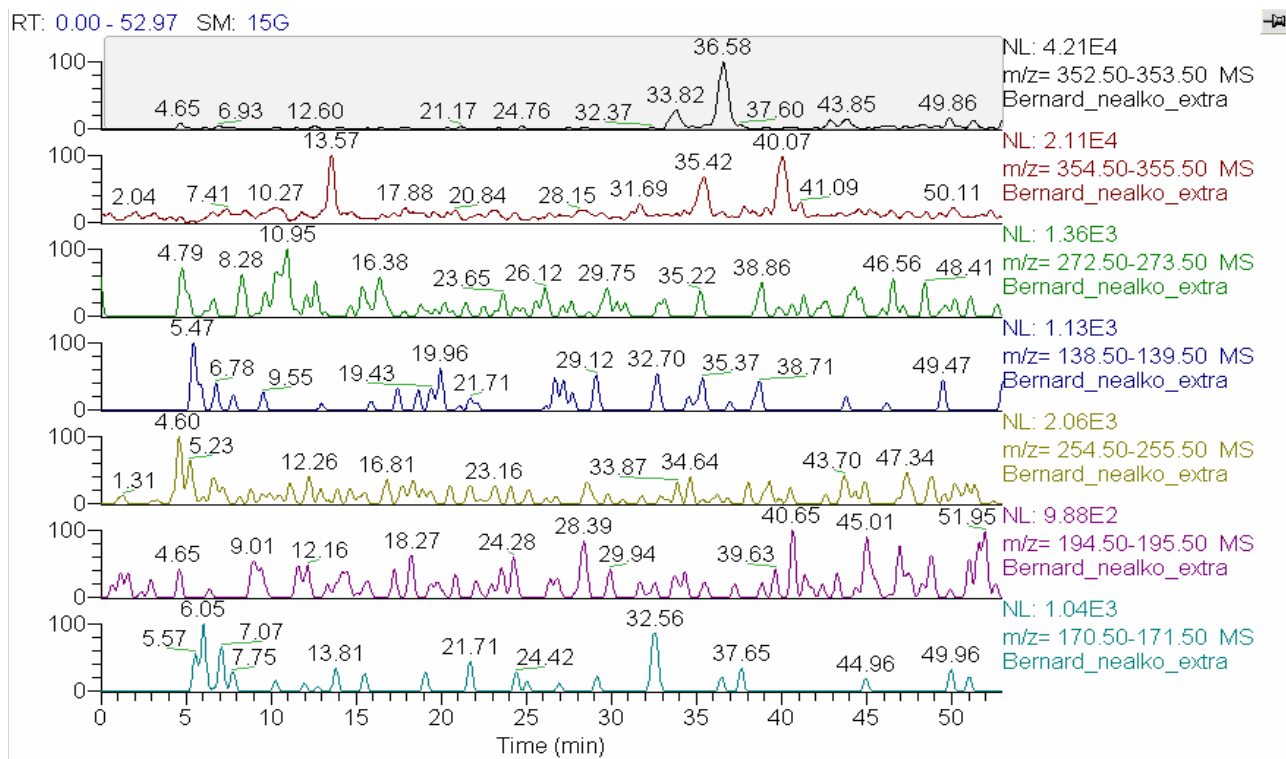
U všech zahraničních piv došlo k podobné situaci – u dvou ze tří maďarských piv (Borsodi, Arany Ászok) byl identifikován taktéž prenylnaringenin, u všech tří navíc kyselina gallová a to

téměř bez jiných doprovodných složek – jen u piva Szalon se v blízkosti signálu odpovídajícímu kyselině gallové (6,04) vyskytuje v páté minutě doprovodný pík ( $t_R = 4,82$ ). Zajímavá je u těchto maďarských piv separace naringenin, kdy u Borsodi je zaznamenán zcela nesporný pík tohoto polyfenolu, zatímco u dalších maďarských piv příslušný pík přítomen není, avšak u obou je tu pozorovatelný signál získaný zhruba ve stejném čase ( $t_R = 13,18$  a  $13,05$ ). U belgické značky Stella Alois a německé značky Heineken byla jako jediná ze sledovaných látek detekována kyselina gallová. Slovenská značka Zlatý Bažant byla naopak jedinou ze zahraničních piv, v níž kyselina gallová zachycena není a kyselina ferulová je. Prenylnaringenin je opět přítomen a to se třemi dalšími o řád méně intenzivnějšími, avšak detekovanými píky. Dále byl ve značce Zlatý Bažant identifikován chalkon s poměrem  $m/z = 355 \pm 0,5$  a další neznámá látka odpovídající této hmotě ve 4,77. minutě.

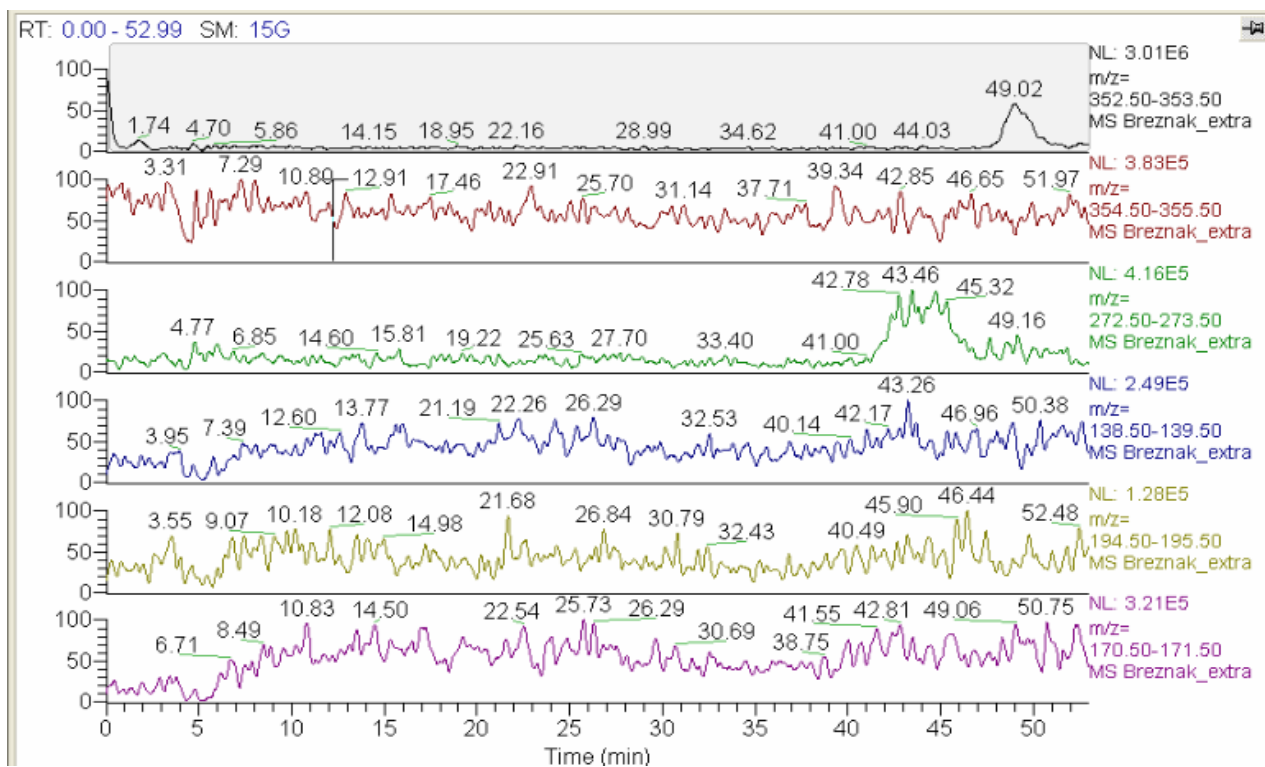
Pestrost piv českých ve srovnání se zahraničními vzorky dokumentují *obrázky č. 32 – 47*. Celkovou výpověď o přítomnosti zobrazených i dalších látek podává *tab. 17* v kap. 4.6.3.



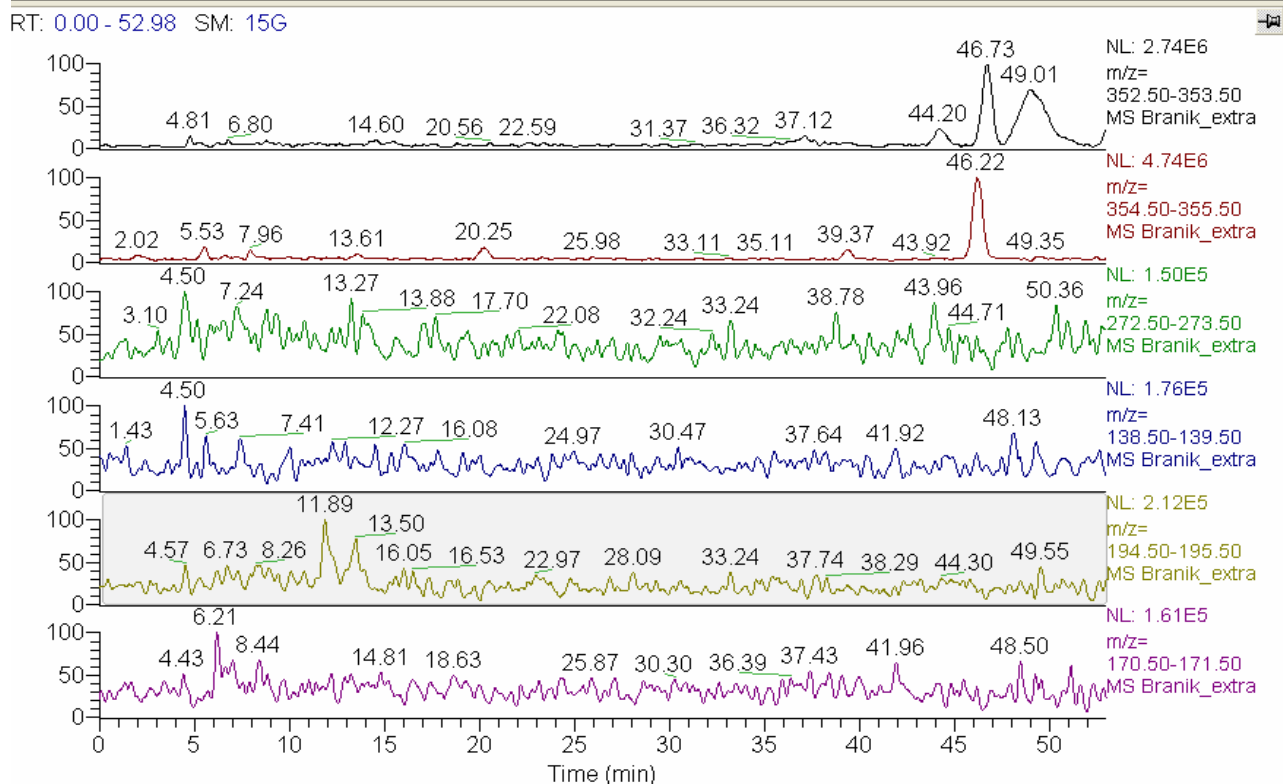
Obr. 32 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Bernard



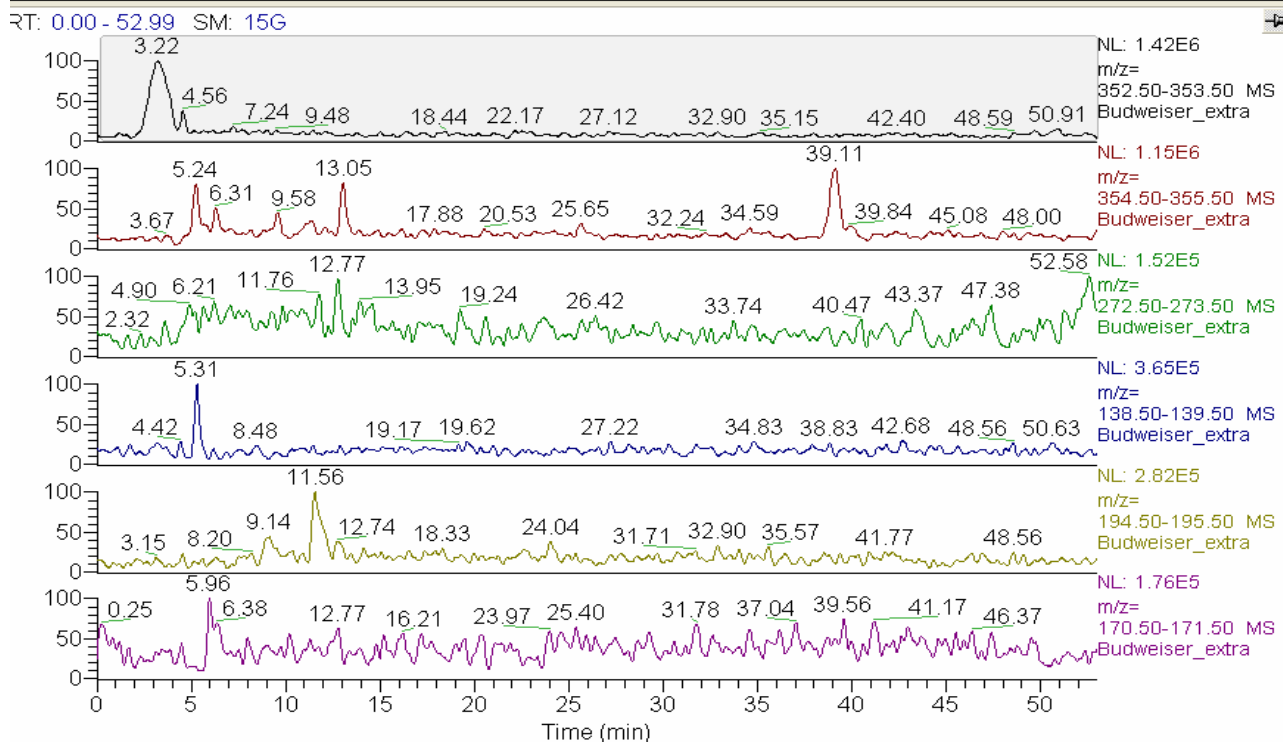
Obr. 33 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Bernard nealko



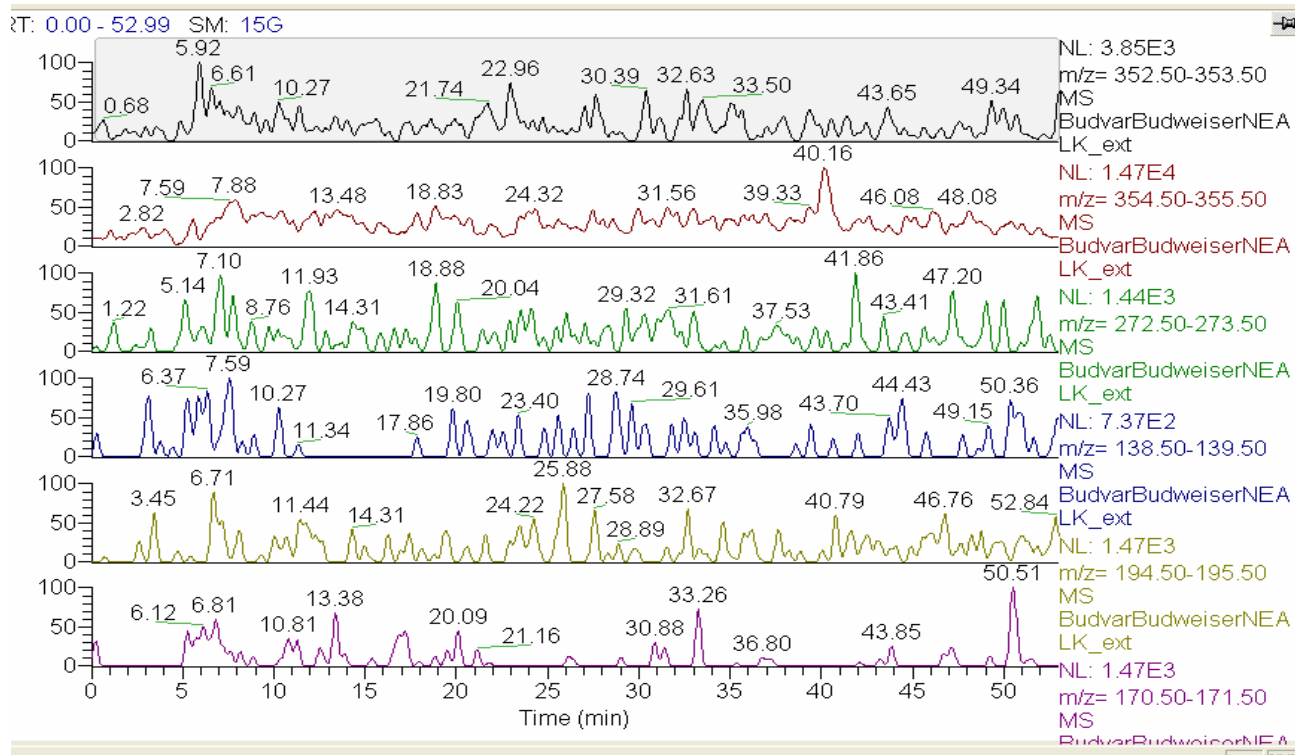
Obr. 34 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Brežňák



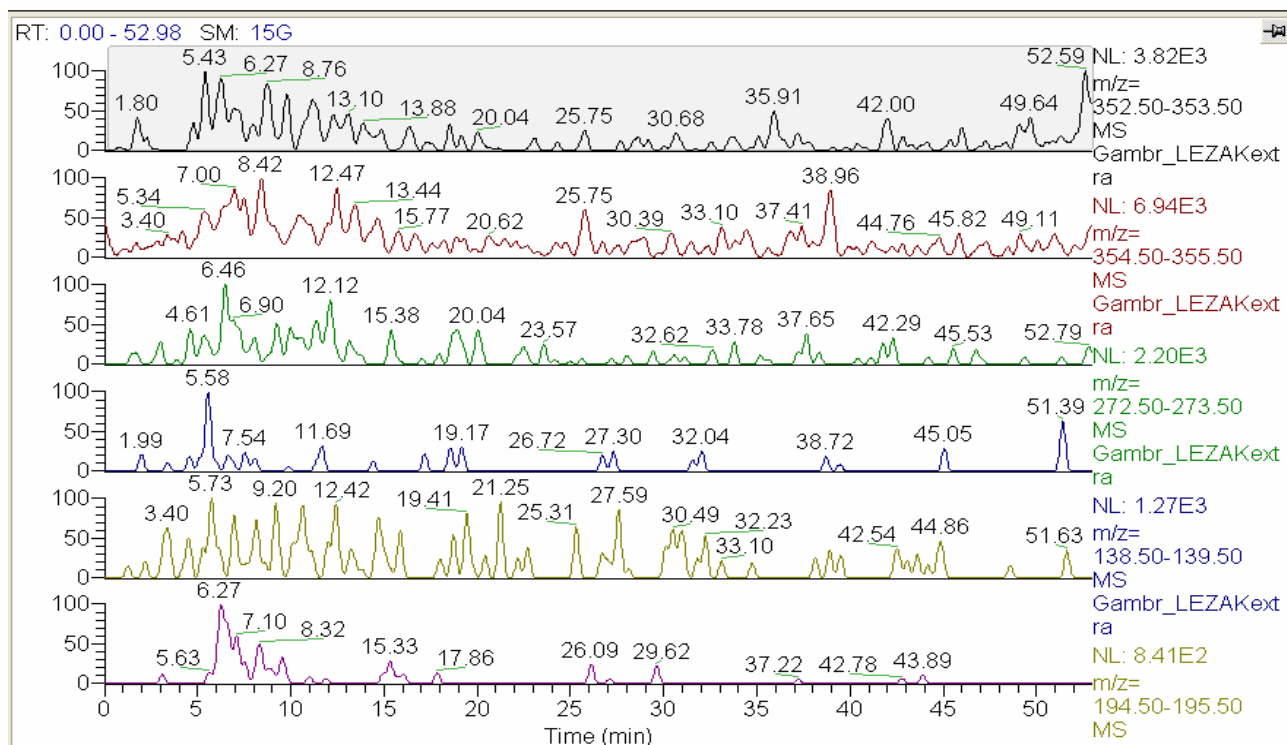
Obr. 35 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Branik



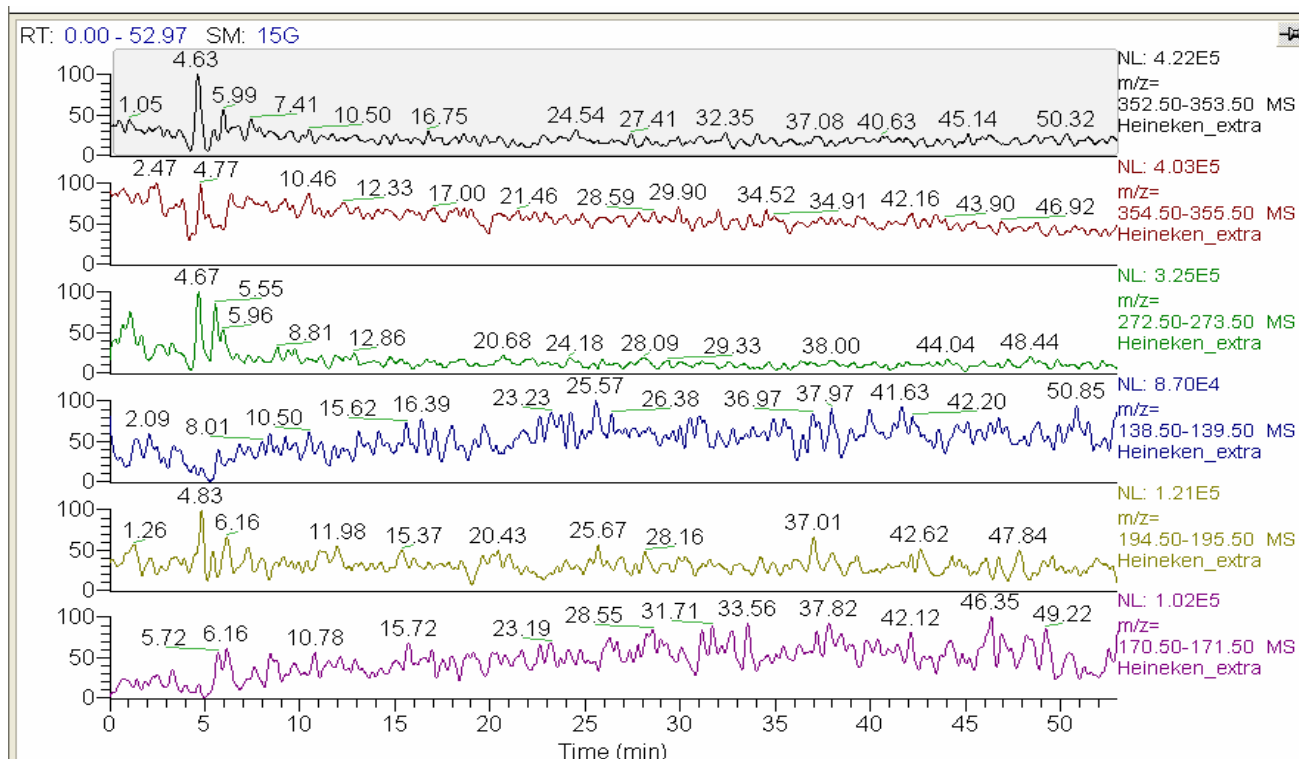
Obr. 36 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Budweiser



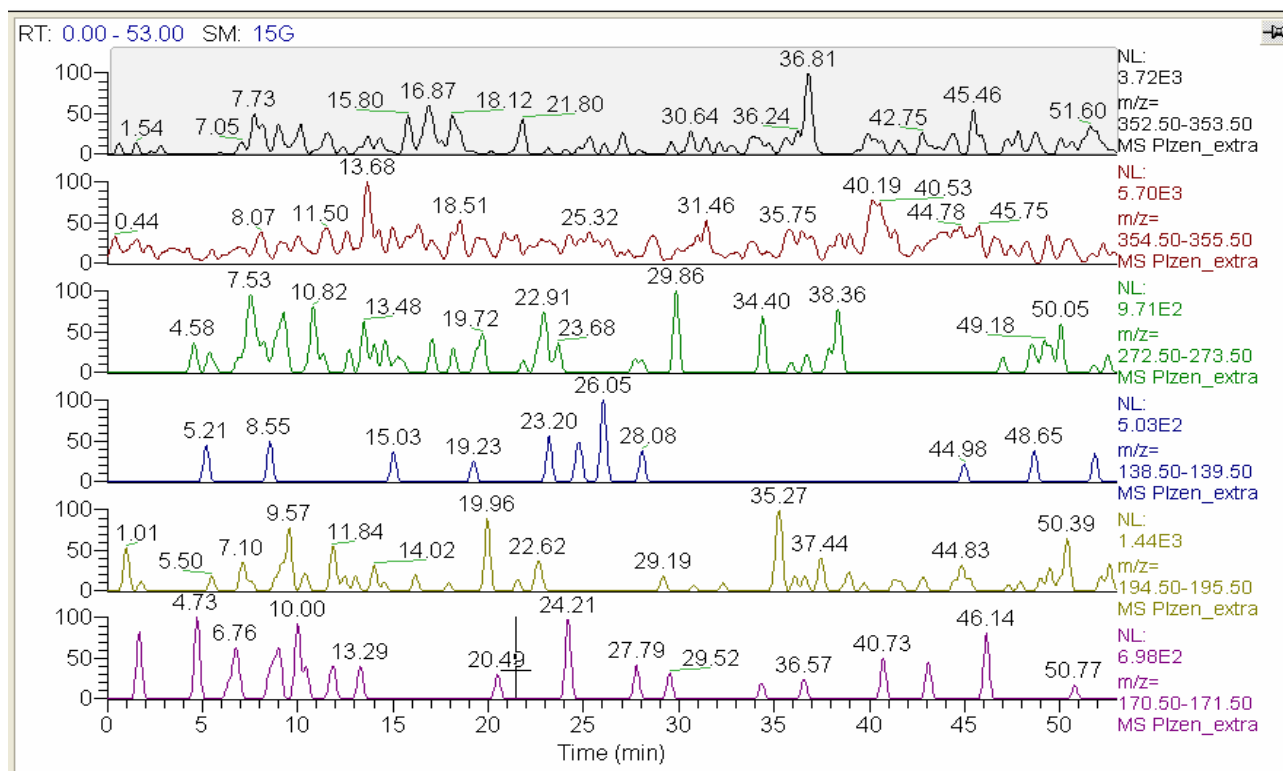
Obr. 37 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Budweiser nealko



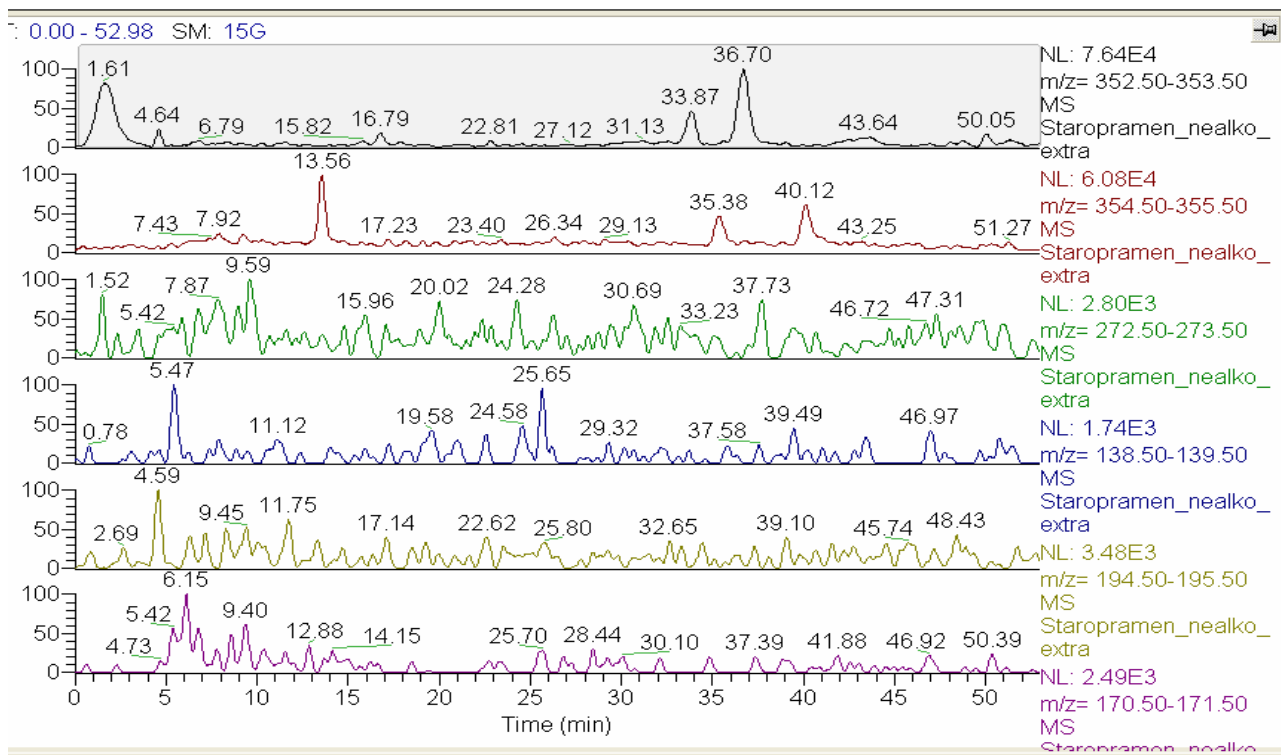
Obr. 38 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Gambrinus



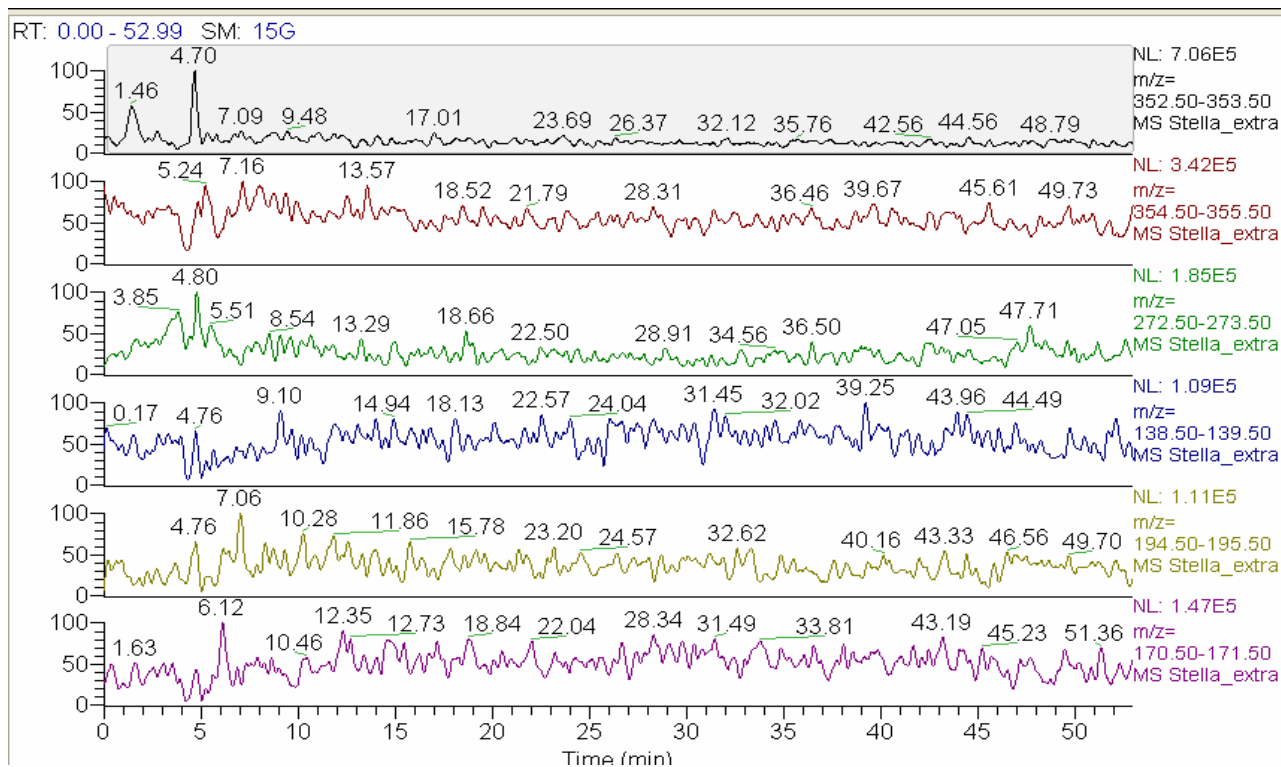
Obr. 39 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů německého piva Heineken



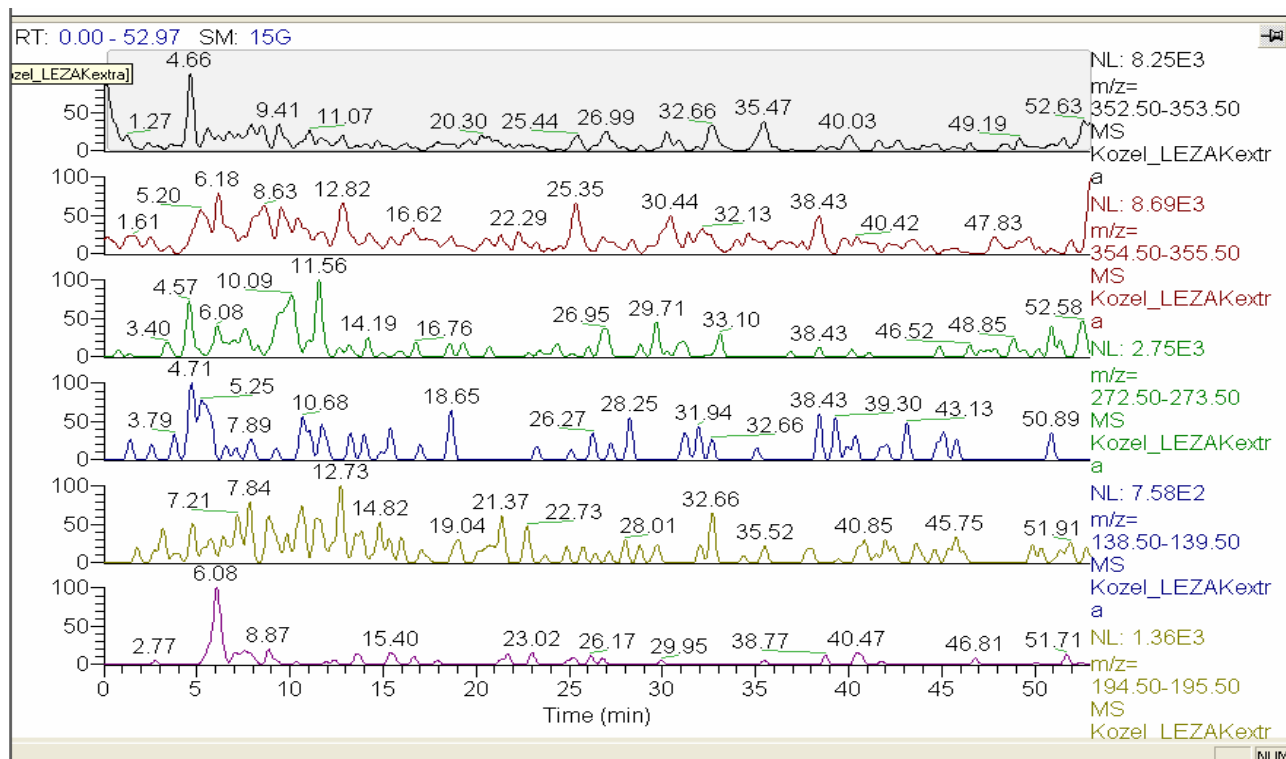
Obr. 40 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Plzeň



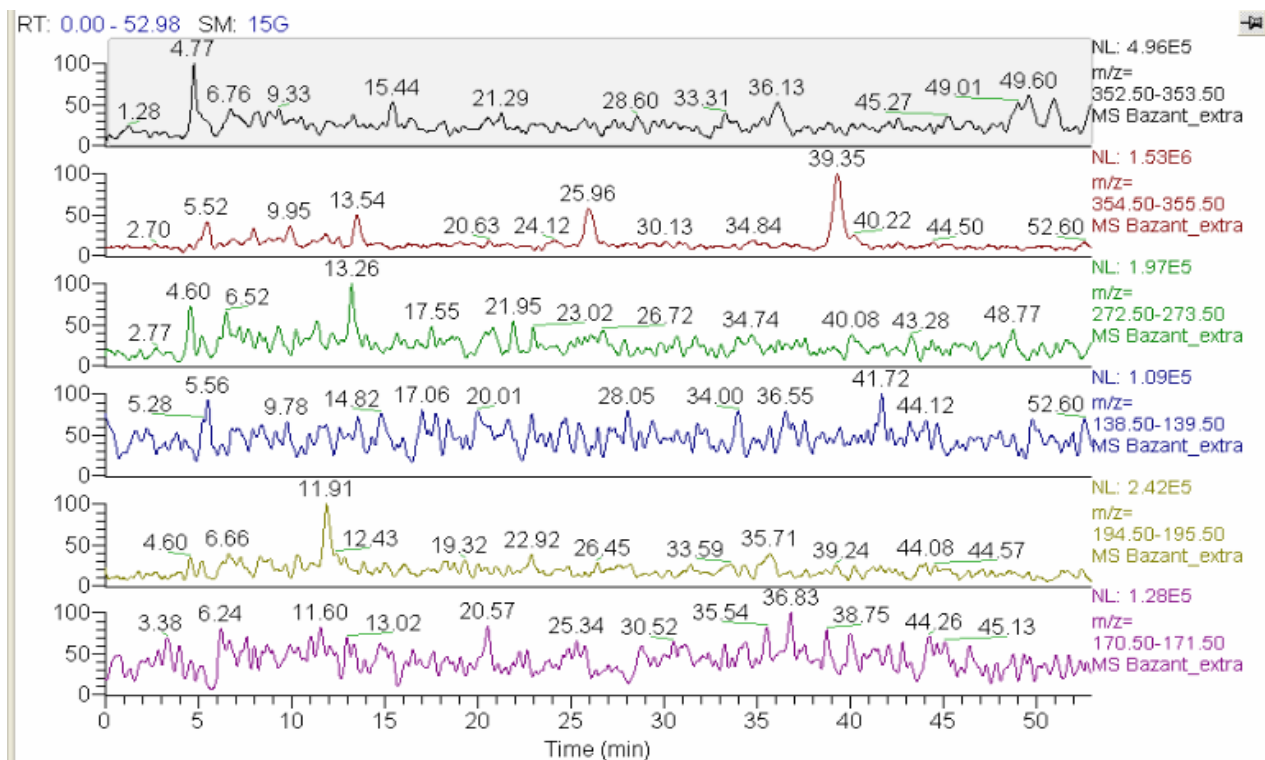
Obr. 41 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Staropramen nealko



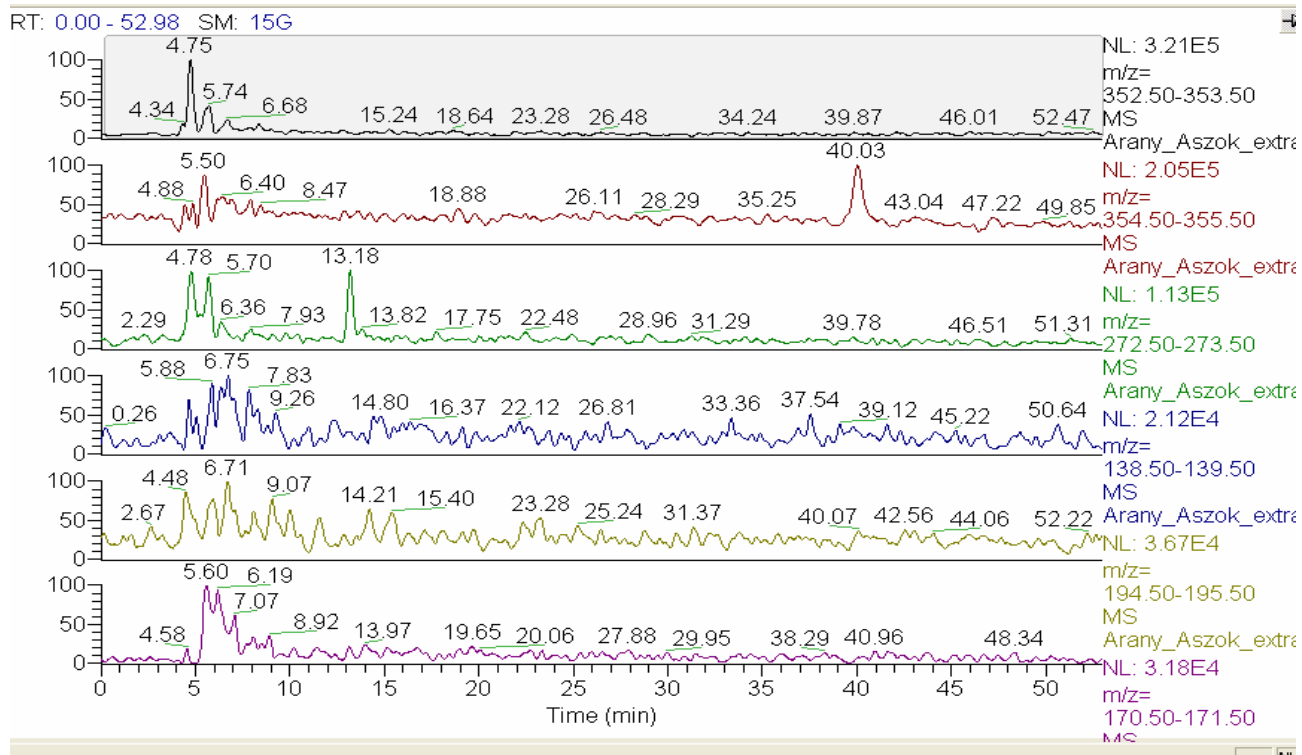
Obr. 42 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů belgického piva Stella Artois



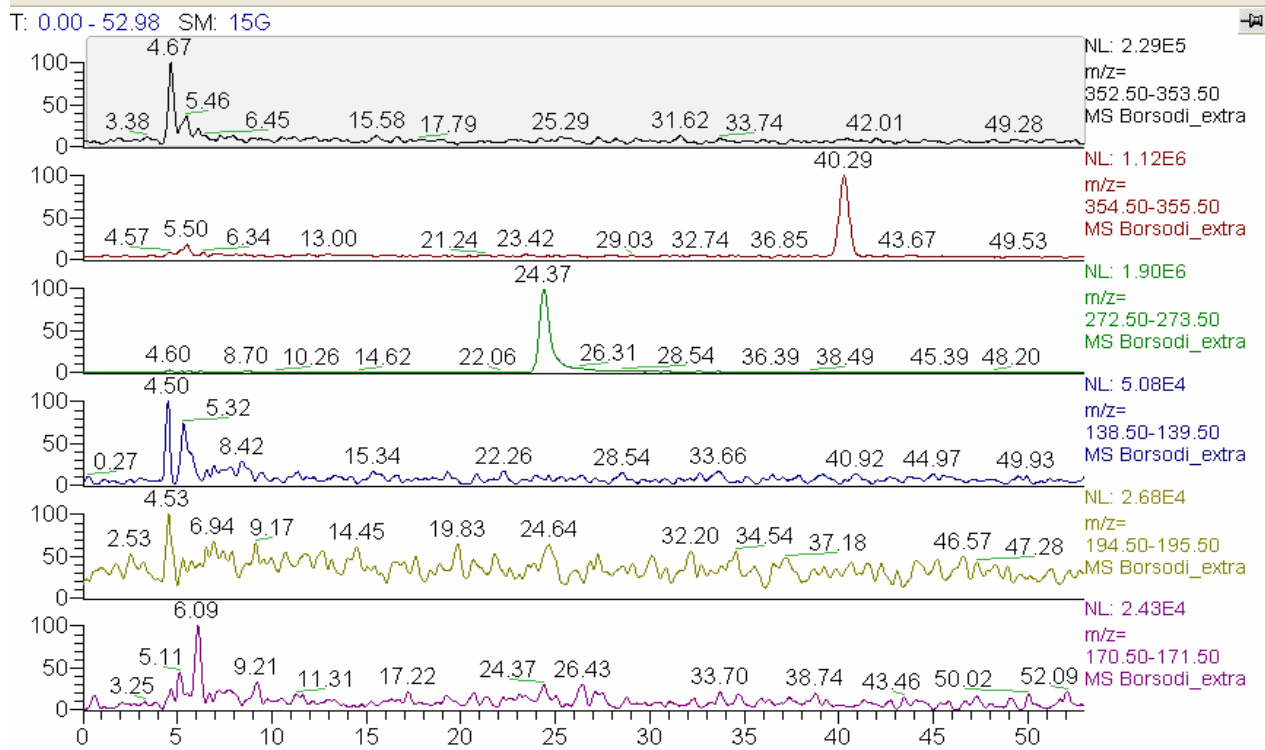
Obr. 43 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů českého piva Velkopopovický Kozel



Obr. 44 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů slovenského piva Zlatý Bažant



Obr. 45 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů maďarského piva Arany Ászok



Obr. 46 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů maďarského piva Borsodi



Obr. 47 - Chromatografický záznam vybraných polyfenolů maďarského piva Szalon

#### 4.6.3 Přehled ostatních specifík testovaných piv

Souhrnné tabulky 17a, 17b, 17c, 17d zobrazuje shrnutí ostatních vypořádaných výsledných jevů charakterizujících chování fenolických látek i ostatních neidentifikovatelných složek - opět pro všechny testované značky i piva nealkohlická.

Celkově při hodnocení hmotnostních spekter docházelo ke čtyřem základním situacím, jenž jsou pro zpřehlednění tabulkového záznamu odlišeny různými symboly.

- ✓ Látka 100% přítomna bez jakýchkoli doprovodných složek
- ∩ Záznam řady dokonale separovaných, ovšem neidentifikovatelných píků
- ? Přítomnost látky nejistá × možná
- ✘ Celý průběh analýzy zkruslen šumem ⇒ hledaná látka nedetekována

Tab. 17a – Výsledky kvalitativní analýzy u testovaných piv

<i>Flavonoidy</i>	<i>Mr</i>	<i>Bernard</i>	<i>Bernard nealko</i>	<i>Braník</i>	<i>Březňák</i>	<i>Budweiser</i>	<i>Budweiser nealko</i>	<i>Gambrinus</i>	<i>Staropramen nealko</i>
Chrysin	254,252	⊖	⊖	?	?	?	⊖	?	⊖
Pinocembrin	256,258	⊖	⊖	?	?	?	?	?	?
Techtochrysin	268,269	⊖	⊖	✗	?	?	?	?	?
APIGENIN	270,241	?	⊖	?	?	?	?	?	?
Galantin									
Pinobanksin	272,257	⊖	⊖	?	✓	?	✓	✓	?
NARINGENIN									
Genkwanin	284,268	⊖	⊖	?	?	?	?	?	?
LUTEOLIN	286,24	⊖	?	✓	?	?	?	?	?
KAEMPFEROL									
Eriodictyol	288,25	⊖	?	?	?	?	?	?	?
8-methoxykaemp.	300,265	⊖	?	?	✗	?	?	?	?
Kea 3-methylether	301,271	⊖	⊖	? ✓	⊖	?	?	?	?
Hesperetin	302,27	⊖	?	?	✓	✓	?	?	?
MORIN									
KVERCETIN									
Isorhamnetin	316,27	⊖	?	?	✗	?	?	?	?
Kve 3-methylether									
MYRICETIN	318,24	✓	?	✓	✗	✗	?	✓	?
Kve-3,3'-dimethylether	330,291	?	?	✓	?	?	?	?	?
Kve-3,7-dimethylether									
RUTIN	610,52	?	✓	✗	?	✗	?	✓	?
K. ferulová	194,19	✓	⊖	✓	✗	⊖	✓	⊖	✓
K. galová	170,5	✓	✓	✓	✗	✓	?	✓	✓
K. chlorogenová	354,31	✓	⊖	✓	✗	✓	✓	✓	⊖

Tab. 17b – Výsledky kvalitativní analýzy u testovaných piv - pokračování

	<i>Mr</i>	<i>Bernard</i>	<i>Bernard nealko</i>	<i>Braník</i>	<i>Březňák</i>	<i>Budweiser</i>	<i>Budweiser nealko</i>	<i>Gambrinus</i>	<i>Staropramen nealko</i>
Katechin	290,27	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓
Epikatechin									
Katechin gallát	442,4	?	?	?	?	?	?	?	?
Epikatechin gallát									
Salicylová kys.	138	∩	∩	∩	✗	∩	∩	∩	∩
Protokatechinová	154	∩	∩	?	?	?	∩	∩	∩
p-kumarová kys.	164	?	∩	✗	✗	?	∩	?	∩
KÁVOVÁ	180	?	?	?	✗	?	?	?	?
6-, 8- prenylnaringenin	340	✓	✓	?	✗	?	?	✓	?
Desmethylxanthohumol									
XANTHOHUMOL C	352	✗	?	✓	✓	?	?	✓	?
5,7-Di-O-Me-8-prenylnar.	368	?	?	?	?	?	✓	?	?
4-O-Methylxanthohumol									
XANTHOHUMOL B	370	?	?	?	✓	?	?	?	?
XANTHOHUMOL D									
XANTHOHUMOL E	407	?	?	?	✓	✓	?	?	?
3-geranylchalkonar.	408								
6-geranylnaringenin					✓	?	✓	?	✗
8-geranylnaringenin									
6,8-diprenylnaringenin									
3,5-diprenylnaringenin									
PRENYLXANTHOHUMOL	422	∩	∩	?	✗	?	∩	?	✗
Vanilinová kyselina	244	∩	∩	?	?	✓	?	✓	?
Delphinidin	627	∩	∩	✗	✗	?	?	?	?

Tab. 17c– Výsledky kvalitativní analýzy u testovaných piv - pokračování

<i>Flavonoidy</i>	<i>Mr</i>	<i>Kozel</i>	<i>Heineken</i>	<i>Stella</i>	<i>Zlatý Bažant</i>	<i>Pilsener Urquel</i>	<i>Arany Ászok</i>	<i>Borsodi</i>	<i>Szalon</i>
Chrysin	254,252	∩	×	?	?	∩	?	?	?
Pinocembrin	256,258	∩	?	?	?	∩	?	?	?
Techtochrysin	268,269	∩	?	?	?	∩	?	?	?
APIGENIN	270,241	∩	×	?	?	∩	?	?	?
Galantin									
Pinobanksin	272,257	✓∩	×	×	✓	∩	?	✓	?
NARINGENIN									
Genkwanin	284,268	?	?	?	?	∩	?	?	?
LUTEOLIN	286,24	?	?	?	✓	∩	?	?	?
KAEMPFEROL									
Eriodictyol	288,25	?	?	?	?	∩	?	?	?
8-methoxykaemp.	300,265	∩	×	×	?	∩	?	?	?
Kea 3-methylether	301,271	?	?	✓	×	∩	?	?	?
Hesperetin	302,27	?	?	?	×	?	?	?	?
MORIN									
KVERCETIN									
Isorhamnetin	316,27	?	?	?	?	∩	?	?	?
Kve 3-methylether									
MYRICETIN	318,24	?	?	?	✓	∩	?	?	?
Kve3,3'-dimethylether	330,291	?	?	?	?	∩	?	?	?
Kve 3,7-dimethylether									
RUTIN	610,52	✓	✓	×	✓	?	?	?	?
K. ferulová	194,19	✓	×	×	✓	✓	?	?	?
K. galová	170,5	✓	×	×	×	?	✓	✓	✓
K. chlorogenová	354,31	×	×	×	×	∩	✓	✓	?

Tab. 17d– Výsledky kvalitativní analýzy u testovaných piv - pokračování

		<i>Kozel</i>	<i>Heinekn</i>	<i>Stella</i>	<i>Zlatý Bažant</i>	<i>Pilsener Urquel</i>	<i>Arany Ászok</i>	<i>Borsodi</i>	<i>Szalón</i>
Katechin	290,27	✓	✓	✓	✓	?	✓	?	?
Epikatechin									
Katechin gallát	442,4	?	?	?	?	?	?	?	?
Epikatechin gallát									
Salicylová kys.	138	∩	✗	✗	✗	∩	?	?	?
Protokatechinová	154	∩	✗	?	✗	∩	?	?	?
p-kumarová kys.	164	∩	?	?	✗	∩	?	?	?
KÁVOVÁ	180	?	✗	?	✗	∩	?	?	?
6-, 8- prenylnaringenin	340	∩	✗	?	✗	∩	?	?	?
Desmethylxanthohumol									
XANTHOTHUMOL C	352	✓	✗	?	?	∩	?	?	?
5,7-Di-O-Me-8-prenylnar.	368	?	?	?	?	?	?	?	?
4-O-Methylxanthohumol									
XANTHOTHUMOL B	370	?	?	?	✓	?	?	?	?
XANTHOTHUMOL D									
XANTHOTHUMOL E	407	✓	✓	✗	?	?	✓	?	?
3 –geranylchalkonar.	408								
6-geranylnaringenin		?	?	✓	?	?	✓	?	?
8-geranylnaringenin									
6,8-diprenylnaringenin									
3,5-diprenylnaringenin									
PRENYLXANTHOTHUMOL	422	?	?	?	?	?	?	?	?
Vanilinová kyselina	244	✓	✓	✓	✓	∩	?	?	?
Delphinidin	627	?	?	?	?	∩	?	?	?

Obdobná separace jako pro  $m/z = 138$  (odpovídající kyselině salicylové) byla zaznamenána několikrát také u látek s  $m/z = 154, 164, 256, 288$  a dalších a to výhradně u piv českých - nikoli zahraničních. Zdá se tedy, že tento všeobecně nesledovaný a neuvažovaný profil by mohl napomoci odlišit pravá česká piva od piv jiných a mohlo by být účelné jejich detailnější prozkoumání. Výsledky předložené screeningové studie je však třeba považovat za předběžné a orientační, proto budou pokračovat další analytické studie pro jejich zpřesnění a potvrzení.

#### 4.6.4 Charakteristika českého chmele

Chmel je znám nejen jako pivovarská surovina, ale také jako léčivo s vysokou antioxidační aktivitou, které se na složení hotového piva podílí z více než 30 %. Proto byla provedena také analýza polyfenolů, flavonoidů a celkové antioxidační aktivity vybrané odrůdy českého chmele Sládek – pro srovnání fenolických látek přítomných v pivu a těchto látek přítomných ve chmelu. Vzorek usušených chmelových hlávek byl podroben úpravě dle kapitoly 3.2.1.3 a analyzován pomocí LC/ESI-MS za podmínek uvedených v kapitole 4.3 i spektrofotometricky 3.2.2. Antioxidační aktivita byla určena pomocí ABTS testu. Výsledky těchto stanovení zachycuje *Tab. 18* zahrnující jak identifikaci, tak kvantifikaci polyfenolických látek testovaného chmele. Chromatogramy získané po provedení RP/HPLC/MS/ESI analýzy jsou součástí přílohy 7.

*Tab. 18 - Polyfenoly, flavonoidy a antioxidační aktivita chmele – identifikace a kvantifikace*

<b>Chmel SLÁDEK spektrofotometricky</b>			
<b>Celkové polyfenoly (mg/l)</b>	<b>Celkové flavonoidy (mg/l)</b>		<b>Antioxidační aktivita (mmol/l)</b>
191,381 ±0,002	78,615 ±0,003		0,884
<b>Chmel SLÁDEK – LC/ MS analýza – c (mg/ml)</b>			
Kyselina chlorogenová	-	Kaemferol	1,861
Kyselina ferulová	-	Luteolin, naringenin	-
Kyselina gallová	2,938	Morin	0,757
Katechin	2,059	Rutin	1,152
Epikatechin	2,364	Kvercetin	3,028

Ze získaných výsledků lze vyvodit, že původ kyseliny gallové, katechinu, epikatechinu, kaemferolu, morinu, rutinu, a kvercetinu nalézajících se v pivu leží s největší pravděpodobností ve chmelu, v němž byly tyto látky rovněž identifikovány a jejichž množství je u všech látek vyšší než koncentrace stanovené v hotovém pivu. Naopak o kyselině chlorogenové, ferulové, luteolinu a naringeninu lze dle provedené analýzy s jistotou tvrdit, že z chmele nepochází a jejich zdrojem je tedy pravděpodobně slad.

Obsah celkových polyfenolů (171,381 mg/l) a flavonoidů (78,615 mg/l) v testované odrůdě českého chmele Sládek je srovnatelný s českým pivem značky Gambrinus plechovkovým (173,826 mg/l celkových polyfenolů, 80,762 mg/l celkových flavonoidů). Antioxidační aktivita (0,884 mmol/l) je ve srovnání s tímto pivem (1,036 mmol/l) nižší, což zřejmě svědčí o tom, že v pivu se antioxidační účinky přítomných polyfenolických látek sčítají.

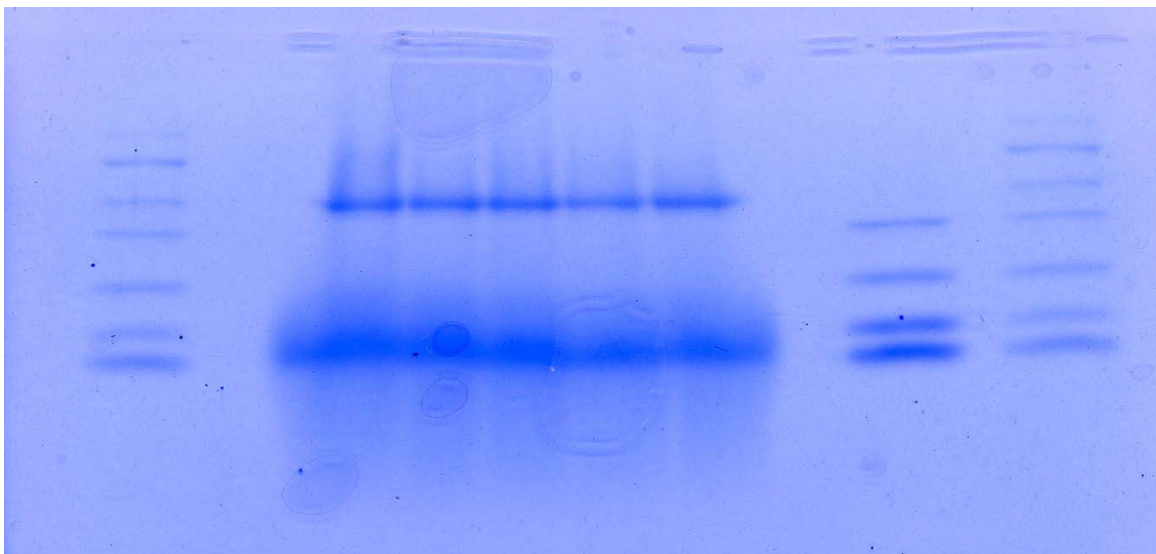
#### **4.7 Stanovení proteinů v modelovém vzorku plzeňského ležáku pomocí Lowryho metody**

Stanovení proteinového složení je další ze strategií použitelnou ke stanovení autenticity piva. V předložené práci byly analyzovány proteiny v modelovém vzorku piva pomocí 1D elektroforézy.

Ve vzorku připraveném dle 3.5.1 byla změřena koncentrace pomocí Lowryho - kolorimetrické metody založené na dvousložkovém činidle, kde první složkou je biuretové činidlo, druhou je Folinovo činidlo. Princip metody spočívá v reakci dusíku peptidové vazby s měďnatým iontem v alkalickém prostředí a následné redukci fosfomolybdenanů s hydroxyfenolovou skupinou tyrosinu na molybdenovou modř. Množství proteinů ve vzorku plzeňského ležáku bylo po přepočtu z regresní rovnice kalibrační křivky hovězího albuminu  $y = 0,5872 x + 0,0102$  stanovena na 4,1 g, což se shoduje se studovanou literaturou (17, 59). (kalibrační křivka uvedena v příloze 4).

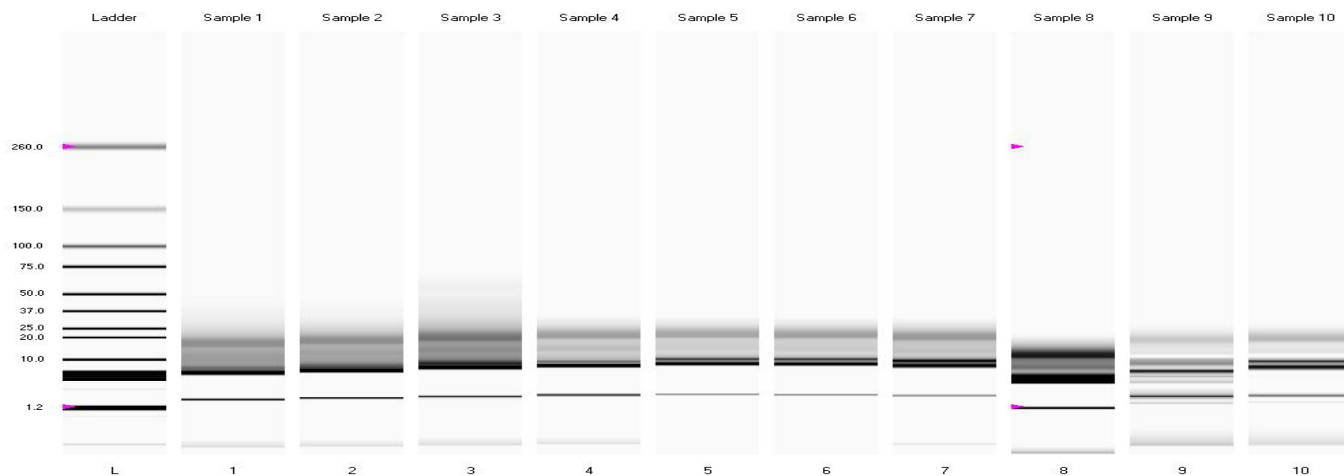
#### **4.8 Stanovení proteinů piva pomocí SDS-PAGE a mikročipové analýzy**

Celkové proteinové složení bylo analyzováno pomocí gelové elektroforézy PAGE-SDS (kap. 3.5.2) a mikročipové elektroforézy (kap. 3.5.3). Výsledky analýz jsou uvedeny na *Obr. 49* a *Obr. 50*.



Obr. 39 - PAGE-SDS vzorků plzeňského piva ležák

1. ....proteinová směs 6 (97,4; 67,0; 45,0; 29,0; 21,0;12,5; 6,5 kDa)
2. ....prázdná linieProteinová směs 5 (29,0; 21,0; 12,5; 6,5 kDa)
- 3.- 7...vzorek lyofilizovaného vzorku plzeňského piva typu ležák
8. ....prázdná linie
9. ....proteinová směs 5 (29,0; 21,0; 12,5; 6,5 kDa)
10. .... proteinová směs 6



Obr. 40 - Mikročipová separace vzorků plzeňského piva ležák

- L. ....proteinový standard, pozice 1. – 10. ... vzorky plzeňského piva typu ležák

Výsledky obou typů elektroforetické analýzy potvrdily přítomnost typických majoritních proteinových frakcí. První velká skupina je tvořena serpiny, zejména proteinem Z, jež obsahuje několik proteinů s kyselým pI a molekulovou hmotností kolem 40 kDa. Další skupinou jsou  $\alpha$ -amylázové inhibitory/trypsin o hmotnostním rozsahu 15 – 19 kDa. Další významnou bílkovinou identifikovanou ve vzorcích piva je LTP. In vivo funkce ječného LTP není známá. Původně bylo uvažováno, že se jedná o inhibitor  $\alpha$ -amylázy nebo proteáz. Po uvaření piva je ječný LTP1 obsažen zejména v pivní pěně, kde přispívá k tvorbě a stabilitě pěny. Molekulová hmotnost LTP1 se pohybuje v rozsahu 10 – 14 kDa. Významnými proteiny jsou B a D hordeiny. Hordeiny jsou řazeny mezi prolaminy, hlavní skupinu obilných zásobních proteinů nacházejících se v zrně. Hordeinové frakce nacházející se v pivě iniciují tvorbu zákalu.

Ječná zrna, stejně jako chmel či kvasinky použité při výrobě piva, obsahují velkou škálu skupin bílkovin, z nichž pouze malá část přejde při procesu výroby piva do finálního výrobku. Konečné složení bílkovin je závislé na vstupních surovinách, resp. na použité technologii a takto lze využít proteomickou analýzu k identifikaci původu piva a ke stanovení jeho jakosti. Z výsledků získaných 1D elektroforézou je patrné, že nelze účinně oddělit frakce proteinů (zejména nízkomolekulární) ani detailně analyzovat proteinové složení jednotlivých druhů piva tak, aby byla získána jednoznačná informace. Za tímto účelem je třeba použít složitější instrumentální techniky – zejména hmotnostní spektrometrii proteinů po předchozí separaci dvourozměrnou elektroforézou. Tato komplexní problematika byla proto samostatně řešena v paralelní diplomové práci.

## 5 ZÁVĚR

- Předložená práce typu screeningové studie byla zaměřena na charakterizaci polyfenolických a dalších aktivních látek (proteiny, hořké látky, alkohol) obsažených v různých pivech typu světlý ležák a na stanovení odlišností produktu České pivo od piv zahraničních.
- V teoretické části jsou uvedena základní fakta o postavení českého piva v naší společnosti i o historii vaření piva. České pivo je velmi oblíbeným nápojem a jeho jedinečnost skladby vychází z několika set let staré tradice českého pivovarnictví. Dále jsou v literárním přehledu popsány suroviny pro výrobu piva, jejich aktivní látky i jednotlivé kroky výroby, jež mají na kvalitu hotového piva rozhodující vliv. Rovněž jsou zde uvedena obecná specifika Českého piva a přehled nejvýznamnějších metod pro stanovení základních aktivních látek piva - polyfenolů a proteinů.
- Experimentální část je soustředěna na analýzu dominantních aktivních látek piva a srovnání výsledků získaných pro jednotlivé vzorky s cílem navrhnout parametry vhodné pro posouzení autenticity. Obsah celkových fenolických látek, celkových flavonoidů, antioxidační aktivity a základních pivovarských parametrů byl stanoven spektrofotometricky. Zastoupení a obsah individuálních flavonoidů byl analyzován kombinovanou metodou RP-HPLC-ESI-MS. V rámci základního chemického rozboru piva byly dále proměřeny podíly skutečného a zdánlivého extraktu, stupeň prokvašení, stupňovitost, obsah alkoholu a hořkých látek. Jako srovnávací vzorek byl použit český chmel odrůdy Sládek. Obsah proteinů byl analyzován pomocí 1D elektroforézy.
- V první fázi práce byly stanoveny obecné a skupinové parametry piv. Typickými charakteristikami Českého piva jsou podle zjištěných výsledků vyšší hodnoty obsahu nezkvašených zbytků extraktu, vyšší hořkost, vyšší obsah polyfenolů i flavonoidů a v souvislosti s tím i vyšší antioxidační aktivita. Vyšší obsah polyfenolů je zřejmě důsledkem dekokční metody rmutování a kvality použitých surovin. Všechny proměřené parametry analytického rozboru piv byly u Českého piva ve srovnání se zahraničními vzorky celkově vyšší, čímž byly potvrzeny jednak rozdíly obou skupin piv a jednak pozitivní vlivy střídavé konzumace piv – obzvláště českých - na lidské zdraví.
- V další části experimentální části práce byly navrženy optimální podmínky separace polyfenolických látek a určeny poměry m/z jejich kvasi-molekulárních iontů, které byly následně využity pro detekci v reálných vzorcích. S využitím LC/MS techniky bylo sledováno celkem 48 polyfenolických sloučenin ve 22 vzorcích piva - 15 vzorků českých, 7 zahraničních. Současně byly zjišťovány rozdíly mezi stejnými produkty balenými v láhvi a plechovce a mezi pivem alkoholickým a nealkoholickým.

- Nejmarkantnější rozdíly mezi Českým pivem a pivem zahraničním stanovené pomocí LC/MS analýzy byly v nalezeny v obsahu a zastoupení kyseliny ferulové, gallové, xanthohumolu C, naringeninů a jeho prenylovaného derivátu. Tyto látky byly v českých pivech zastoupeny v mnohonásobně vyšším množství. U všech českých piv byla dále identifikována řada látek o molekulové hmotnosti 138, jež se nevyskytovala v žádném ze zahraničních vzorků. Obdobný výsledek byl stanoven rovněž u sloučenin s molekulovou hmotností 154, 256, 258 a dalších, kdy u více než 1/3 z testovaných českých značek byly identifikovány až desítky látek odpovídajících těmto hmotám, kdežto u zahraničních nikoliv.
- Na základě kvantitativní analýzy bylo zjištěno, že z testovaných polyfenolů je v pivu v nejvyšší koncentraci obsažena kyselina chlorogenová. Nejnižší obsah byl stanoven pro luteolin, kaempferol a kvercetin. Kvantitativní i kvalitativní rozdíly mezi pivem plechovkovým a lahvovým byly nevýznamné. Ve složení nealkoholického a alkoholického piva určité odlišnosti byly zaznamenány. Z hlediska pozitivního působení na zdraví je však účinek obou těchto typů piva srovnatelný.
- Z porovnání polyfenolických složek obsažených v analyzovaných vzorcích piv se složením českého chmele Sládek lze usuzovat, že katechin, epikatechin, kvercetin, morin a rutin přítomné v pivu mají svůj původ právě ve chmelu. Naopak kyselina chlorogenová, ferulová a naringenin pocházejí s velkou pravděpodobností ze sladu.
- Analýza bílkovin piva byla provedena pomocí vertikální elektroforézy PAGE-SDS a mikrofluidního elektroforetického systému Experion (BioRad). Ze získaných výsledků je zřejmé, že jednotlivé frakce proteinů není možné dostatečně oddělit, a proto ani detailněji analyzovat. Za tímto účelem je nutné využít složitější separační a instrumentální techniky.
- Ze všech provedených experimentů zaměřených na srovnávání českých a zahraničních vzorků ležáckých piv je zřejmé, že se České pivo svým složením významně odlišuje od piv zahraničních. Celkově z předložené screeningové studie vyplývá, že fenolické látky piva mohou být využitelné v praxi ke stanovení autenticity českého piva a posloužit tak k omezení zneužívání značky České pivo u neadekvátních výrobků.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Kolektiv autorů: *Pivo a zdraví: „lidstvo zatím lepší nápoj nevymyslelo!“*. 1. vyd. Plzeň: Nava, 2007. 106 s. ISBN 978-80-7211-253-1.
- [2] Štípek, S a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4
- [3] Nardini M., Ghiselli, A.: Determination of free and bound phenolic acids in beer, *Food Chemistry* 84, str. 137-143, 2004.
- [4] DOSTÁL, Jiří, et al. *Lékařská chemie II: Bioorganická chemie*. 2. vyd. Brno : Masarykova Univerzita v Brně, 2005. Dostupný z WWW: <<http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>>. Přírodní polyfenolové antioxidanty, s. 165. ISBN 80-210-3789-X.
- [5] Verhoef, B.: *Velká encyklopedie piva*. 1. vyd. Čestlice: Rebo productions, 2003. 447 s. ISBN 80-7234-283-5
- [6] Stehlíková, J.: *Organoleptické vlastnosti piva z hlediska degustátorů a běžných konzumentů*. Zlín, 2006. 110 s. 4 s. příloh. Diplomová práce na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně na Ústavu potravinářského inženýrství. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Ignác Hoza.
- [7] Pešta, J.: *Když se v Milevsku vařilo pivo*. 1. vyd. Milevsko: Milevské muzeum, 2008. 257 s. ISBN 978-80-254-1241-1
- [8] Masák J, Pelechová J., Plachý J.: *Speciální mikrobiální technologie*. Praha: VŠCHT, 1992.
- [9] Basařová, G. Historie českého pivovarnictví. *Potravinářská revue*, 2004, roč. 1, č. 2, s. 76-80. ISSN 1801-9102.
- [10] Chládek, L.: *Pivovarnictví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. 207 s. ISBN 978-80-247-1616-9
- [11] Houser, P.: *Stručná historie pivovarství* [online]. 2006, poslední revize 15.3.2007 [cit. 19. 3. 2009]. Dostupné z <[www.gymkh.cz/storage/doc/uceb\\_dokumenty/historie\\_pivo.doc](http://www.gymkh.cz/storage/doc/uceb_dokumenty/historie_pivo.doc)>
- [12] Zýbrt, V.: *Velká kniha piva: vše o pivu*. 1. vyd. Olomouc: Rubico, 2005. 287 s. ISBN 80-7346-054-8
- [13] Janderová, B.: Kvasinky člověku věrnější než pes. *Vesmír*, 2004, roč. 83, č. 4, str. 191. ISSN 1214-4029

- [14] Zpráva o českém pivovarství a sladařství. Český svaz pivovarů a sladoven. Praha (CZ): Český svaz pivovarů a sladoven, 2007
- [15] Veselý, J.: *O pivu obecně*. [online]. 2007, poslední revize 15.3.2006 [cit. 10. 4. 2009]. Dostupné z <<http://www.cspas.cz/index2.asp?KatId=36> >
- [16] Pelikán, M., Míša, D., Dudáš, F.: *Technologie kvasného průmyslu*. Brno: MZLU, 1996. 129 s. ISBN 80-7157-240-3
- [17] Kosař, K.: *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. 398 s. ISBN 80-902658-6-3
- [18] Rychtera, M.: *Bioinženýrství kvasných procesů*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1985, 154 s.
- [19] Dyr, J.: *Chemie a technologie sladu a piva. Díl 1.1*. vyd. Praha: VŠCHT, 1962. 236 s. ISBN 05-225-62.
- [20] Dyr, J.: *Chemie a technologie sladu a piva. Díl 2*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1965. 234 s. ISBN 05-019-65.
- [21] Bognár, P.: *Forman z ČH – první české pivo bez alkoholu*. [online]. 2007, poslední revize 2. 6. 2007 [cit. 3 4. 2009]. Dostupné z <[http://www.kamnapivo.cz/webtrpm/forman\\_z\\_ch\\_prve\\_ceske\\_pivo\\_bez\\_alkoholu.htm](http://www.kamnapivo.cz/webtrpm/forman_z_ch_prve_ceske_pivo_bez_alkoholu.htm) >
- [22] Čepička, J., Karabín, M.: Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty. *Chemické listy*, 2002, roč. 96, č. 2, s. 90-95. ISSN 1213-7103-009-2770
- [23] Velíšek, J.: *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 2002.
- [24] Hořta, P., Dostálek, P., Basařová, G.: Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol?, *Chemické listy* 98, str. 825-830, 2004.
- [25] Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., Piatti, E.: Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells, *Food Chemistry* 104, str. 1635-1640, 2007
- [26] Čížková, H., Dostálek, P., Fiala J., Kolouchová, I.: Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva. *Chemické listy*, 2006, roč. 100, č. 7, str. 478 – 485. ISSN 1213-7103-009-2770.
- [27] Nařízení rady ES č. 510/2006 – „České pivo“

- [28] Forster, A.: *Polyfenoly v žateckém chmelu* [online]. 2003, poslední revize 29. 6. 2004 [cit. 19. 3. 2009]. Dostupné z <<http://www.beer.cz/chmelar/international/polyf.html>>
- [29] DE RIJKE, Eva, et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2006, no. 1112, pp. 31-63. Dostupný z WWW: <[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)>.
- [30] TRČKOVÁ, Marie. *Využití metody LC/MS k analýze vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 100 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Radka Kočí, Ph.D.
- [31] ABAD-GARCÍA, B., et al. Optimization and validation of methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*. 2007, no. 1154, pp. 87-96. Dostupný z: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>.
- [32] TSAO, Rong, DENG, Zeyuan. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography B*. 2004, no. 812, pp. 85-99. Dostupný z WWW: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>.
- [33] TATSIS, Evangelos C., et al. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*. 2007, no. 68, pp. 383-393. Dostupný z WWW: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>.
- [34] Tarola, A. M., Giannetti, V.: Determination by LC polyphenols in Italian red wine. *Chromatographia*, 2007, vol. 65, n. 5-6, pp. 367 – 371. ISSN 0009-5893
- [35] CARERI, M., MANGIA, A., MUSCI, M. Overview of the applications of liquid chromatography - mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A*. 1998, no. 794, pp. 263-297.
- [36] SMYTH, W. Franklin. The use of electrospray mass spectrometry in the detection and determination of molecules of biological significance. *Trends in analytical chemistry*. 1999, vol. 18, no. 5, pp. 335-345.
- [37] CARINI, Marina, et al. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, no. 24, pp. 517-526. Dostupný z WWW: <[www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)>.
- [38] ABIAN, J. The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 1999, no. 34, pp. 157-168.

- [39] Agilent Technologies: *Basics of LC/MS*. USA: Agilent Technologies, 2001.
- [40] Davídek J. a kol.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977.
- [41] Halienová, A.: *Využitie rôznych elektroforetických techník k analýze proteínov v komplexných biologických vzorkách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2006. 94 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [42] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.
- [43] Šafařík, I.: *Izolace enzymů* [online]. 2006, poslední revize 23. 11. 2006 [cit. 25. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://www.usbe.cas.cz/people/safarik/Prednasky-na-JcU/Enzymologie>>.
- [44] Tekel', J.: *Vybrané kapitoly z analytickej chémie*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2005. 194 s. ISBN: 80-223-1988-0.
- [45] Dolník, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2003 – 2005. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, no. 1, pp. 126 – 141. ISSN 0173-0835.
- [46] Khandurina, J., Guttman, A.: Bioanalysis in microfluidic devices. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 943, no. 2, pp. 159-183. ISSN 0021-9673.
- [47] Fiorini, G., Chiu, D.: Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques*, 2005, vol. 38, no. 3, pp. 429-446. ISSN 0736-6205.
- [48] Kodíček, M. a kol.: *Základní principy měření molekulových hmotností* [online]. 2005, poslední revize 23. 8. 2005 [cit. 3. 5. 2009]. Dostupné z <<http://biomikro.vscht.cy/maldiman/cy/theory/basics.php>>.
- [49] Aplikace moderních metod stanovení antioxidační aktivity k hodnocení kvality chmele a senzoričké stability pív. Chmelařský institut. Žatec (CZ): Chmelařský institut, 2004.
- [50] Vančura, M., Bednář, J.: *Pivovarsko-sladařská analytika*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1966. 312 s. ISBN 64-823-66.
- [51] Dvořáková, M., Hulín, P., Karabín, M., Dostálek, P.: Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech Journal of Food Sciences*, 2007, roč. 25., č. 4, s. 182 – 188. ISSN 1212-1800

- [52] Thermo Finnigan: *Getting started*. USA: Technical publications, 2003.
- [53] MĚŘÍNSKÁ, R. *Studium fenolických látek ve vybraných biologických materiálech s využitím metody LC/MS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 59 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Radka Kočí, Ph.D.
- [54] SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. *Organic Chemistry*. 8th edition. New York : Wiley, 2004. ISBN 0-471-41799-8. Conjugated Unsaturated Systems, pp. 609-615.
- [55] Verner P: *LC/MS systémy* [online]. 2007, last revision 2007 [cit. 20.4 2009]. Dostupné z <<http://www.spectronex.cz/index.php?mm=2&sm=2>>).
- [56] DE RIJKE, Eva, et al. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography A*. 2003, no. 984, pp. 45-58. Dostupný z WWW: <[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)>.
- [57] Zotou, A., Frangi, E.: Development and Validation of an SPE-LC Method for the Simultaneous Determination of trans-Resveratrol and Selected Flavonoids in Wine. *Chromatographia*, 2008, vol. 67, n. 9 – 10, pp. 789 – 793. ISSN 0009-5893.
- [58] Bazoti, F., Gikas, E., Skaltsounis, A., L., Tsiropoulos, A.: Development of a liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica chimica acta*, 2006, vol. 573, n. 74, pp. 258 – 266. ISSN 0003-2670.
- [59] Mrháková, I., Perlín, C., Sekavová, H., Šmrha, O., Štiková, O.: *Potravinové tabulky*. 1. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 1993. 66 s. ISBN 80-85120-44-5.
- [60] García A., Grande C., Gándara S.: 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, vol. 1054, no. 1-2, s. 175-180.
- [61] Friedrich, W., Eberhardt, A., Galensa, R.: Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 2002, vol. 211, n. 1, pp. 56 – 64. ISSN 1438-2377.
- [62] Kellner, R., Lottspeich, F., Meyer, H.E.: *Microcharacterization of Proteins*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 325 p. ISBN 3-527-30084-8.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

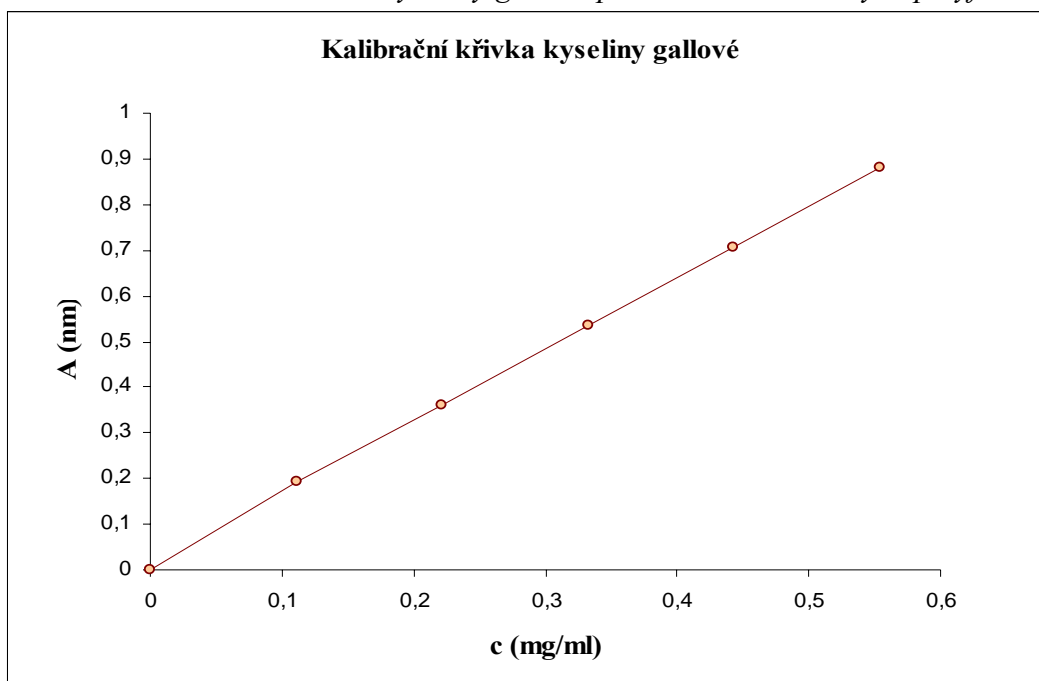
AA	akrylamid
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
APS	persíran amonný
BIS	N,N-metylen-bis-akylamid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl
EI	ionizace elektronem
ESI	elektrosprej
FITC	fluorescein isothiokyanát
GC	plynová chromatografie
HMW	high molecular weight
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatopgrafie
IEF	Isoelektrická fokusace
IT	iontová past
LMW	low molecular weight
LTP	lipid transfer protein
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická elektroforéza
MRFA	methionyl arginyl phenylalanyl-alanin acelát monohydrát
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PAGE-SDS	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Q	kvadrupólový analyzátor
RDA	Retro-Diels-Alderovy reakce
redest.	redestilovaná voda
RP	reverzní typ chromatografie
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce pevnou fází
TEMED	tetramethylendiamin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TRITC	tetramethylrhodamin
TSI	termosprej
TOF	průletový analyzátor
UV	ultrafialové světlo
VIS	viditelné světlo
TOF	průletový analyzátor

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

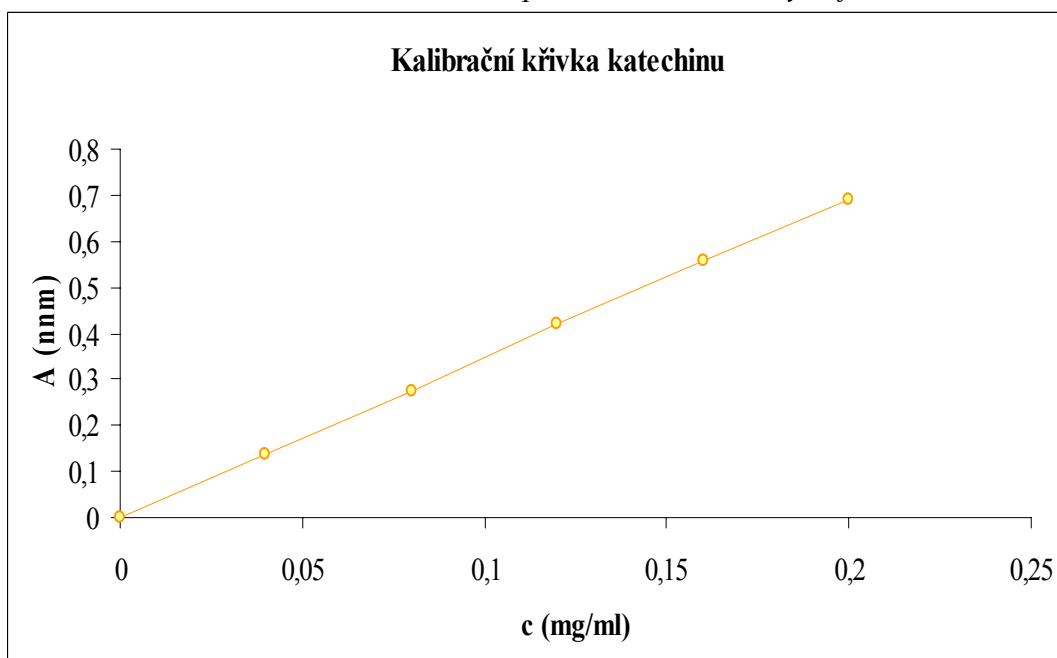
- 1.) Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů
- 2.) Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů
- 3.) Kalibrační křivka kyseliny askorbové pro stanovení celkové antioxidační aktivity metodou za účasti DPPH
- 4.) Kalibrační křivka albuminu pro stanovení celkové koncentrace bílkovin
- 5.) Kalibrační křivky pro dostupné standardy polyfenolů
- 6.) Ukázka výchozích tabulek pro zhodnocení kvalitativního zastoupení fenolických látek v pivech Heineken a Stella Artois
- 7.) Chromatografický záznam LC/MS analýzy polyfenolů u českého chmele Sládek

## 9 PŘÍLOHY

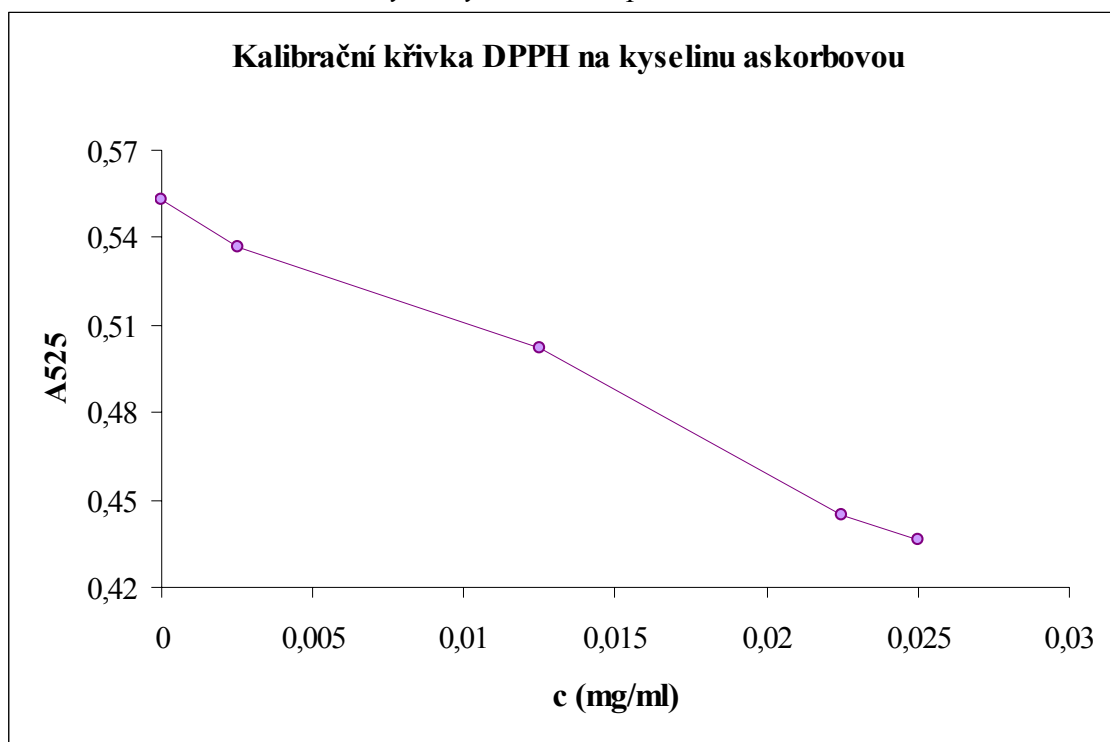
*Příloha 1: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů*



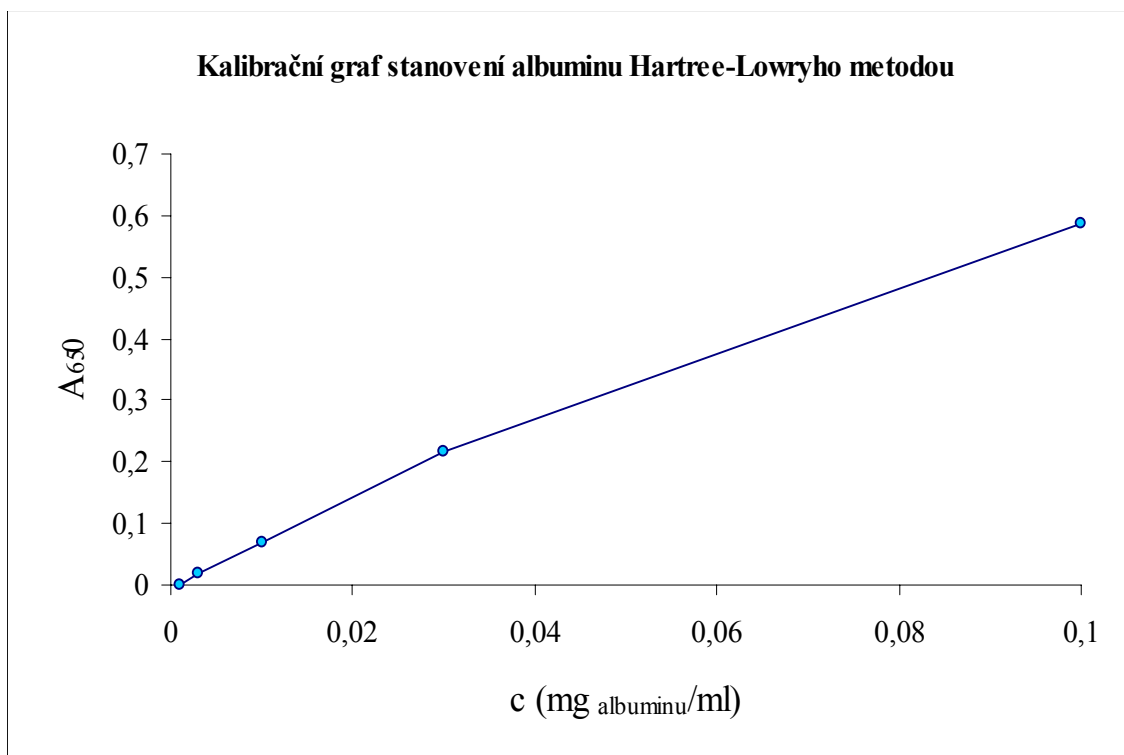
*Příloha 2: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů*



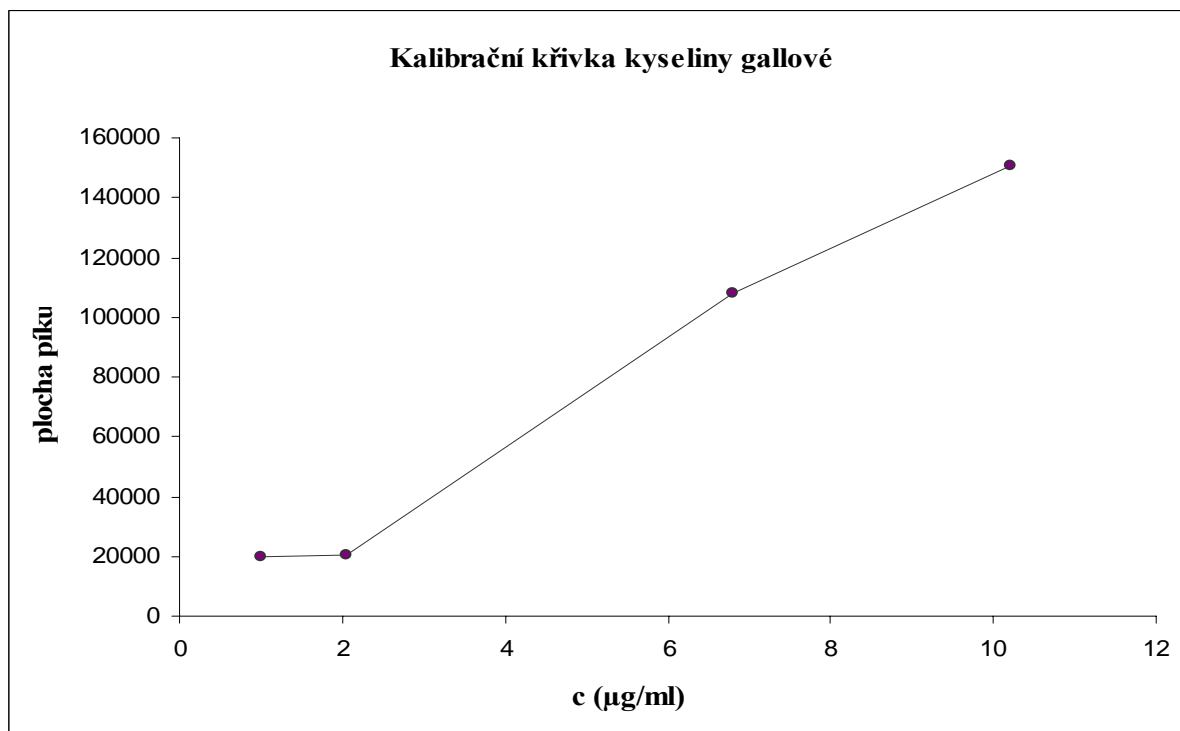
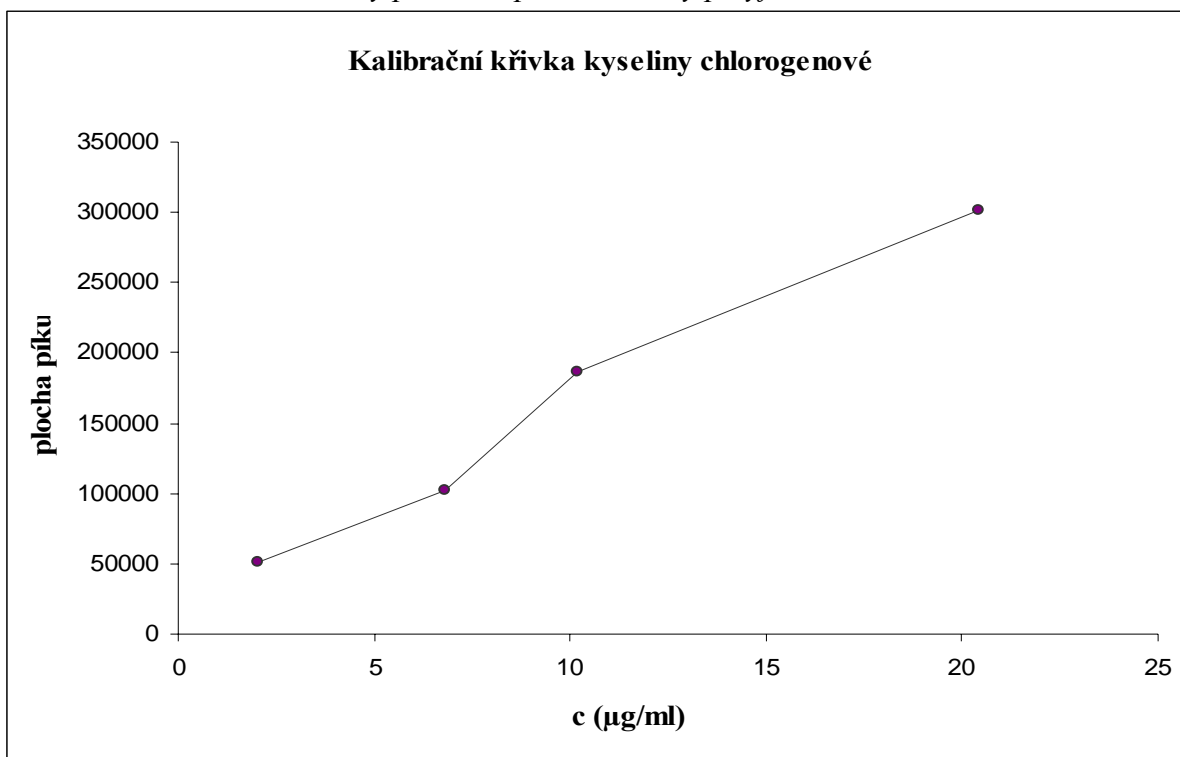
Příloha 3: Kalibrační křivka kyseliny askorbové pro stanovení celkové antioxidační aktivity

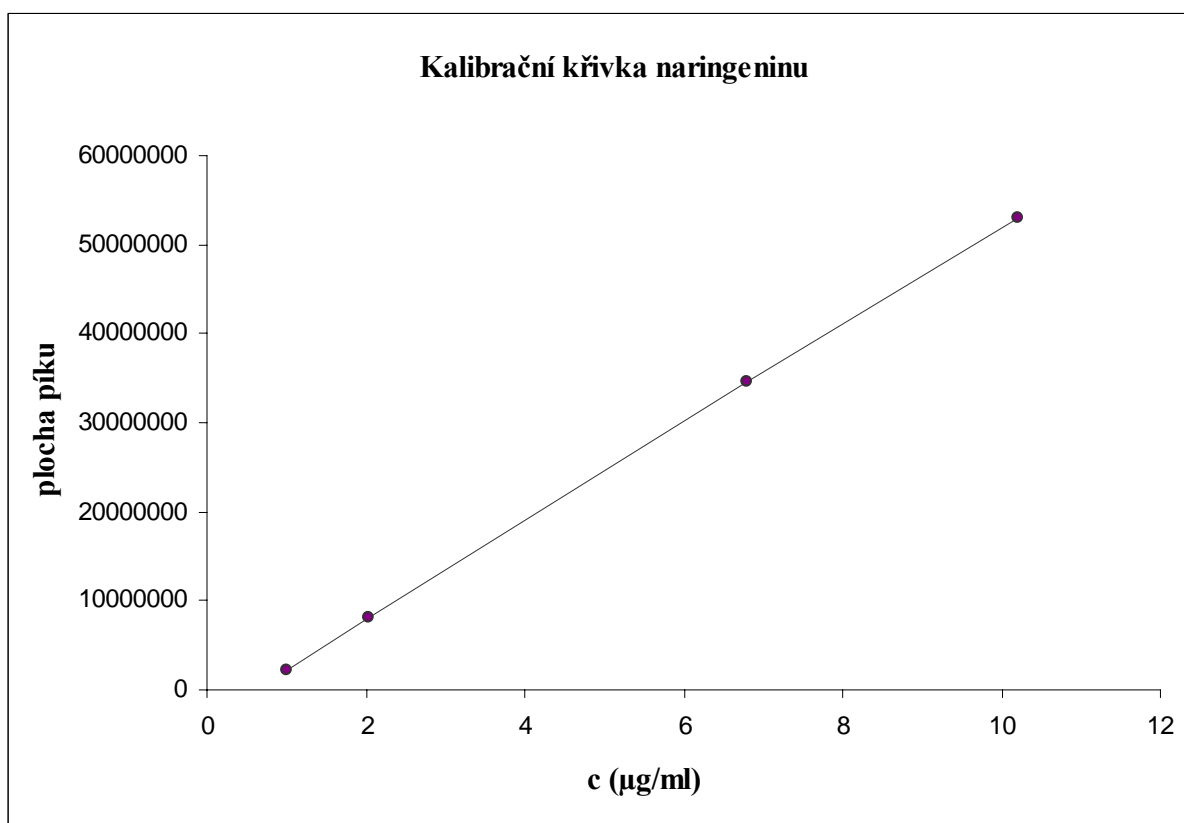
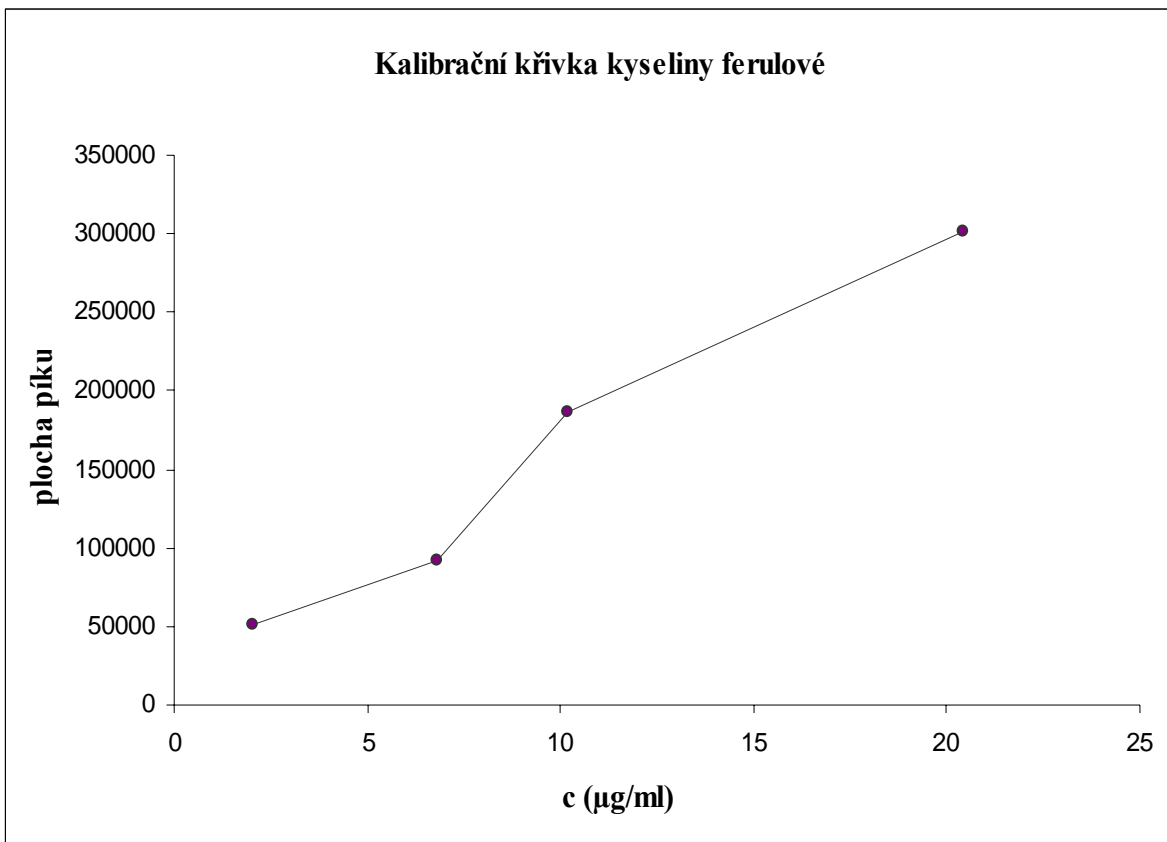


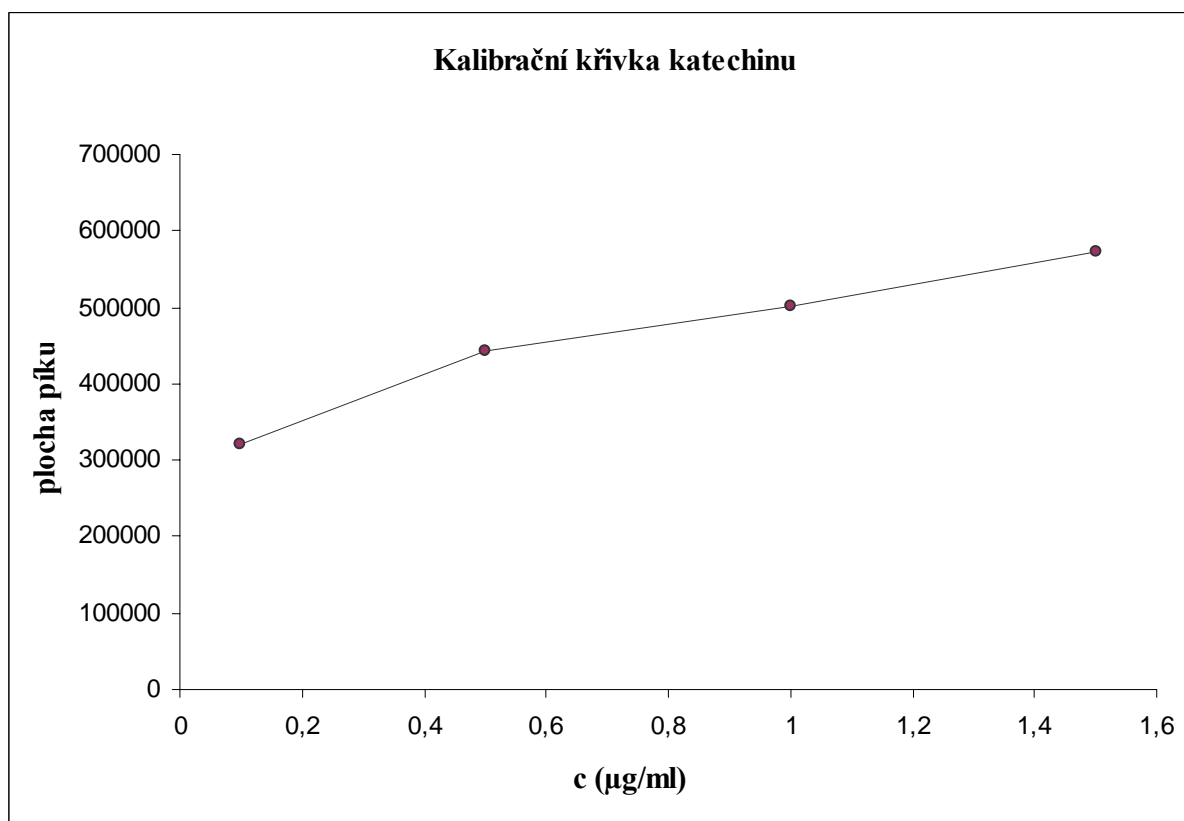
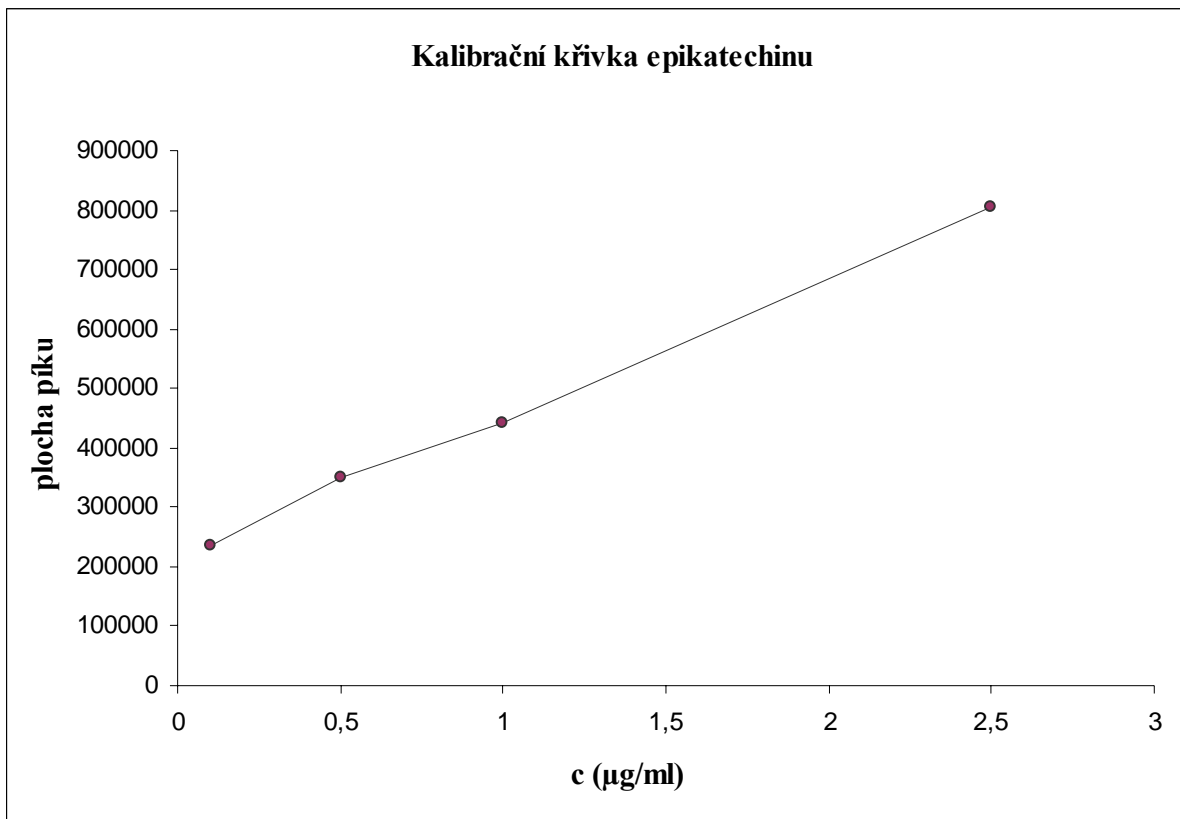
Příloha 4: Kalibrační křivka albuminu pro stanovení celkové koncentrace bílkovin

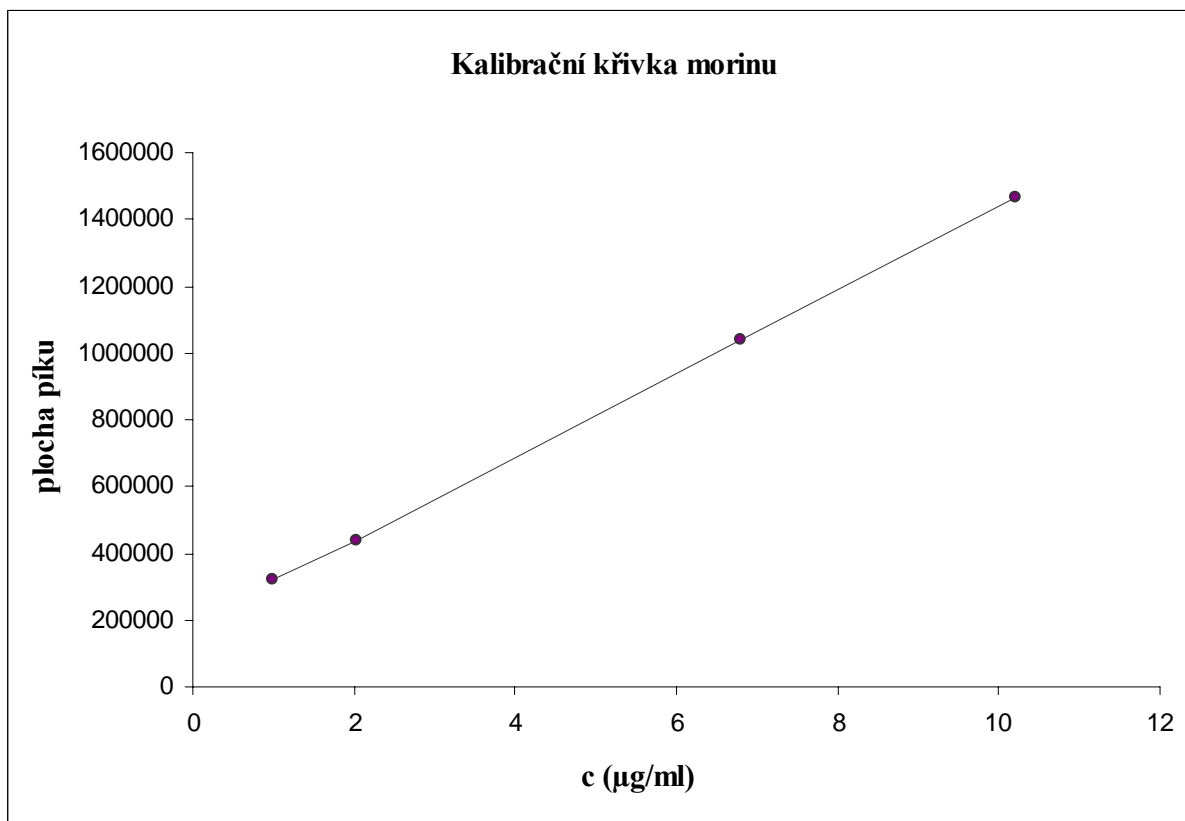
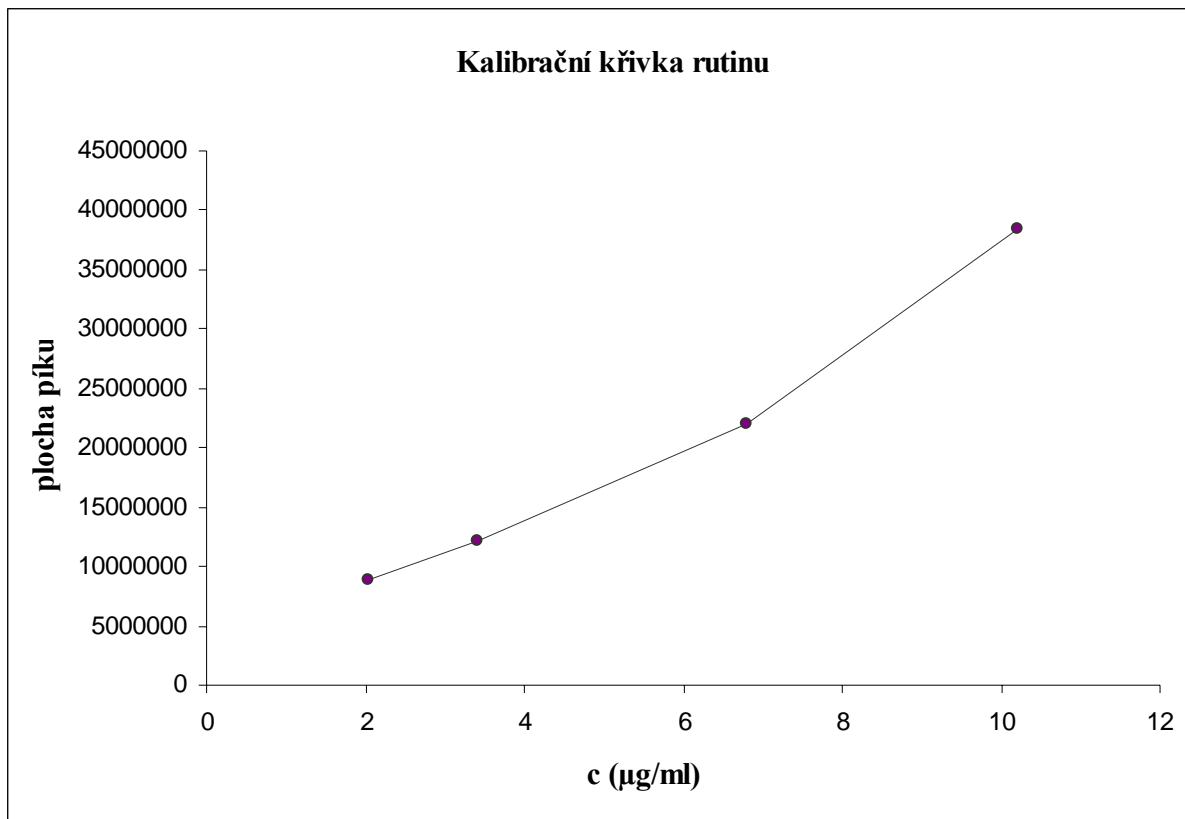


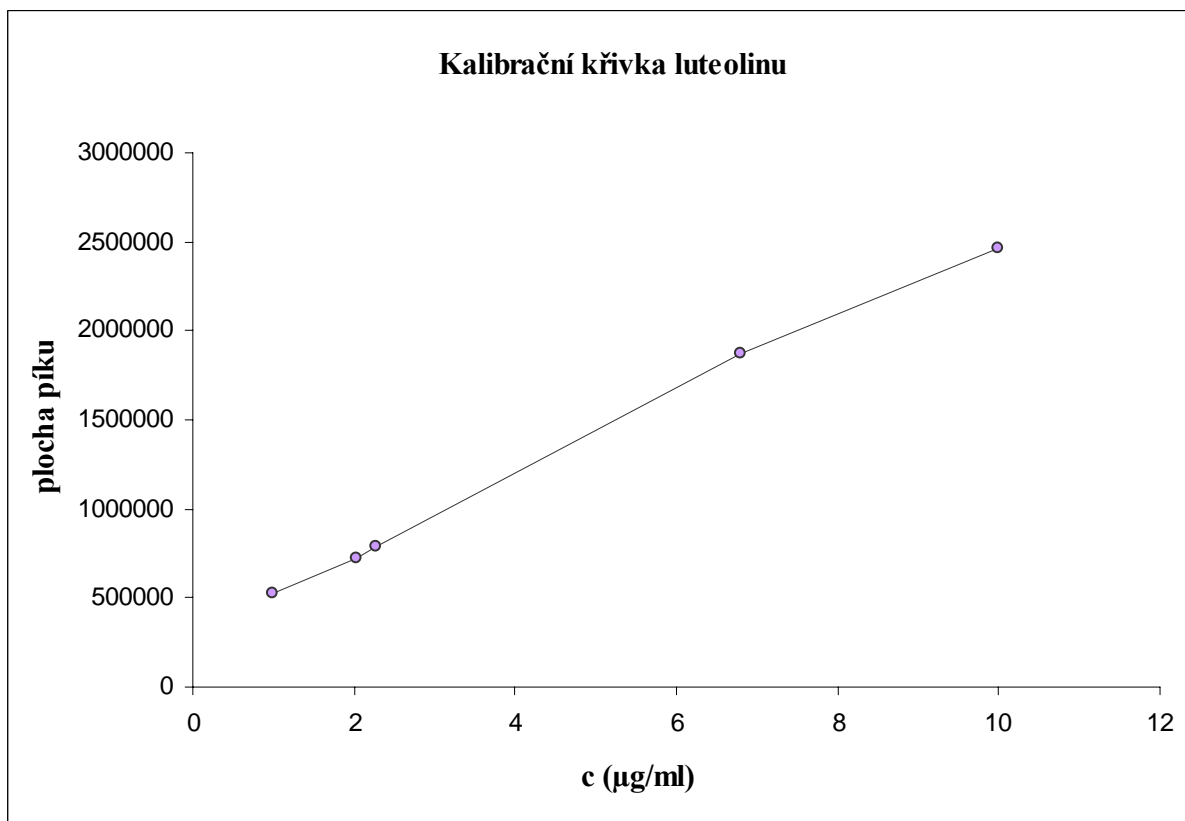
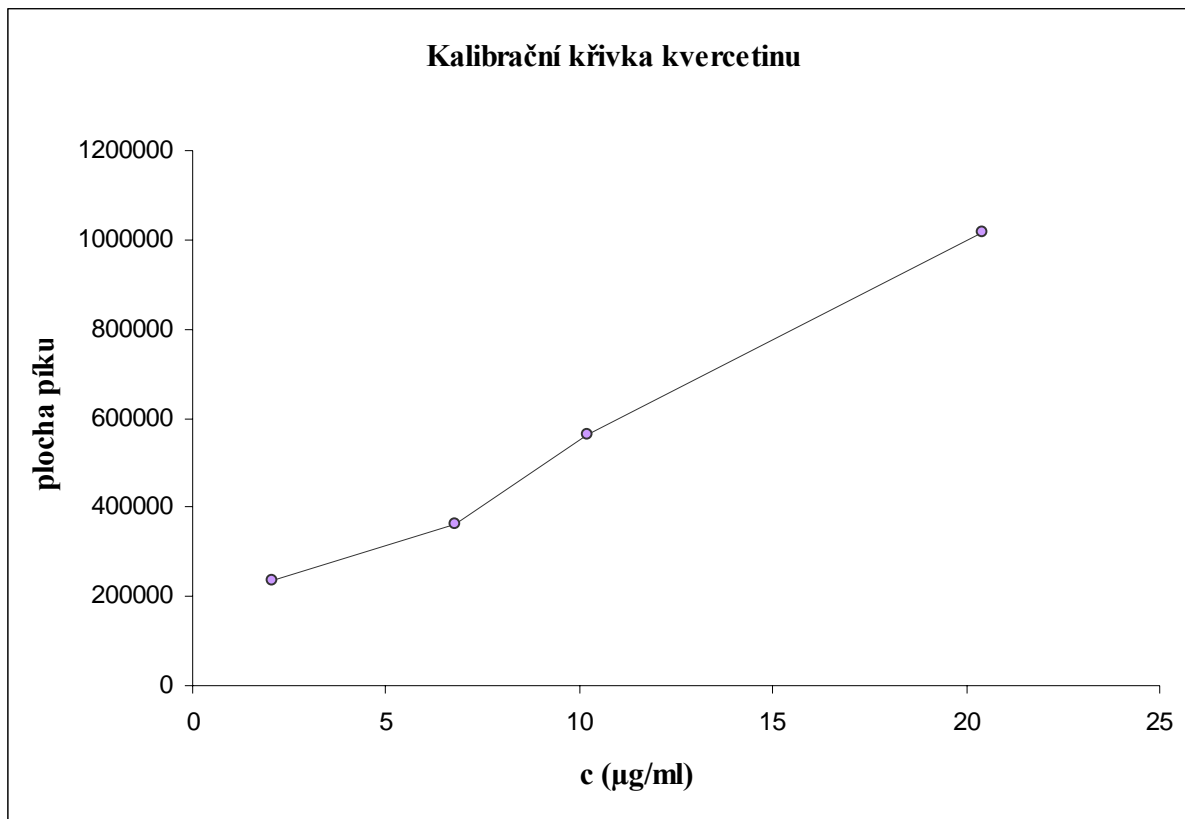
*Příloha 5: Kalibrační křivky pro dostupné standardy polyfenolů*

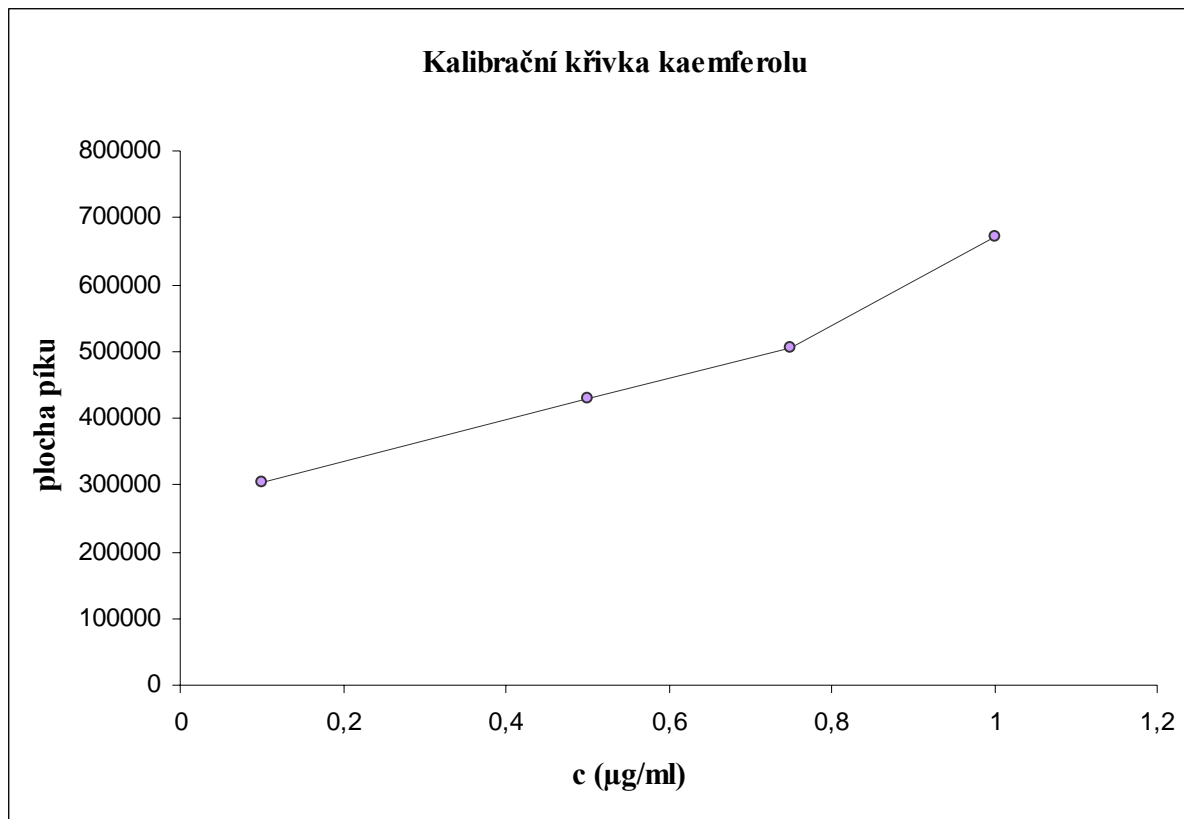












*Příloha 6: Ukázka výchozích tabulek pro zhodnocení kvalitativního zastoupení fenolických látek v pivech Heineken a Stella Artois*

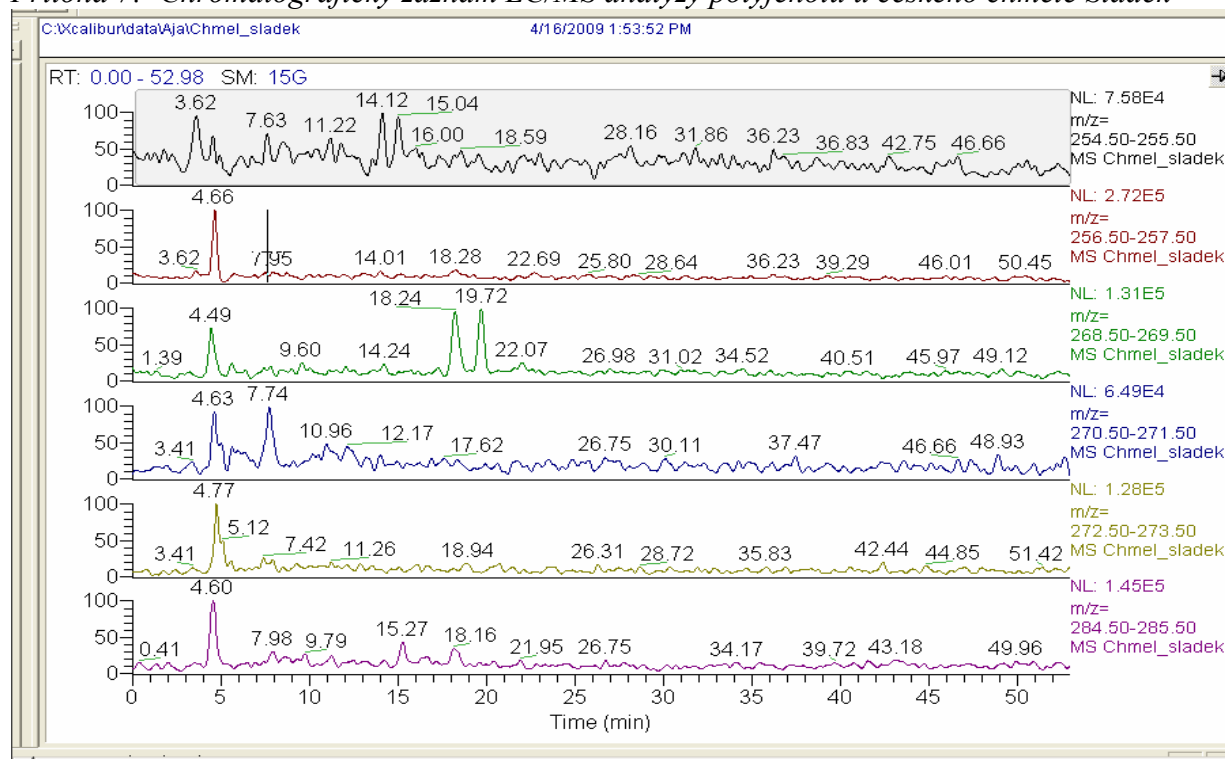
Polyfenol	Mr		Heineken lahev	Stella	Stella plech
ISORHAMNETIN	316,27	$t_R$	4,54; 5,32	3,57	28,69
Kve 3-methylether		$RI_{max}$	$\Rightarrow 2,71 \cdot 10^5$	$\Rightarrow 3,52 \cdot 10^5$	$\Rightarrow 1,86 \cdot 10^3$
MYRICETIN	318,24	$t_R$	4,57	4,8	31,29
		$RI_{max}$	$\Rightarrow 7,85 \cdot 10^5$	$\Rightarrow 1,47 \cdot 10^6$	$\Rightarrow 1,93 \cdot 10^3$
Kve 3,3'-dimethylether	330,291	$t_R$	6,36; 6,88; 29,48; 50,97	1,49; 6,47	8,15; 13,55; 23,96
Kve 3,7'-dimethylether		$RI_{max}$	$\Rightarrow 4,01 \cdot 10^5$	$\Rightarrow 3,08 \cdot 10^5$	$\Rightarrow 1,27 \cdot 10^3$
RUTIN	610,52	$t_R$	5,02	-	-
		$RI_{max}$	$\Rightarrow 6,37 \cdot 10^5$	$\Rightarrow -$	$\Rightarrow -$

Polyfenol	Mr		Heineken lahev	Stella	Stella plech
Chrysin	254,252	t <sub>R</sub>	-	4,8; 5,54	11,62; 22,66;
		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒ 1,51.10 <sup>5</sup>	⇒8,85.10 <sup>2</sup>
Pinocembrin	256,258	t <sub>R</sub>	4,54; 26,27; 52,48	4,83	11,86;
		RI <sub>max</sub>	⇒1,87 .10 <sup>5</sup>	⇒2,71.10 <sup>5</sup>	⇒6,75.10 <sup>2</sup>
Techtochrysin	268,269	t <sub>R</sub>	4,47; 8,85; 51,61	5,41	8,78
		RI <sub>max</sub>	⇒1,61.10 <sup>5</sup>	⇒3,39.10 <sup>2</sup>	⇒6,75.10 <sup>2</sup>
APIGENIN	270,241	t <sub>R</sub>	-	16,97	; 41,41
Galangin		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒1,65.10 <sup>3</sup>	⇒1,01.10 <sup>3</sup>
Pinobanksin	272,257	t <sub>R</sub>	-	-	-
NARINGENIN		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒-	⇒-
Genkwanin	284,268	t <sub>R</sub>	4,54; 7,64; 8,5; 15,62	4,76; 5,31	4,67; 6,7; 11,19; 18,52; 26,91; 30,62; 3,22; 48,35; 52,16
		RI <sub>max</sub>	⇒2,1.10 <sup>5</sup>	⇒3,84.10 <sup>5</sup>	⇒4,05.10 <sup>2</sup>
LUTEOLIN	286,24	t <sub>R</sub>	6,6; 7,13; 26,76	7,12	7,48; 27,72
KAEMPFEROL		RI <sub>max</sub>	⇒4,73.10 <sup>5</sup>	⇒3,09.10 <sup>5</sup>	⇒1,04.10 <sup>3</sup>
Eriodictyol	288,25	t <sub>R</sub>	6,39; 7,13; 47,04	4,73; 7,26; 47,29	8,2; 49,17
		RI <sub>max</sub>	⇒4,18.10 <sup>5</sup>	⇒	⇒7,5.10 <sup>2</sup>
8-methoxykaemp.	300,265	t <sub>R</sub>	-	-	-
		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒ -	⇒-
Kea 3-methylether	301,271	t <sub>R</sub>	27,43; 34,97	45,02;	46,33
		RI <sub>max</sub>	⇒1,72.10 <sup>5</sup>	⇒1,91.10 <sup>3</sup>	⇒1,37.10 <sup>3</sup>
Hesperetin	302,27	t <sub>R</sub>	6,36; 8,06	44,95	42,98
MORIN		RI <sub>max</sub>	⇒1,52.10 <sup>5</sup>	⇒3,48.10 <sup>5</sup>	⇒2,69.10 <sup>5</sup>
KVERCETIN					

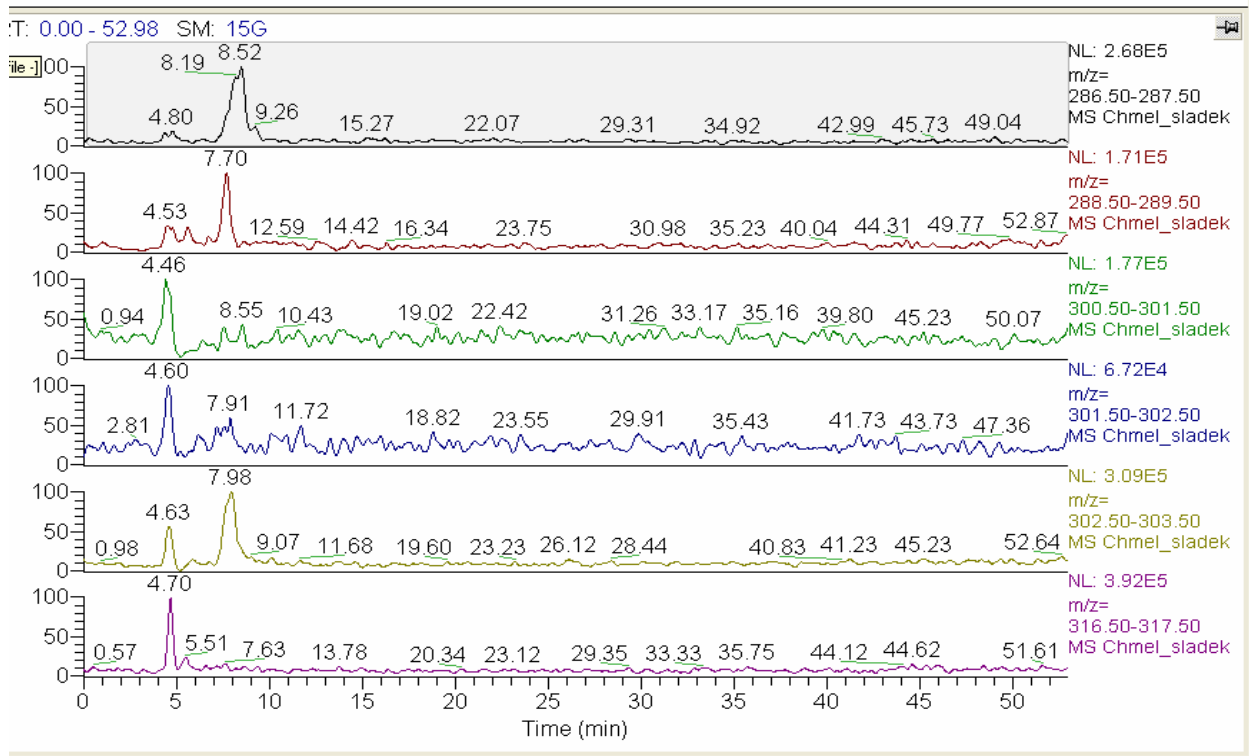
Polyfenol	Mr		Heineken lahev	Stella	Stella plech
Salicylová kys.	138	t <sub>R</sub>	-	-	-
		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒-	⇒-
Protokatechinová	154	t <sub>R</sub>	-	3,5	38,42
		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒1,96.10 <sup>5</sup>	⇒9,32.10 <sup>2</sup>
p-kumarová kys.	164	t <sub>R</sub>	4,5; 5,32	4,73; 2,22	7,33
		RI <sub>max</sub>	⇒3,92.10 <sup>5</sup>	⇒4,24.10 <sup>5</sup>	⇒7,28.10 <sup>5</sup>
KÁVOVÁ	180	t <sub>R</sub>	-	10,62	11,96; 20,93;
		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒3,00 .10 <sup>3</sup>	⇒1,45.10 <sup>3</sup>
6-, 8- prenylnaringenin	340	t <sub>R</sub>	-	4,5; 12,66	15,82; 20,35;
Desmethylxanthohumol		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒3,2.10 <sup>5</sup>	⇒1,33.10 <sup>3</sup>
XANTHOHUMOL C	352	t <sub>R</sub>	-	1,46; 4,7	4,87; 5,6;; 27,77;
		RI <sub>max</sub>	⇒-	⇒7,06.10 <sup>5</sup>	⇒9,65.10 <sup>2</sup>
5,7-Di-O-Me-8-prenylnar.	368	t <sub>R</sub>	6,43; 7,78; 23,53	23,0	24,83; 25,82
4-O-Methylxanthohumol		RI <sub>max</sub>	⇒4,19.10 <sup>5</sup>	⇒1,63.10 <sup>3</sup>	⇒2,35.10 <sup>3</sup>
XANTHOHUMOL B	370	t <sub>R</sub>	6,36; 49,89	7,09	7,62; 9,94
XANTHOHUMOL D		RI <sub>max</sub>	⇒4,33.10 <sup>5</sup>	⇒3,1.10 <sup>5</sup>	⇒1,42.10 <sup>3</sup>
XANTHOHUMOL E	407	t <sub>R</sub>	6,12; 6,5; 10,68; 23,5; 49,89	-	-
		RI <sub>max</sub>	⇒3,42.10 <sup>5</sup>	⇒-	⇒-
3 –geranylchalkonar.	408	t <sub>R</sub>	6,67; 23,33; 50,03;	23,2	22,28
6-geranylnaringenin 8-geranylnaringenin 6,8-diprenylnaringenin 3,5-diprenylnaringenin		RI <sub>max</sub>	⇒6,07.10 <sup>5</sup>	⇒5,54.10 <sup>5</sup>	⇒3,09.10 <sup>3</sup>
PRENYLXANTHOHUMOL	422	t <sub>R</sub>	5,88; 7,23	4,73; 5,68	7,09; 12,11
		RI <sub>max</sub>	⇒5,02.10 <sup>5</sup>	⇒3,8.10 <sup>5</sup>	⇒1,28.10 <sup>3</sup>
Vanilinová kyselina	244	t <sub>R</sub>	4,47; 14,3	4,5; 14,3	14,23; 15,67
		RI <sub>max</sub>	⇒1,98.10 <sup>6</sup>	⇒4,11.10 <sup>5</sup>	⇒7,11.10 <sup>2</sup>
Delphinidin	627	t <sub>R</sub>	6,29; 7,09	14,09	14,66
		RI <sub>max</sub>	⇒2,4.10 <sup>5</sup>	⇒1,29.10 <sup>5</sup>	⇒2,67 .10 <sup>5</sup>

Katechiny	Mr		Heineken	Stella	Stella plech
Katechin	290,27	t <sub>R</sub>	5,02	4,73; 5,48	5,59; 37,94;
Epikatechin		RI <sub>max</sub>	⇒2,51.10 <sup>5</sup>	⇒3,39.10 <sup>5</sup>	⇒
Katechin gallát	442,4	t <sub>R</sub>	4,88; 9,36; 18,81;	4,83	4,97; 30,61; 50,82
Epikatechin gallát		RI <sub>max</sub>	⇒3,38.10 <sup>5</sup>	⇒1,33.10 <sup>6</sup>	⇒1,69.10 <sup>3</sup>

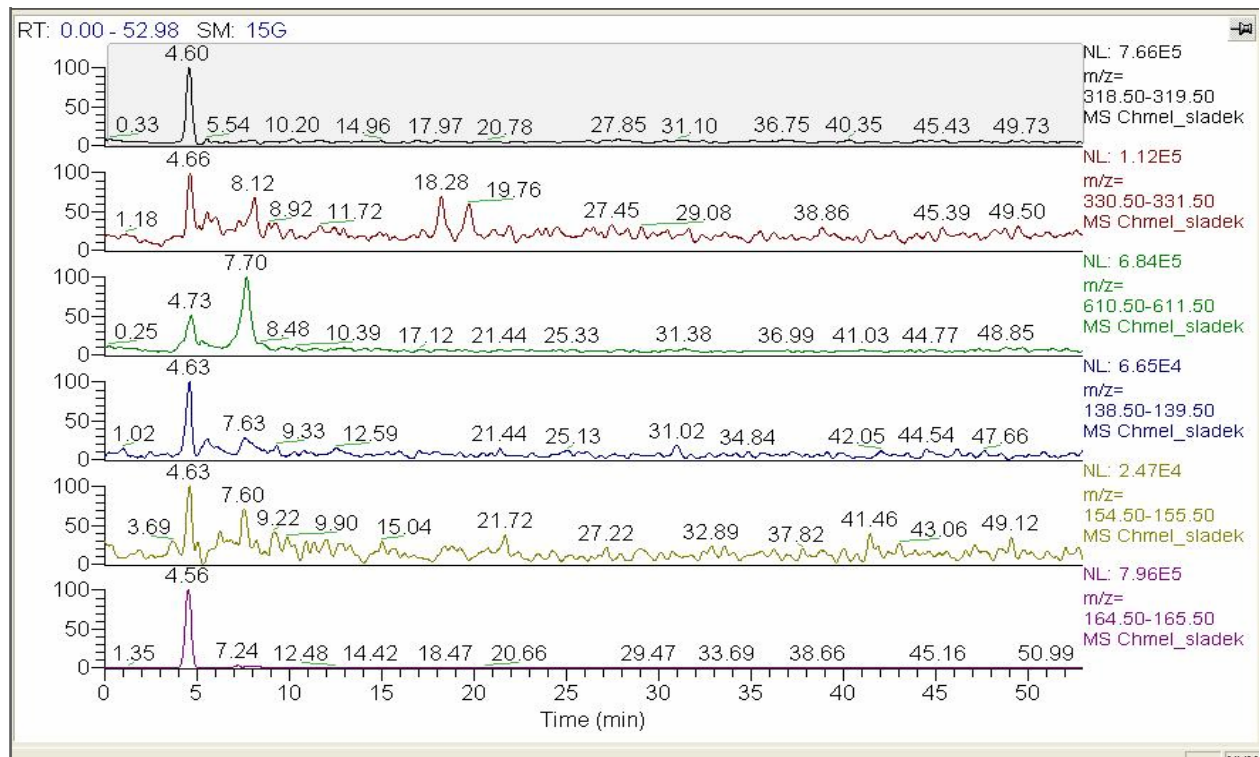
Příloha 7: Chromatografický záznam LC/MS analýzy polyfenolů u českého chmele Sládek



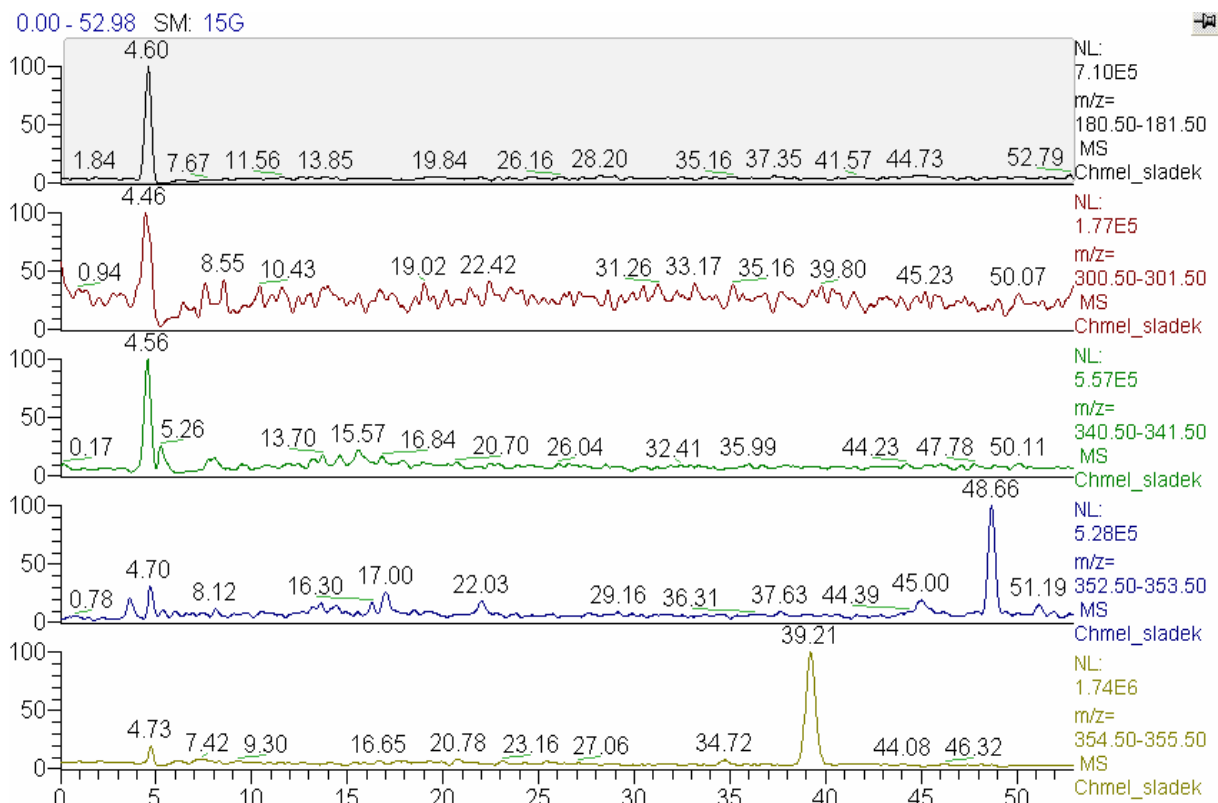
Obr. 51a - Výsledek kvalitativní analýzy chmele odrůdy Sládek



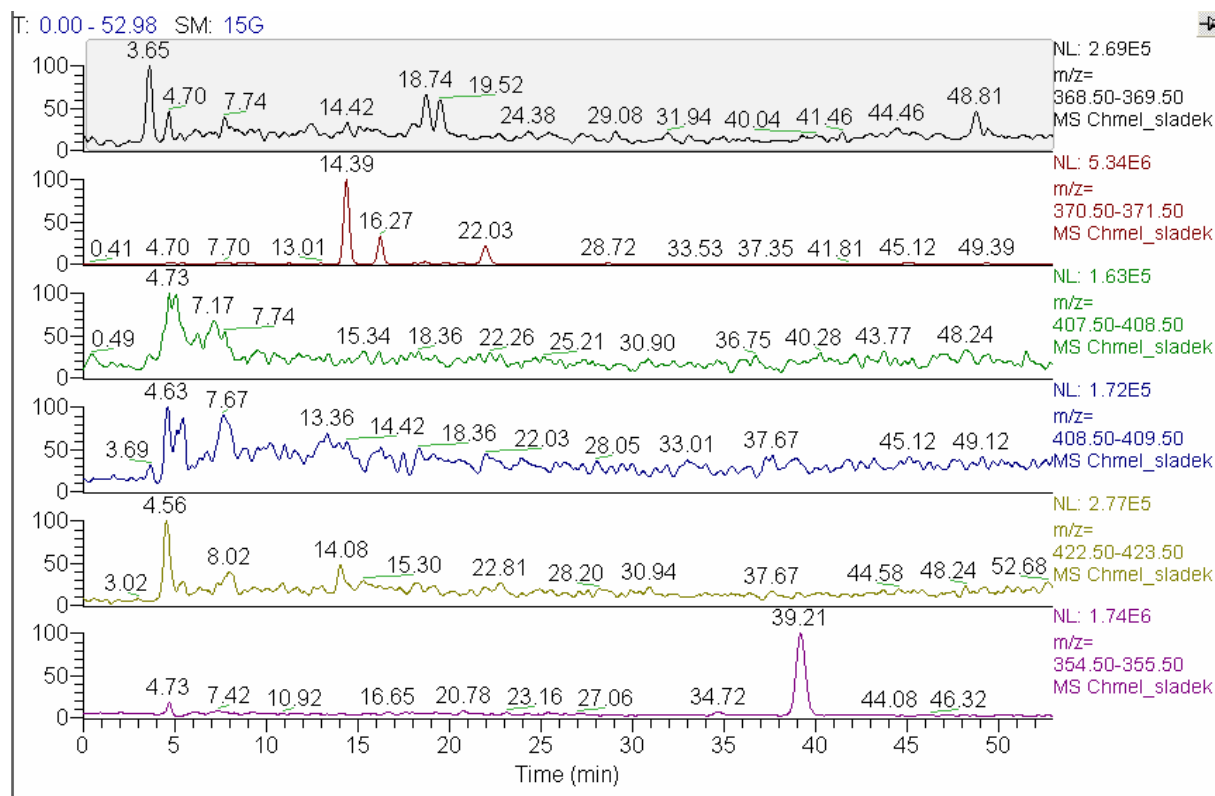
Obr. 51b - Výsledek kvalitativní analýzy chmele odrůdy Sládek – pokračování



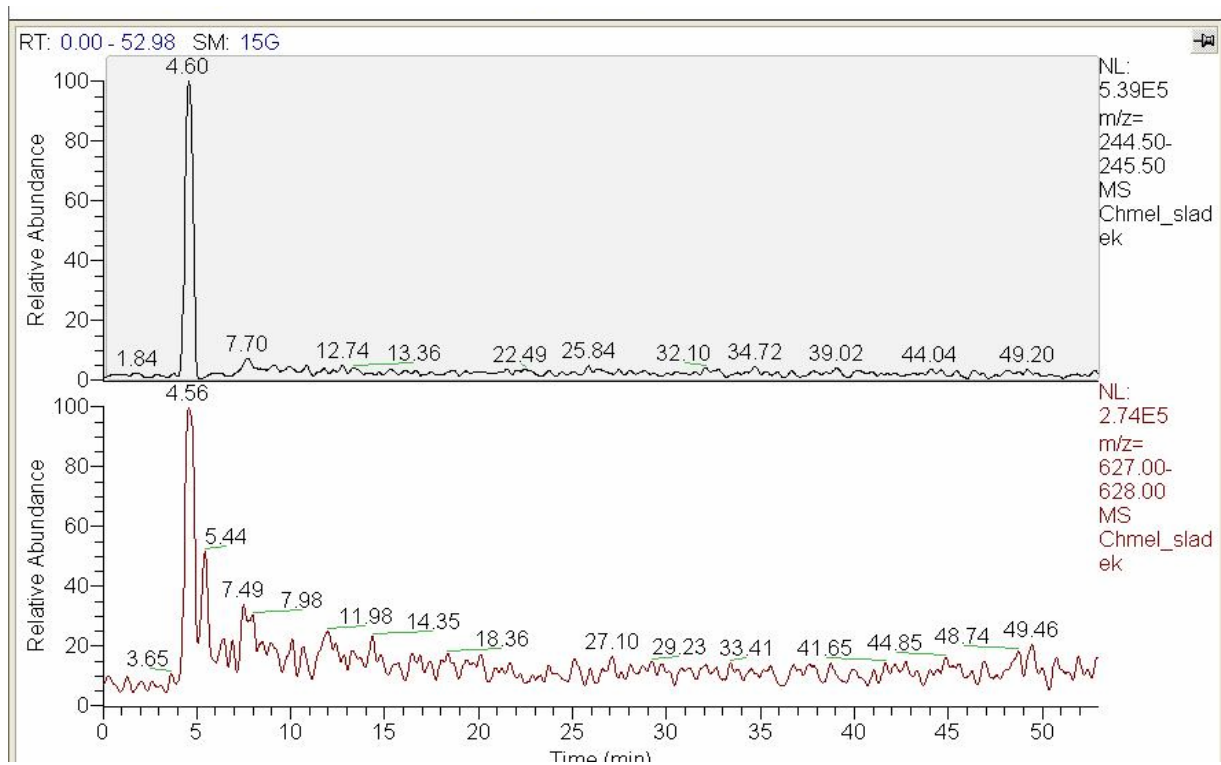
Obr. 51c - Výsledek kvalitativní analýzy chmele odrůdy Sládek- pokračování



Obr. 51d - Výsledek kvalitativní analýzy chmele odrůdy Sládek – pokračování



Obr. 51e - Výsledek kvalitativní analýzy chmele odrůdy Sládek- pokračování



Obr. 51f - Výsledek kvalitativní analýzy chmele odrůdy Sládek - pokračování