



MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ OBSAHU POLYFENOLOVÝCH LÁTEK V PIVU VOLBOU SUROVIN A TECHNOLOGIE

Alexandr Mikyška

Certifikovaná metodika

MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ OBSAHU POLYFENOLOVÝCH LÁTEK V PIVU VOLBOU SUROVIN A TECHNOLOGIE

Autorský kolektiv:

Autor:

Ing. Alexandr Mikyška

Spoluautoři:

Ing. Martin Dušek, Ph.D., RNDr. Marie Jurková, CSc., Mgr. Vladimíra Jandovská, Mgr. Tomáš Vrzal, Ph.D., Ing. Martin Slabý, Ing. Vratislav Psota, CSc.

Posudek pracovníka státní správy:

Ministerstvo zemědělství ČR,
Odbor potravinářský
Těšnov 65/17, 11000 Praha 1


Ing. Zdeněk Švec

Posudek odborného oponenta z oboru:

Budějovický Budvar, n. p.
K. Světlé 512/4
370 04 České Budějovice

Ing. Petr Košin, Ph.D.

Osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky č. 1/2020-18120 vydal Odbor Potravinářský Ministerstva zemědělství ČR.

	Projekt TE02000177 "Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků,, řešený s podporou TA ČR
---	---

Interní číslo metodiky : VÚPS/2020/M002

© Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2020

ISBN 978-80-86576-71-8

MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ OBSAHU POLYFENOLOVÝCH LÁTEK V PIVU VOLBOU SUROVIN A TECHNOLOGIE

Obsah

I. CÍL METODIKY	4
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
II a) Polyfenoly v surovinách a pivu	5
II b) Slad	9
II c) Chmel	13
II d) Rmutování	20
II e) Chmelovar	23
II f) Kvašení, filtrace.....	27
II f) Souhrn.....	31
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU	33
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	33
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY.....	33
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	34
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	36

I. CÍL METODIKY

Výroba piva je sice velmi stará, ale značně složitá biotechnologie, na komplexně pojímanou kvalitu finálního výrobku mají stěžejní vliv použité pivovarské suroviny i proces jejich zpracování ve sladařské a pivovarské výrobě. V minulosti byla v pivovarství polyfenolům přisuzována spíše negativní role, kondenzované polyfenoly jsou hlavní složkou koloidních, nebiologických zákalů ve skladovaném pivu, a jejich výzkum a sledování bylo motivováno snahou o redukci jejich obsahu a prodloužení koloidní trvanlivosti piva. S nárůstem poznatků o zdravotní prospěšnosti rostlinných polyfenolů se pozornost obrátila k jejich sledování v potravinách a nápojích s cílem podpory jejich obsahu v potravinách.

Tuzemská výroba piva je specifická v tradičním pojetí surovin a technologií, které rezultuje v celosvětově uznávaný fenomén českého piva, reprezentovaný světlým ležákem českého, plzeňského typu. Jedinečnost českého piva byla potvrzena i přijetím Chráněného zeměpisného označení České pivo Evropskou unií v roce 2008. Pro výrobu takového piva je předepsán rámec jak pro suroviny, tak pro technologii při jejich zpracování. Jedním z kvalitativních požadavků je i koncentrace celkových polyfenolů ve světlém ležáku v rozpětí 130 – 230 mg/l.

Polyfenolové látky sladu a chmele mají podle současného stavu poznání bezesporu vliv na kvalitu piva, jeho koloidní i senzorickou stálost. Jedná se o velmi diverzifikovanou skupinu mnoha set látek, jejíž jednotlivé složky se značně liší chemickou strukturou, a tudíž se vyznačují různými vlastnostmi z hlediska chemických, fyzikálně chemických vlastností, antiradikálových a chelatačních schopností, a dalších funkcí, které se uplatňují jak při výrobě piva, tak po jeho konzumaci v lidském organismu. Polyfenolové antioxidanty jsou široce přijímané jako skupina bioaktivních látek s významným preventivními účinky na řadu civilizačních chorob, zejména kardiovaskulární a onkologická onemocnění. Kromě toho jsou některé jednoduché i složitější polyfenoly a jejich oxidační produkty senzoricky aktivní, ovlivňují hořkost a trpkost piva.

Cílem bylo přehledně popsat množství, složení a faktory ovlivňující polyfenolové látky v ječmenu a chmelu a jednotlivých operacích pivovarské výroby a vypracovat metodiku poskytující pivovarům vodítka při výběru surovin a volbě procesních parametrů pivovarské výroby pro dosažení vyšší hladiny polyfenolových látek s potenciálním zdravotním benefitem v mantinelech surovinově technologických podmínek výroby piva dle Chráněného zeměpisného označení České pivo. Metodika byla vypracována jako součást řešení problematiky „Optimalizace procesu výroby Českého piva s ohledem na kvalitu produktu a zdravotně prospěšné látky“ v rámci projektu Technologické agentury České republiky TE02000177.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

II a) Polyfenoly v surovinách a pivu

Polyfenoly ve sladu a chmelu

Polyfenolové látky mají průkazný vliv na kvalitu piva, jeho koloidní i senzoryckou stálost. Důležité jsou i jejich antioxidační vlastnosti, jejich pozitivní role v ochraně složek extraktu piva nebo lidského organismu před nežádoucími účinky oxidativního stresu působením reaktivních forem kyslíku v řetězci radikálových reakcí. Jedná se o velmi diverzifikovanou skupinu čítající několik tisíc látek, jejíž jednotlivé složky se značně liší chemickou strukturou, a proto se vyznačují různými vlastnostmi z hlediska chemických a fyzikálně chemických vlastností, antiradikálových schopností a dalších biologických funkcí. Některé jednoduché i složitější polyfenoly a jejich oxidační produkty jsou senzorycky aktivní, ovlivňují hořkost a trpkost piva.

Polyfenolové látky je možno dělit na fenolické karboxylové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové), kumariny (deriváty kyseliny 4-hydroxy skořicové) a flavonoidní polyfenoly, které zahrnují skupiny flavonoly (např. kvercetin, kempferol, myricetin), flavan-3-oly (katechiny), flavan-3,4-dioly (leukoanthokyanidiny) a prenylflavonoidy (např. xanthohumol, 6-prenylnaringenin). Flavan-3-oly, katechin, epikatechin a gallokatechin jsou schopné tvořit dimery, trimery a oligomery (až 20 monomerních jednotek) známé jako proanthokyanidiny nebo kondenzované taniny. (obr. A1). Polymerní struktury kromě flavonoidů tvoří i fenolické kyseliny a kumariny. Flavonoly a flavan-3-oly ve chmelu i sladu jsou přítomny jak volné, tak ve formě glykosidů, kde nejčastějšími cukernými skupinami jsou D-glukóza a L-ramnóza.

Flavonoly, zejména kvercetin a myricetin i jejich glykosidy, například rutin (kvercetin O-rutinosid) jsou považovány za významné rostlinné polyfenolové antioxidanty, rutin je součástí léčiv i doplňků stravy, nověji se v doplňcích stravy propaguje kvercetin. Flavonoly a jejich glykosidy jsou součástí zejména chmelových polyfenolů. Flavonoly mají pravděpodobně nejsilnější antioxidační účinky ze skupiny flavonoidních polyfenolů. Proanthokyanidiny mají v rostlinách různé fyziologické a obranné funkce. Bylo prokázáno propojení těchto sloučenin s organoleptickými vlastnostmi, antioxidačními vlastnostmi a tím potenciálními zdravotními přínosy.

Významnými strukturálními determinanty antioxidační aktivity polyfenolů jsou OH skupiny na pozici C4' a C3' (O-dihydroxy) vázané na kruhu B (flavanoly katechin a epikatechin, flavanol kvercetin) a 4-oxo skupina na kruhu C, zejména v kombinaci s dvojnou vazbou mezi C2 a C3 (flavanol kvercetin). Flavanoly a flavonoly s OH skupinami na pozici C4' a C3' na kruhu B vykazují chelatační schopnosti. Jsou schopné vázat ionty tranzitních kovů železa a mědi, které katalyzují sled radikálových reakcí vedoucích k tvorbě karbonylů staré chuti v pivu nebo oxidativnímu stresu na buněčné úrovni.

Chmel i slad obsahují jak fenolové monokarboxylové kyseliny, tak flavonoidy. Zvláštní skupinou látek jsou chmelové prenylflavonoidy se spektrem antioxidačních, antikancerogenních, estrogenických, antimikrobiálních a dalších příznivých účinků. Prenylflavonoidy jsou chemicky příbuzné jak polyfenolům, tak hořkým kyselinám chmele.

Sekundární metabolity, hořké kyseliny, silice a polyfenoly se tvoří v chmelových hlávkách v průběhu kvetení a zrání. Hlavní část chmelových polyfenolů je situována v listenech a větenu chmelové hlávky („listové polyfenoly“), prenylflavonoidy jsou vylučovány z lupulinových žláz

spolu s hořkými kyselinami a silicemi. Polyfenoly tvoří přibližně 3 až 6 % sušiny chmelových hlávek.

V cereáliích se polyfenoly nacházejí převážně v buněčných stěnách vnějších obalových vrstev zrna, pluše, osemení, oplodí a aleuronové vrstvě, zatímco jejich obsah v endospermu je značně nižší. V extraktech ječmene a sladu byly nalezeny volné, esterifikované a vázané polyfenolové látky. Většina fenolových kyselin v zrně ječmene je vázána na sacharidy a proteiny a částečně uvolňována při klíčení. Obsah polyfenolů v ječmeni (50 – 100 mg/100 g) je podstatně nižší nežli u chmelu, vzhledem k poměru dávek obou surovin se traduje, že 70 – 80 % polyfenolů v pivu pochází ze sladu.

Jak u chmele, tak u sladu byl prokázán vztah mezi obsahem polyfenolových látek a antioxidační aktivitou měřenou DPPH i jinými metodami a rovněž vztah mezi polyfenolovými látkami a senzorickou stabilitou piva..

Analýza polyfenolů

Analytické metody používané pro stanovení polyfenolů se řídí účelem jejich použití. Skupinové, rutinní metody jsou založeny na specifické reaktivitě určité skupiny polyfenolů a jsou kodifikovány v pivovarských a sladařských analytikách. Jedná se zejména o stanovení celkových polyfenolů, flavanoidů a anthokyanogenů. Pro detailní popis profilu určité skupiny polyfenolových látek jsou pak ve výzkumu aplikovány postupy založené na dělení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostním detektorem. Analytické metody polyfenolových látek a antioxidační aktivity použité v metodice jsou popsány níže.

Skupinové (fotometrické) metody:

1. Celkové polyfenoly (EBC metoda 7.14): Stanovení je založeno na reakci polyfenolů s železitými ionty (citrát železitoamonný) v alkalickém prostředí za vzniku červeného barevného komplexu (fotometrie při 600 nm). Výsledky jsou uvedeny v mg/l pro kapalnou nebo mg/g pro pevnou matici.
2. Anthokyanogeny (MEBAK metoda 2.16.2): Anthokyanogeny (leukokyanidiny, standard delfinidinchlorid) reagují v kyselém prostředí za vzniku červených oxoniových solí (fotometrie při 550 nm). Výsledky jsou uvedeny v mg/l pro kapalnou nebo mg/g pro pevnou matici.
3. Flavanoidy (EBC metoda 9.12): Flavanoidy (katechiny, proanthokyanidiny, standard katechin) reagují v kyselém prostředí s chromogenem (p-dimethylcinnamaldehyd) za vzniku zeleného zbarvení (fotometrie při 640 nm). Výsledky jsou uvedeny v mg/l pro kapalnou nebo mg/g pro pevnou matici.

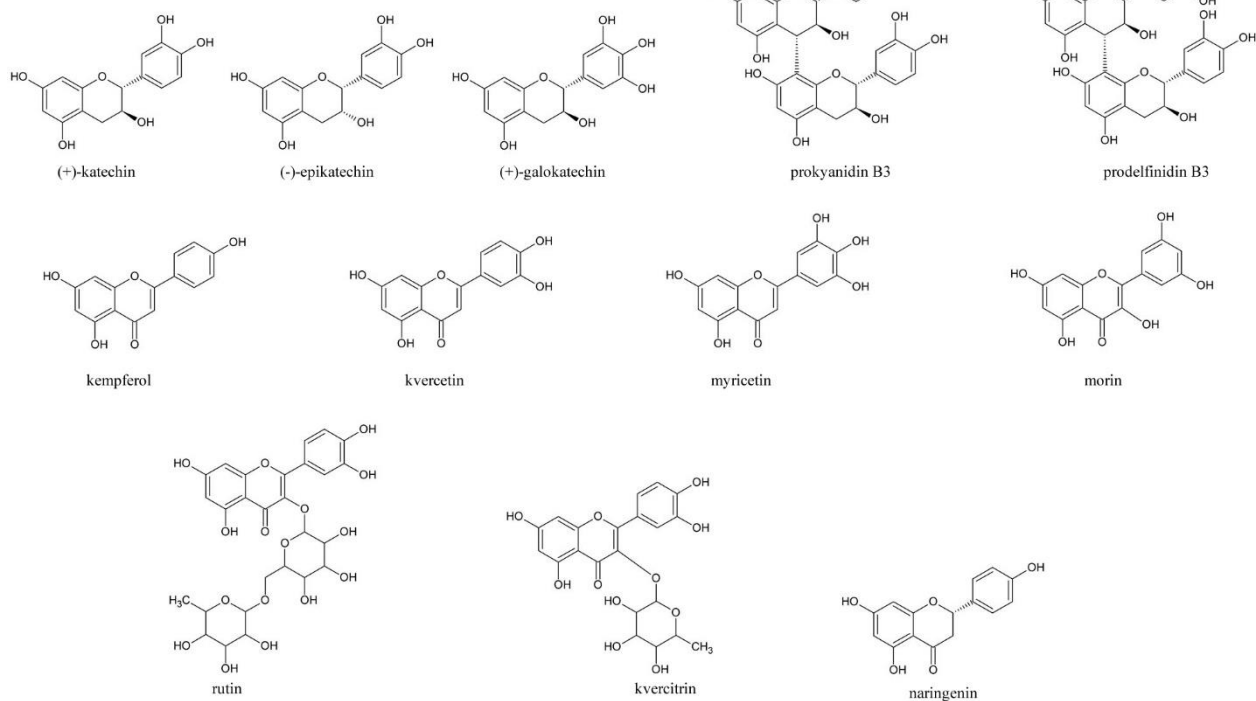
Metody kapalinové chromatografie:

1. Volné fenolické látky: Volné fenolické látky zahrnující 22 sloučenin byly stanoveny s použitím HPLC s coulometrickou detekcí. Kvantifikovány byly flavonoidy: flavanoly (katechin, epikatechin), flavonoly (myricetin, kvercetin, rutin), flavanon (naringin) a flavon (apigenin); volné fenolové kyseliny: hydroxyskořicové kyseliny (ferulová, sinapová, kumarová, chlorogenová a kávová kyselina), hydroxybenzoové kyseliny (p-hydroxybenzoová, gallová, protokatechuová, genistová, vanilová a syringová kyselina); hydroxykumariny (4-hydroxyumarin, umbelliferon, esculin a scopoletin). Výsledky jsou uvedeny $\mu\text{g/g}$ pevné matrice nebo $\mu\text{g/l}$ kapalné matrice.
2. Flavonoidy a jejich glykosidy: Flavonoidy byly stanoveny metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-HR/MS). Kvantifikovány byly: Flavanoly (Katechin, Epikatechin, Katechin-O-glukosid, Epikatechin-O-glukosid), flavonoly (Myricetin, Kvercetin, Kempferol, Rutin, Kvercetin-O-glukosid 1, Kvercetin-O-glukosid 2, Kaempferol-O-glukosid, Myricetin-O-glukosid, Multifidol-O-glukosid, Kvercetin-O-malonylglukosid) a prenylflavonoidy (Isoxanthohumol, Xanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin). Flavonoidy byly z pevné matrice (slad, chmel) izolovány extrakcí 70% vodným acetonem, z kapalné matrice (sladina, pivo) byly izolovány metodou QuEChERS. Výsledky jsou uvedeny v $\mu\text{g/g}$ pevné matrice nebo $\mu\text{g/l}$ kapalné matrice.
3. Proanthokyanidiny: Proanthokyanidiny byly stanoveny metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-HR/MS). Identifikovány byly: monomery katechin, epikatechin, galokatechin, avzelechin, oligomery tvořené různou kombinací těchto monomerů. Proanthokyanidiny byly z pevné matrice (slad, chmel) izolovány extrakcí 70% vodným acetonem, z kapalné matrice (sladina, pivo) byly izolovány metodou QuEChERS. Standardy proanthokyanidinů nejsou až na výjimky komerčně dostupné, výsledky jsou uvedeny v ploše chromatografických vrcholů.

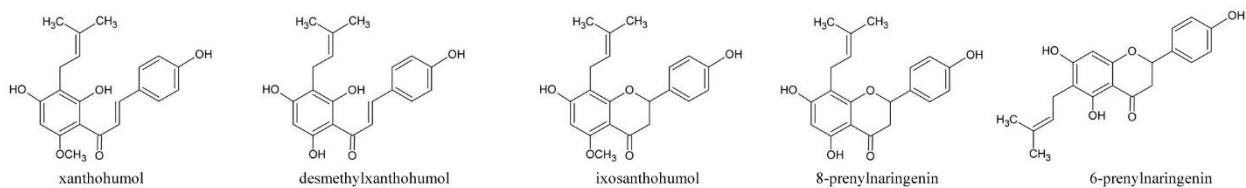
Antioxidační (antiradikálová) aktivita:

1. Antioxidační aktivita je stanovena pomocí volného radikálu DPPH (1,1-difenyl 2-pikryl hydrazyl). Metoda postihuje zejména pomalu redukující látky, především polyfenoly. Stanovují se následující parametry:
DPPH ARA1 (%) – antiradikálová aktivita 1, úbytek hodnoty DPPH po 1 minutě reakce
DPPH ARA2 (%) – antiradikálová aktivita 2, úbytek hodnoty DPPH po 10 minutách reakce
DPPH ARP (%) – integrovaný úbytek hodnoty DPPH 0-10 minut reakce.
2. Redukční kapacita (MEBAK metoda 2.16.1) je stanovena pomocí volného radikálu 2,6-dichlofenolindofenolu (RK-DCPI).

Flavonoidy



Prenylflavonoidy



Fenolové kyseliny

deriváty benzoové kyseliny				deriváty skořicové kyseliny			
	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
p-hydroxybenzoová kyselina	H	OH	H	p-kumarová kyselina	H	OH	H
protokatechuová kyselina	H	OH	OH	kávová kyselina	H	OH	OH
gallová kyselina	OH	OH	OH	ferulová kyselina	H	OH	OCH ₃
vanilová kyselina	H	OH	OCH ₃	sinapová kyselina	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obr. A1 Struktura polyfenolových látek

II b) Slad

Polyfenoly v zrně ječmene jsou obsaženy převážně ve vnějších obalových vrstvách zrna (buněčné stěny pluchy, oplodí, osemení a aleuronové vrstvy), zatímco jejich obsah v endospermu je znatelně nižší. Hlavní podíl proanthokyanidinů je situován v aleuronové vrstvě. Polyfenolové látky jsou vázány v buněčných stěnách a při klíčení uvolňovány z vazeb s neškrobovými polysacharidy a proteiny. V extraktech ječmene a sladu jsou přítomné volné, esterifikované a vázané polyfenolové látky, majoritními složkami fenolových kyselin je ferulová kyselina a flavonoidů katechin. Antioxidační potenciál (DPPH) extraktů ječmene a sladu je v relaci s obsahem polyfenolů. Výzkum vztahu mezi chemickými parametry sladu a senzorickými daty prokázal, že antiradikálová síla sladu, korelující s obsahem polyfenolů ve sladu je hlavním přínosem sladu k senzorické stabilitě piva.

Obsah a složení polyfenolů ve sladu závisí jak na odrůdě ječmene, environmentálních podmínkách (pěstební lokalita, ročník), tak na míře modifikace obilky v průběhu sladování (klíčení). Obsah (rozpuštěných) celkových polyfenolů i volných fenolických látek v zrně ječmene se během klíčení zvyšuje, při hvozdění dochází spíše k degradaci polyfenolů vlivem zvýšené teploty za přítomnosti kyslíku. Obsah celkových polyfenolů uvolněných do sladiny při rmutování závisí na všech výše uvedených faktorech. U odrůd ječmene doporučených pro CHZO České pivo mají nejnižší obsah celkových polyfenolů Blaník a Bojos. Pro Laudis 550 a Francin je možno při středním chmelení ležáku (50 % CO₂ extrakt, 50 % Žatecký poloraný červeňák) očekávat koncentraci celkových polyfenolů v pivu o přibližně 10 % vyšší, pro Malz a Petrus o přibližně 20 % vyšší (Obr. B1).

Čtyřletá studie laboratorních sladů 12 odrůd jarního sladovnického ječmene registrovaných v ČR (Blaník, Bojos, Francin, Kangoo, KWS Irina, Laudis 550, Malz, Petrus, Sebastian, Sunshine, Vendela a Xanadu), připravených shodným postupem sladování prokázala vztah mezi modifikací zrna a obsahem polyfenolů. Koncentrace celkových polyfenolů v laboratorní, infuzní sladině korelovala s proteolytickou a cytolytickou modifikací zrna, reprezentovanými Kolbachovým indexem a friabilitou ($r = 0,377$, $r = 0,356$; $P = 0,05$). U sladiny vyrobené dekokčním, intenzivnějším postupem byl tento vztah ještě silnější ($r = 0,532$, $r = 0,431$, $P = 0,01$).

Dvouletá studie laboratorních sladů 7 odrůd Bojos, Malz, Laudis 550, Petrus, Francin, Kangoo a Sunshine ze šesti lokalit, Uherský Ostroh (UHO), Hrubčice (HE), Jaroměřice n. R. (JAR), Staňkov (STV) a Krásné Údolí (KUD) ukázala obdobné závislosti. Koncentrace celkových polyfenolů v laboratorní, infuzní sladině korelovala s Kolbachovým indexem a friabilitou ($r = 0,611$, $r = 0,779$; $P = 0,01$).

V obou studiích byl prokázán vliv odrůdy na koncentraci celkových polyfenolů ve sladině, ten je ale ve srovnání s pěstební lokalitou, pojatou jako souhrn půdně klimatických podmínek působících v průběhu vegetačního období podstatně nižší.

Obsah celkových polyfenolů ve sladu (sladině), které reprezentují celé spektrum fenolů, volných fenolových kyselin i všech skupin flavonoidních polyfenolů, stanovených nespecificky

na základě redukce železitých iontů na železnaté, vykazuje určitou odrůdovou závislost, silnějším faktorem je ale vliv půdně klimatických podmínek (Obr. B1).

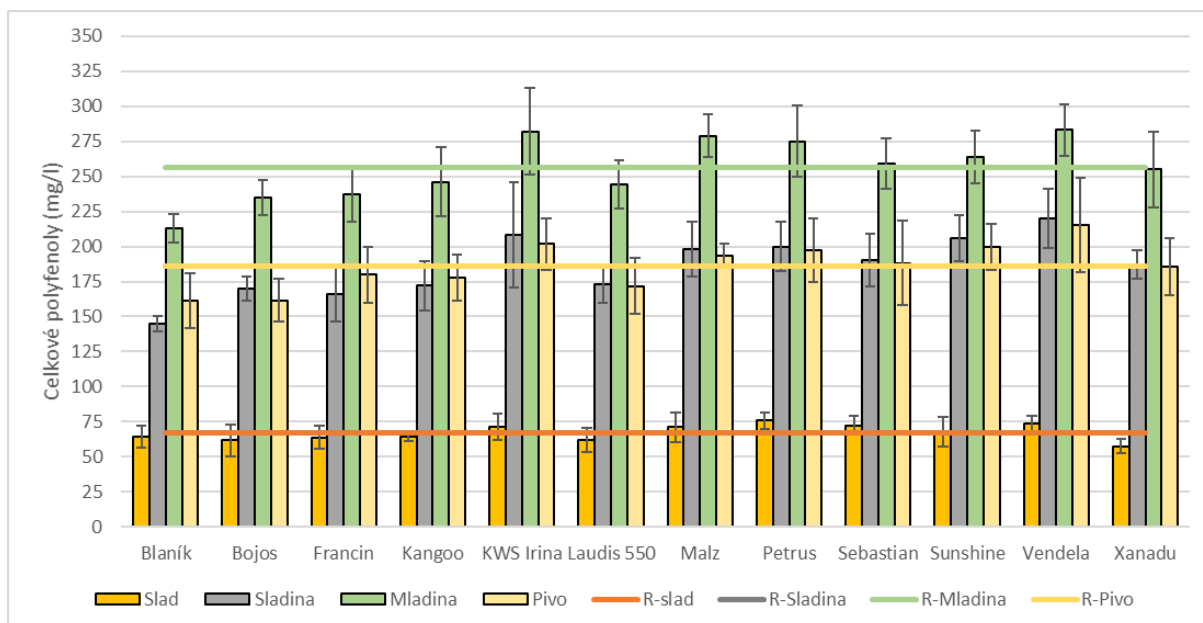
Odrůdově závislé je množství a profil flavonoidních polyfenolů ve sladině. Profil monomerních flavanolů, flavanolů a jejich monoglykosidů je tvořen flavanoly katechinem (C), epikatechinem (EC) a jejich glykosidy, flavonoly a jejich glykosidy jsou minoritní (Obr. B2). Profil proanthokyanidinů (PAC) je tvořen dimery složenými z jednotek (epi) katechinu a (epi)galokatechinu (Obr. B3).

Ve sladech bylo kromě monomerů, katechinu /C/, epikatechinu /EC/ a (epi)galokatechinu /(E)G/ nalezeno 5 různých dimerů (epi) katechin - (epi) katechin /(E)C - (E)C/, 7 trimerů (epi) katechin - (epi) katechin - (epi) katechin /(E(C - (E)C/ - (E)C/, 2 dimery (epi) katechin - (epi) avzelechin /(E(C - (E)A/, 7 dimerů (epi) katechin - (epi) galokatechin /(E)C - (E)G/ a 4 dimery (epi) galokatechin - (epi) galokatechin /(E)G - (E)G/.

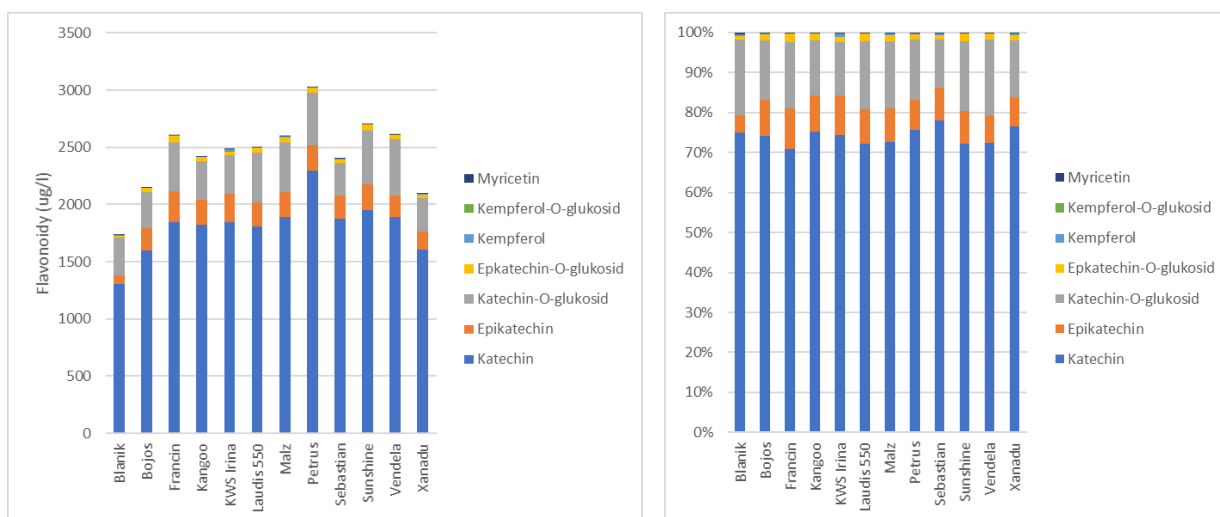
V profilu PAC sladu jsou dominantní dimery, převážnou část tvoří dimery (E) C- (E) G (45 - 55 rel.), (E) C- (E) C (25 - 35% rel.) a dále trimery (E) C- (E) C- (E) C (8 - 12% rel.). Nízký, v jednotkách procent je obsah dimerů (E) G- (E) G, (E)C - (E)A, monomerů (E)G a (E)C.

Ve sladech byly identifikovány a kvantifikovány flavanoly katechin, epikatechin, katechin-O-glukosid a epikatechin-O-glukosid. Z flavanolů to byly kvercetin a myricetin, glykosidy flavanolů nebyly nalezeny v měřitelném množství. Majoritní podíl tvoří katechin (1500 – 3500 µg/l; 65-75 % rel.) a katechin-O-glukosid (500 – 1100 µg/l; 15 - 25 % rel.). Koncentrace epikatechinu (200 – 450; 8-10 % rel.) a epikatechin-O-glukosidu (50 – 100 µg/l; 2 % rel.) je nižší. Koncentrace flavanolů je nízká, zhruba 20 µg/l kvercetinu a 80 µg/l myricetinu.

Je však pravděpodobné, že na rozdíl od celkových polyfenolů je množství a profil flavonoidních polyfenolů ve sladu (sladině) větší měrou závislé na odrůdě. Ve studii ječmenů tří odrůd Bojos, Laudis 550 a Pertus vypěstovaných v 7 státech Evropské unie, Česká republika (Polná) Maďarsko (Jászboldogháza), Polsko (Pawlowice), Nizozemsko, Francie (Verneuil), Německo (Rosenthal) a Slovensko (Nýrovce) záviselo celkové množství PAC na odrůdě ($P=0,001$), ne však na lokalitě ($P=0,400$). Odrůdová závislost profilu PAC, zastoupení jednotlivých analytů byla potvrzena klastrovou analýzou (Obr. B4). Celková kvantita flavanolů a flavonolů závisela větší měrou na odrůdě ($P=0,0001$), menší měrou na lokalitě ($P=0,006$). Pro koncentraci celkových polyfenolů nebyly mezi odrůdami průkazné rozdíly, naproti tomu byl zjištěn na hladině $P=0,01$ vliv lokality.



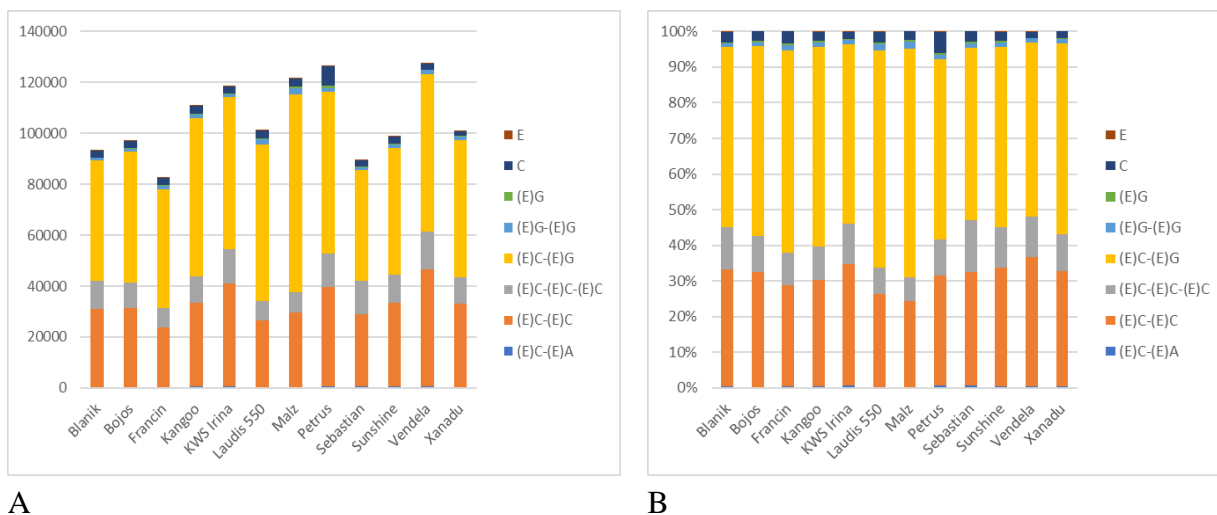
Obr. B1 Porovnání odrůd ječmene z hlediska celkových polyfenolů v pivo
R - slad, sladina, mladina, pivo: průměrné hodnoty všech odrůd



A

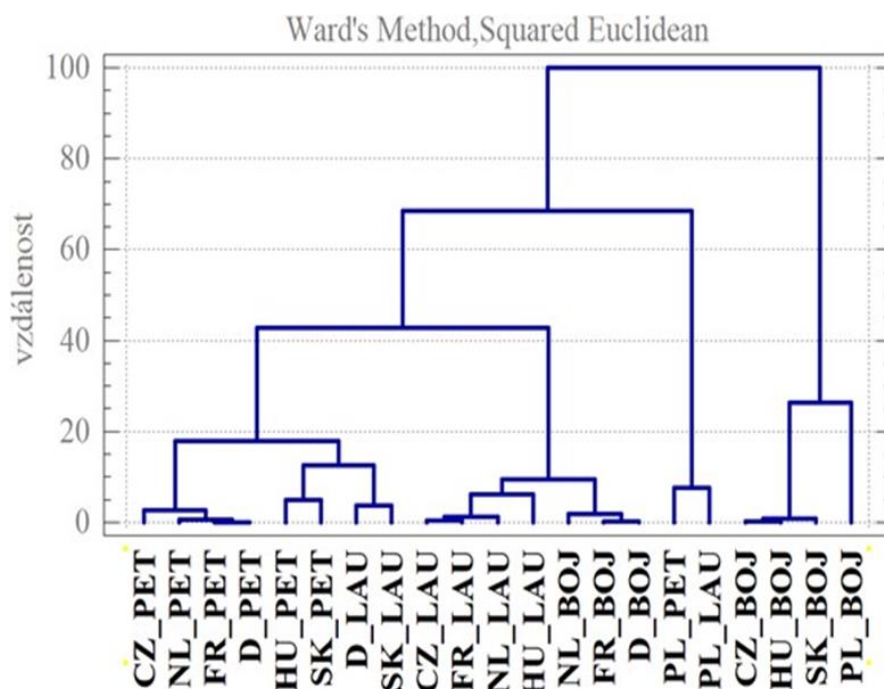
B

Obr.B2 Profil koncentrace flavonoidů ve sladech (A) a Relativní zastoupení flavonoidů ve sladech (B)



Obr.B3 Profil obsahu oligomerních proanthokyanidinů ve sladech (A) a relativní zastoupení oligomerních proanthokyanidinů ve sladech (B)

C - katechin; (E) C-epikatechin; (E) GC - gallokatechin a epigallokatechin; (E) C- (E) C / - dimery katechinu / epikatechinu vázaných s jinou katechinovou nebo epikatechinovou strukturální jednotkou; (E) C- (E) A - dimery katechinu / epikatechinu s afzelechinovou nebo epiafzelechinovou strukturální jednotkou; (E) C- (E) C - (E) C / triméry strukturálních jednotek katechinu / epikatechinu; (E) GC- (E) GC - dimery strukturálních jednotek gallokatechinu / epigallokatechinu s gallokatechinem nebo epigallokatechinem; (E) C- (E) GC dimery katechinu / epikatechinu s gallokatechinovými nebo epigallokatechinovými strukturálními jednotkami



Obr. B4 Shluková analýza relativního zastoupení proantokyanidinů ve sladu

CZ-Česká republika; HU - Maďarsko; PL - Polsko; NL - Nizozemsko; FR - Francie; D - Německo; SK - Slovensko
PET – Petrus; LAU – Laudis 550; BOJ - Bojos

II c) Chmel

Obsah polyfenolových látek ve chmelu je ovlivněn mnoha faktory. Obsah polyfenolů závisí na odrůdě chmele; aromatické kultivary zpravidla obsahují vyšší množství polyfenolů než hořké kultivary, protože zvýšení obsahu α -kyselin je dosaženo na úkor obsahu polyfenolů. Polyfenoly jsou s výjimkou prenylflavonoidů obsaženy ve hmotě hlávky, listenech a větenu. Sekundární metabolity lupulinových žláz, pryskyřice a silice se tvoří hlavně během zrání chmelové hlávky zatímco polyfenoly se tvoří v dřívějších stádiích vegetace chmelové rostliny. Obsah polyfenolů ve chmelu tak může záviset na půdně-klimatických podmínkách, povětrnostních podmínkách během vegetace a zrání, stáří chmelové rostliny a době sklizně.

Chmelová surovina má pro koncentraci polyfenolů v pivu velký význam. Stěžejní je odrůda chmele, při chmelení světlého ležáku 100% jemného aromatického chmele (ŽPČ) může být koncentrace celkových polyfenolů v pivu o asi 50 % vyšší oproti chmelení hořkým chmelem (Agnus) a o asi 60 % vyšší oproti chmelení chmelovým extraktem (Obr C1). Obsah polyfenolů ve chmelu významně závisí na půdně klimatických podmínkách. Pro dávku polyfenolů při výrobě piva je důležitý poměr polyfenolů k alfa kyselinám ve chmelu. Chmel je dominantním zdrojem antioxidantů ze skupin flavonoidů a prenylflavonoidů. Odrůdově specifický je nejen obsah polyfenolů ve chmelu, ale i jejich složení. Antioxidační aktivita chmele a piva závisí na obsahu polyfenolových látek.

Výsledky studie čtyř v současnosti nejvýznamnějších domácích odrůd chmele, Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), Sládek, Premiant a Agnus, souboru sklizňových vzorků ve třech následných sklizních extrahovaných horkou vodou a analyzovaných skupinovými metodami jsou následující: Nejvyšší množství celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavanoidů je ve chmelech ŽPČ, zatímco ostatní tři hodnocené odrůdy se významně neliší (tab. C1). Důležitým zdrojem variability obsahu polyfenolů v odrůdě je pěstební lokalita, chápána jako soubor půdně-klimatických podmínek, průběhu počasí v daném roce a stáří chmelové rostliny. Relativní směrodatná odchylka obsahu polyfenolů v odrůdách se pohybovala v rozmezí přibližně 6 % až 20 %. Variabilita obsahu polyfenolů je tedy srovnatelná s variabilitou obsahu alfa kyselin.

Antioxidační (antiradikálový) potenciál (ARP), měřený volným radikálem DPPH, silně koreloval s polyfenolovými látkami a byl také významně vyšší pro chmele ŽPČ. Hodnota antioxidačního potenciálu silně (na hladině pravděpodobnosti $P = 0,01$) korelovala s polyfenoly jak v celém souboru čtyř odrůd chmele, tak v určité odrůdě (tab. C2). ARP závisel nepřímo na alfa kyselinách, a to jak v případě celého souboru ($r = -0,73$; $P = 0,01$), očividně kvůli vyššímu obsahu polyfenolů a nízkému obsahu alfa kyselin v chmele ŽPČ ve srovnání s ostatními třemi odrůdami, stejně jako u odrůdy ŽPČ ($r = -0,42$; $P = 0,01$).

Odrůdová závislost byla dále testována na širším spektru vzorků devíti tuzemských chmelových odrůd pěstovaných na jednom místě. Výsledky analýzy celkových polyfenolů, antokyanogenů a flavanoidů potvrdily výše uvedenou variabilitu, nejvyšší hodnoty byly naměřeny pro chmele ŽPČ a geneticky blízce příbuzný kultivar Saaz Late (obr. C2). Poměr celkových polyfenolů k alfa kyselinám ve chmelu (CP/Alfa) výrazně klesá od aromatických odrůd po odrůdy hořké a

stejně tak klesá antiradikálový potenciál vztažený na jednotku hmotnosti alfa kyselin ve chmelu (ARP/Alfa) (obr. C3).

Obdobné výsledky poskytla i následná rozsáhlá pětiletá studie (275 vzorků) čerstvě sklizených sušených chmelů šesti českých kultivarů Žatecký poloraný červeňák, Sládek, Premiant, Agnus, Kazbek a ŽPČ ze všech tří pěstebních oblastí, Žatecké, Úštěcké a Tršické. Analýzy polyfenolů byly provedeny po šetrné extrakci chmelů vodným acetonem. Zpracování experimentálních dat metodou hlavních komponent ukázaly podobnost odrůd ŽPČ a Saaz Late a markantní rozdíl mezi těmito a zbylými odrůdami. (obr. C4).

Ve chmelech se nachází řada látek ze skupiny flavonoidů, sloučeniny z podskupin flavanolů (katechinů), flavonolů a prenylflavonoidů.

Monomerní flavan-3-oly, katechiny (katechin a epikatechin) ve chmelech jsou na rozdíl od ječmene (sladu) přítomny výlučně ve volné formě, jejich glykosidy nebyly zjištěny. Obsah flavan-3-olů je nejvyšší u odrůdy ŽPČ. Obsah těchto látek je geneticky závislý, u odrůd příbuzných ŽPČ převažuje katechin, u odrůd s vyšším rodičovským podílem americkým chmelů (Agnus) a Kazbek převažuje epikatechin (obr. C5 a, b).

Odrůdově závislý je i obsah a profil oligomerních proanthokyanidinů. Ve chmelech ŽPČ a Saaz Late je kromě již zmíněných monomerů katechinu a epikatechinu například nízké zastoupení (epi)galokatechinu a dimerů obsahujících jednotku (epi)galokatechin, tedy dimerů (epi) katechin - (epi) galokatechin / (E)C – (E)G/ a dimerů (epi) galokatechin - (epi) galokatechin / (E)G – (E)G/. Odrůdy Agnus, Premiant, Kazbek, Sládek a ŽPČ se jednoznačně liší profilem PAC, ŽPČ a Saaz Late nebyly odlišeny (obr. C6).

Naopak je zřejmé, že chmele obsahují nízké množství volných flavanolů (kvercetin, kaempferol, myricetin) a výrazně vyšší množství jejich glykosidů (obr. C5 a, b). Chmele obsahují nízké množství kvercetinu a myricetinu, množství glykosidů kvercetinu a rutinu (kvercetin-O-rutinosid) je podstatně vyšší. Jednoznačně nejvyšší množství měřených flavanolů bylo ve chmelech Kazbek.

Analýza chmelů na obsah flavanolů a jejich glykosidů opakovaně ukazuje relativně vysoký obsah glykosidů kvercetinu (kvercetin-O-rutinosid, kvercetin-O-glukosid) a kempferolu (kempferol-O-glukosid) ve chmelech. Obsah je ve chmelech ŽPČ a Saaz Late vyšší oproti ostatním odrůdám s výjimkou rutinu (kvercetin-O-rutinosid), jehož množství je výrazně nejvyšší u odrůdy Kazbek. Z pohledu širšího spektra českých i světových odrůd je zřejmý převažující množství katechinu nad epikatechinem u českých odrůd s podílem genomu ŽPČ a rovněž u některých evropských odrůd. Tyto české odrůdy jsou poměrně chudé na rutin.

Kromě proanthokyanidinů, volných flavonoidů a flavonoid-O-mono-glukosidů je odrůdově specifický i profil flavonoid-O-di-glykosidů, shluková analýza profilu několika desítek individuálních látek jasně separovala významné české odrůdy s výjimkou dvojice Sládek a Premiant (obr. C7).

Použití chmele v pivovarství je specifické v tom, že dávka chmele je řízena požadovanou hořkostí piva, a proto je určována obsahem alfa kyselin v chmelovém produktu. Poměr polyfenolů a alfa kyselin je rozhodující pro zvýšení obsahu polyfenolových antioxidantů v pivu. Je zřejmé, že účinek chmelení aromatickými odrůdami s nízkými alfa kyselinami je ve srovnání s hořkými chmelovými odrůdami výrazně vyšší, při chmelení 10 g alfa kyselin na 1 hl je u chmele ŽPČ dávka celkových polyfenolů přibližně 12 g/hl, u chmele Agnus pouze 2,5 g/hl (obr. C8). Poměr

celkových polyfenolů k alfa kyselinám je významný z hlediska CHZO České pivo, kde je předepsána minimální koncentrace celkových polyfenolů v pivu.

Na poměr polyfenolů a alfa kyselin mají kromě odrůdy vliv pěstební lokalita a ročník sklizně. Jak ukazují výsledky hodnocení větších souborů sklizňových vzorků českých odrůd v posledních osmi letech je, zjevně v souvislost s klimatickými změnami patrný trend ke zvyšování obsahu celkových polyfenolů a zároveň trend ke snižování obsahu alfa kyselin, nárůst poměru CP/Alfa je zřetelný u většiny odrůd. Ročníková, v některých případech velmi významná variabilita poměru CP/Alfa je způsobena především výkyvy obsahu alfa kyselin, obsah celkových polyfenolů situovaných v hmotě chmelové hlávky a syntetizovaných v předstihu před alfa kyselinami tvořenými v lupulinových zrnech podléhá zřejmě menším výkyvům (obr. C9).

Tab. C1 Obsah polyfenolových látek, alfa kyselin a antiradikálový potenciál chmelů

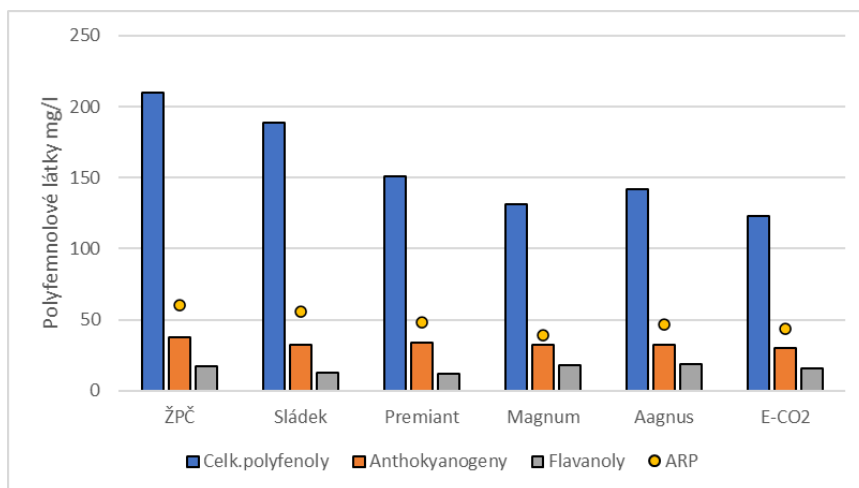
Odrůda	Rok	Celkové polyfenoly (mg/g)		Anthokyanogeny (mg/g)		Flavanoidy (mg/g)		ARP (%/g)		Alfa kyseliny (g/100g)	
		R	SD	R	SD	R	SD	R	SD	R	SD
ŽPČ	A	50,0	6,0	23,1	2,7	7,70	0,65	9,90	0,67	3,60	0,67
	B	51,2	3,8	23,9	2,8	7,50	0,80	9,80	0,59	3,60	0,56
	C	52,4	6,5	21,4	2,3	7,56	0,93	10,31	0,86	2,84	0,79
Sládek	A	26,5	3,6	12,5	2,2	3,30	0,57	5,80	0,94	5,90	0,84
	B	30,6	7,3	13,5	3,1	3,45	0,85	6,38	1,17	7,74	1,32
	C	31,0	4,2	14,3	1,5	3,77	0,63	7,18	0,77	8,62	1,71
Premiant	A	32,9	1,9	16,9	1,1	3,70	0,21	6,50	0,30	11,00	2,22
	B	36,6	5,8	17,4	2,4	3,99	0,71	7,88	1,09	9,57	1,22
	C	33,5	1,7	16,2	1,2	4,26	0,39	7,96	0,31	9,00	1,28
Agnus	A	29,1	1,6	14,3	0,6	3,30	0,13	6,30	0,26	13,60	0,50
	B	30,2	2,0	14,8	1,0	3,52	0,32	6,86	0,37	11,98	1,58
	C	33,6	5,4	15,1	2,6	4,08	0,79	7,49	1,16	9,88	1,01

R - průměr; SD - směrodatná odchylka; ARP antiradikálový potenciál

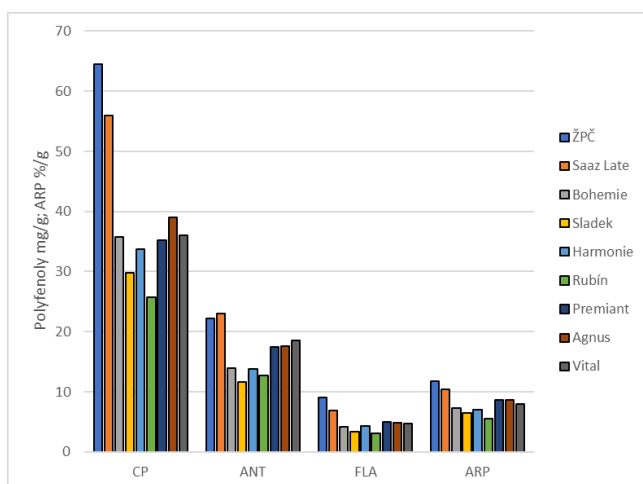
Tab. C2 Korelace polyfenolových látek chmele s antiradikálovým potenciálem a alfa kyselinami

	CP	ANT	FLA	ARP
Všechny odrůdy				
ARP	0,92 **	0,87 **	0,93 **	
ALFA	-0,77 **	-0,66 **	-0,83 **	-0,73 **
Žatecký poloraný červeňák				
ARP	0,75 **	0,38 **	0,66 **	
ALFA	-0,35 **	0,07	-0,27 *	-0,42 **

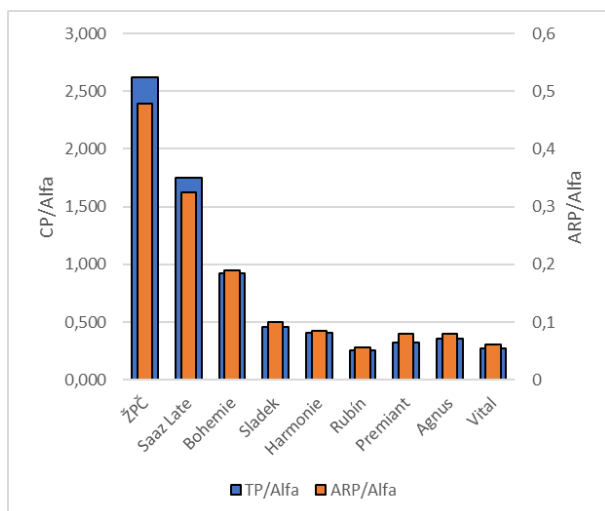
** P=0,01; * P=0,05; CP - celkové polyfenoly ; ANT - anthokyanogeny; FLA - flavanoidy; ARP - antiradikálový potenciál; ALFA – alfa kyseliny



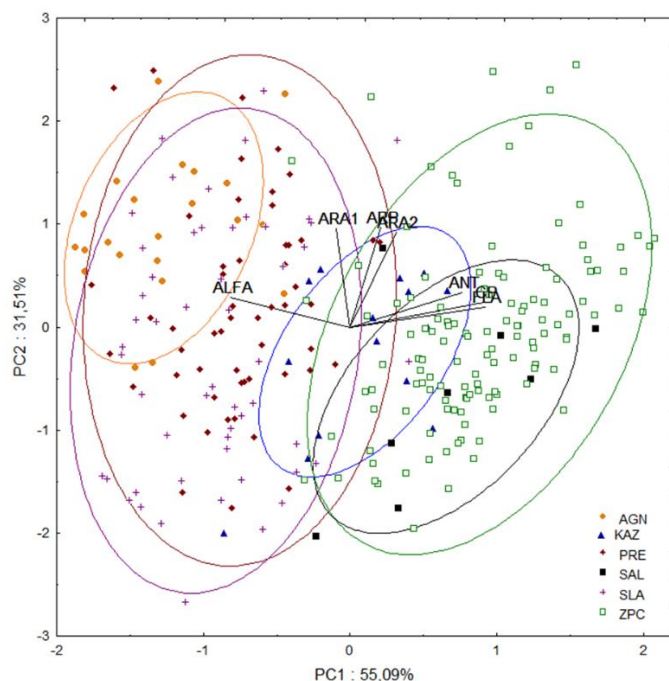
Obr. C1 Závislost koncentrace polyfenolových látek v pivo na odrůdě chmele
jednoodrůdové várky, chmelení na 30 j.hořkosti v pivo
E-CO2 extrakt chmele Agnus oxidem uhličitým; ARP – antiradikálový potenciál



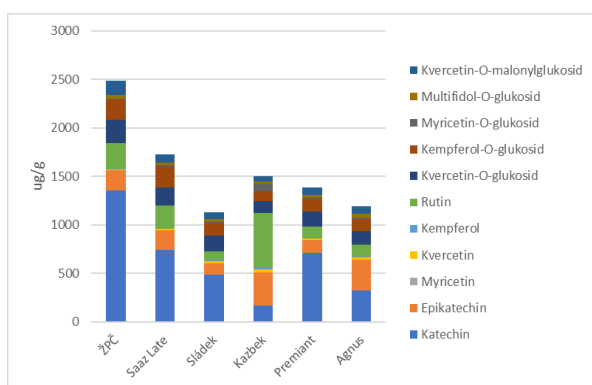
Obr. C2 Porovnání 9 odrůd podle celkových polyfenolů, antokyanogenů, flavanoidů a antiradikálového potenciálu ve chmelech



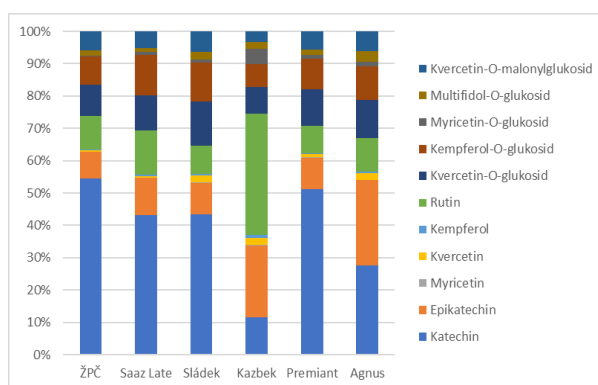
Obr. C3 Porovnání odrůd chmele podle poměru celkových polyfenolů a antiradikálového potenciálu k alfa kyselinám



Obr. C4 Výsledky PCA analýzy obsahu celkových polyfenolů, anthokyanogenů, flavanoidů, alfa kyselin a antiradikálové aktivity chmelů

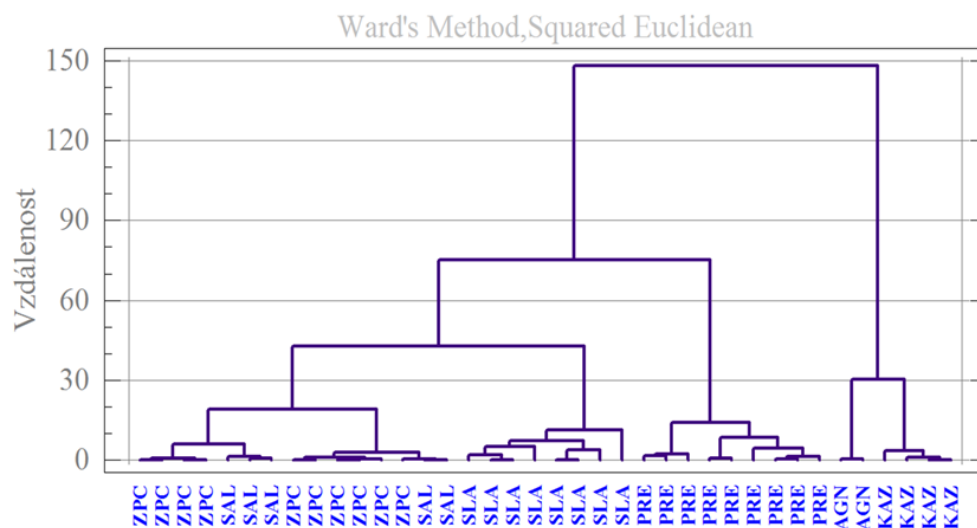


A

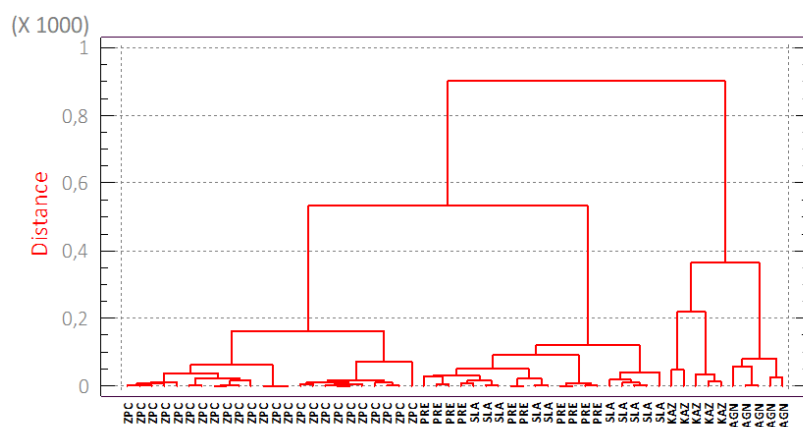


B

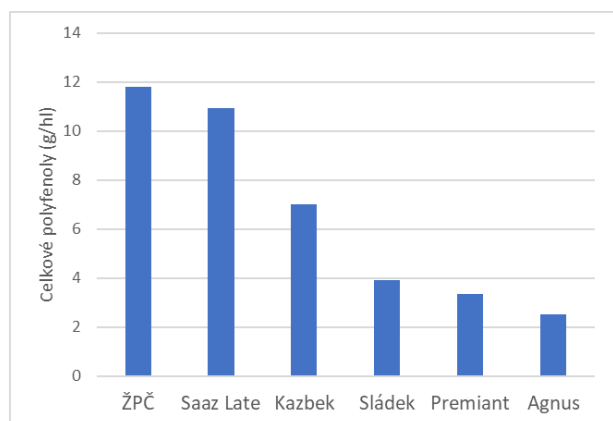
Obr. C5 Obsah flavanolů, flavonolů a jejich glykosidů ve chmelech (A); relativní zastoupení flavanolů, flavonolů a jejich glykosidů ve chmelech (B)



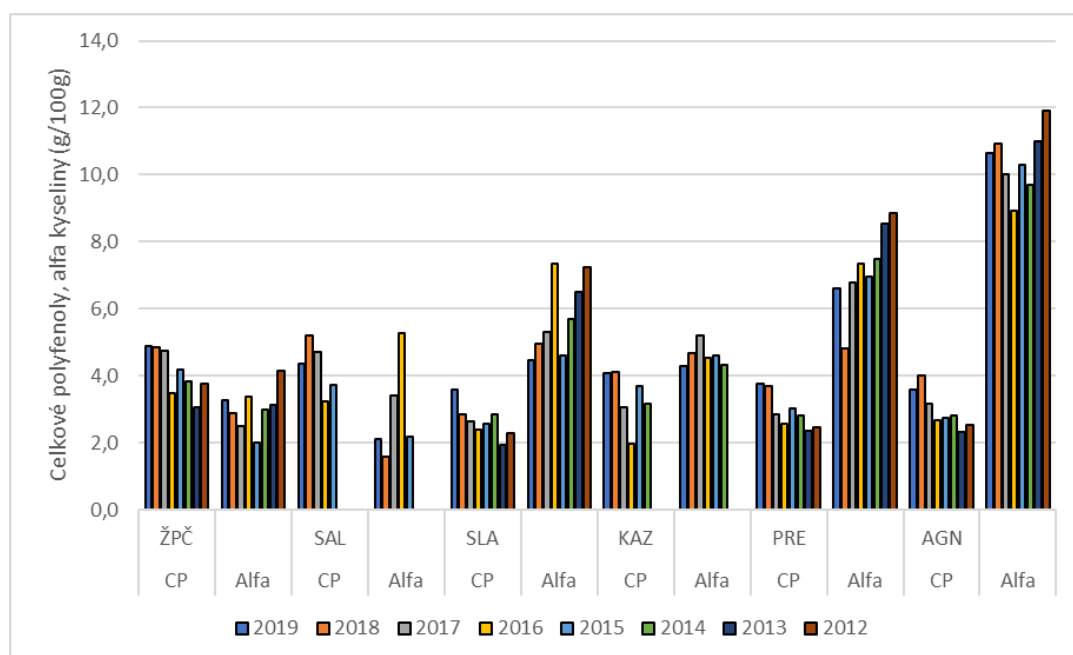
Obr. C6 Výsledky shlukové analýzy relativního zastoupení proanthokyanidinů ve chmelech



Obr. C7 Výsledky shlukové analýzy profilu flavonoid-O-di-glykosidů ve chmelech



Obr. C8 Dávka celkových polyfenolů při chmelení 10g alfa kyselin na 1 hl



Obr. C9 Vývoj obsahu celkových polyfenolů a alfa kyselin v nosných českých odrůdách chmele ve sklizních 2012 až 2019
 CP - Celkové polyfenoly; Alfa - Alfa kyseliny

II d) Rmutování

Výroba sladiny je první ze stěžejních operací pivovarské výroby, v tomto kroku je položen základ pro tvorbu celé škály sensoricky aktivních látek piva, barvu, pěnivost, plnost a další významné atributy nápoje. Cílem rmutování je převést za pomoci sladových enzymů žádoucí extraktivní složky sladu do rozpustné formy v míře a složení, odpovídajícím vyráběnému pivu. Je nesporné, že analytický a sensorický obraz piva je determinován kombinací surovinových a technologických faktorů.

Ve specifikaci Chráněného zeměpisného označení České pivo je kromě surovin předepsán i technologický rámec jeho výroby. Pro České pivo je závazný dekokční postup rmutování, který spočívá v odděleném teplotním vedení části pivovarského díla (směsi sladového šrotu s vodou), zatímco zbytek je udržován na určité teplotě. Dekokční postup je v principu náročnější na investice (počet nádob), čas a energii oproti jednoduchému postupu infuznímu. I v rámci dekokční technologie je popsána a praktikována řada různě složitých postupů od jednorumutového až po třírumutový.

Technologie rmutování se nezanedbatelnou měrou podílí na nárůstu obsahu katechinů, proanthokyanidinů, flavanolů i prenylflavonoidů v pivu. Všechny tyto látky jsou průkazné a významné antioxidanty v živém organismu. Z pohledu sledovaných zdravotně prospěšných polyfenolů se jeví jako benefiční intenzivnější dekokční rmutovací postupy, dvou nebo třírumutový.

Rmutování má významný vliv na koncentraci polyfenolových látek v pivu, největší rozdíl v koncentraci celkových polyfenolů a fenolových kyselin je mezi infuzním a dekokčním postupem. V rámci dekokční technologie se s intenzitou postupu markantně zvyšuje koncentrace proanthokyanidinů a prenylflavonoidů.

Pilotní várky 12% světlého ležáku (200 l) s komerčním sladem (odrůda Bojos), shodným chmelením (pelety ŽPČ a chmelový CO₂ extrakt 50:50) a variabilním postupem rmutování ukázaly nezanedbatelnou závislost koncentrace polyfenolových látek v pivu na intenzitě rmutování, od infuzního po třírumutový postup.

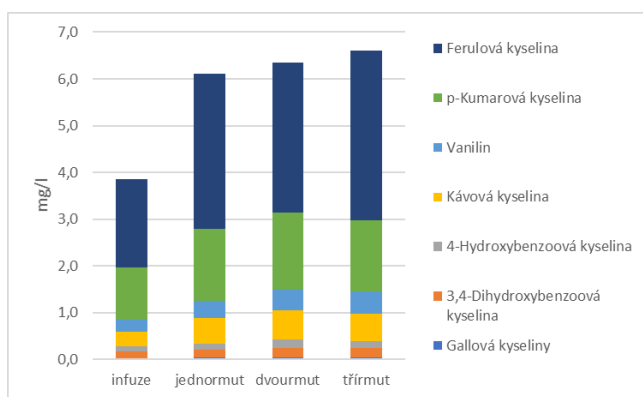
Koncentrace celkových polyfenolů v pivu a rovněž redukční kapacita DCPI a antiradikálová aktivita DPPH se významně zvýšila mezi infuzním a dekokčním postupem (tab. D1) Na způsobu výroby sladiny závisí jak koncentrace fenolových kyselin, jejichž majoritním zdrojem je slad, tak koncentrace flavanolů (katechinů a proanthokyanidinů) obsažených ve sladu i chmelu. Vliv rmutování je průkazný i u flavonoidů a prenylflavonoidů původem ze chmelu.

Nejvýznamnější rozdíl je mezi infuzním a dekokčním postupem, menší nárůst je patrný mezi jednorumutovým a dvourumutovým postupem. V pivech připravených dvourumutovým postupem bylo v porovnání s infuzí v sumě o přibližně 65 % více fenolových kyselin (obr. D1), o 30 % více flavanolů a jejich glykosidů (obr. D2), o 15 % více flavanolů (obr. D3) a o 50 % více prenylflavonoidů (obr. D3).

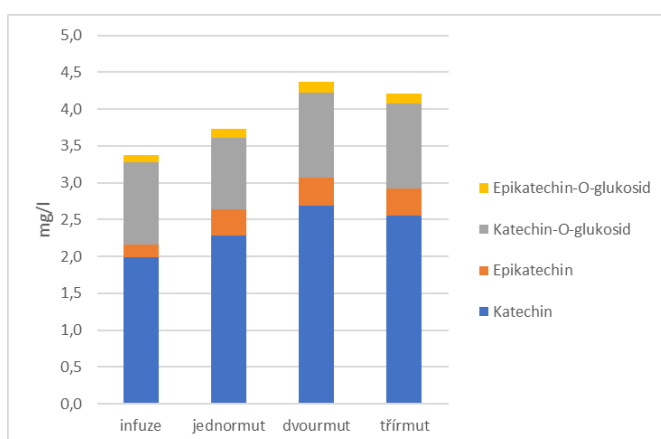
Koncentrace všech monomerních jednotek katechinů i oligomerních proanthokyanodinů v mladině, po extrakci chmelových polyfenolů, varu a interakci s chmelovými polyfenoly, vzrůstá

s intenzitou rmutování od infuzního po třírmutový postup. Rozdíly jsou zachovány i v pivu, kde s intenzitou rmutování narůstá koncentrace katechinu, epikatechinu, dimerů a trimerů těchto monomerů. Dimery obsahující monomerní jednotky (epi)gallokatechinu větší měrou precipitují v průběhu kvašení piva a vliv rmutování na tyto látky nebyl prokázán. (obr. D5)

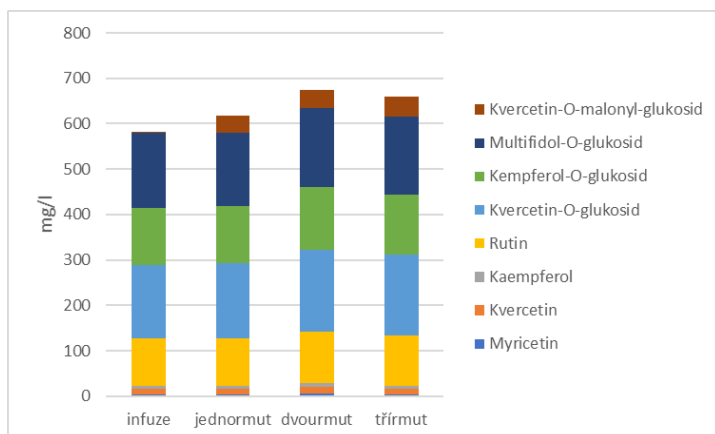
Vliv intenzity rmutování je průkazný i u prenylflavonoidů (iso-xanthohumol, xanthohumol, 6 a 8 prenylnaringenin), obsažených výlučně ve chmelu. Majoritní složkou prenylflavonoidů v mladíně i pivu je iso-xanthohumol, která vzniká z xanthohumolu při chmelovaru. Sumární koncentrace prenylflavonoidů v pivu narůstá v řadě od infuzního až po třírmutový postup. Prenylflavonoidy jsou antioxidanty náchylné k oxidativním změnám. Je známo, že piva z tmavých sladů obsahují výrazně vyšší množství prenylflavonoidů díky ochranné funkci látek (melanoidiny, cukerné reduktory) obsažených v těchto sladech. Vyšší tepelná zátěž při dekokčním postupu rmutování (var rmutů) může působit obdobně, ale v menší míře nežli tmavé slady, termicky namáhané při hvozdní.



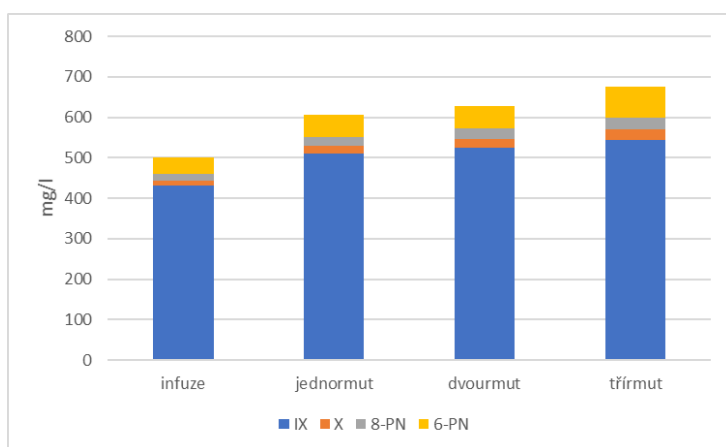
Obr. D1 Koncentrace fenolových kyselin v pivu při různých postupech rmutování



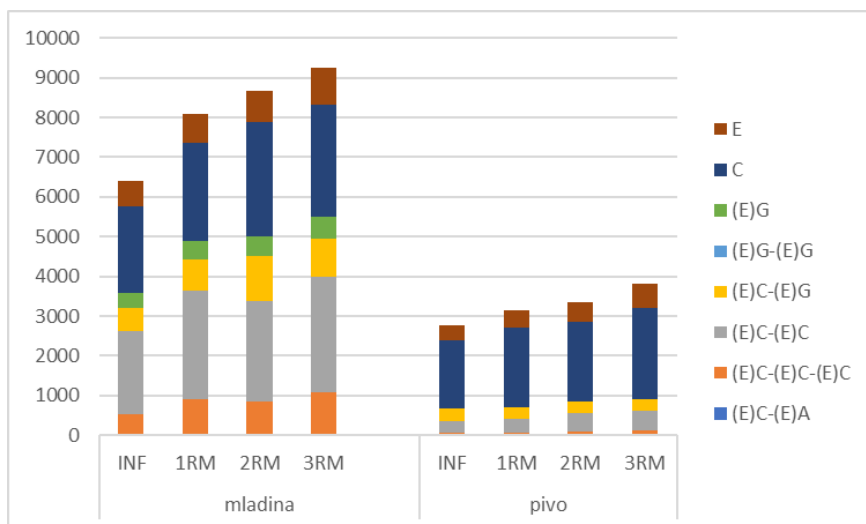
Obr. D2 Koncentrace flavan-3-olů v pivu při různých postupech rmutování



Obr. D3 Koncentrace flavonolů v pivu při různých postupech rmutování



Obr. D4 Koncentrace prenylflavonoidů v pivu při různých postupech rmutování



Obr. D5 Koncentrace proanthokyanidinů v mladině a pivu při různých postupech rmutování

II e) Chmelovar

Var sladiny s chmelem je další z klíčových operací pivovarské výroby. Obecně přijímaným a deklarovanými cíli chmelovaru je ekonomické využití chmelových surovin a v nich obsažených pryskyřic a silic, dostatečné odstranění senzorycky nežádoucích těkavých látek, vytvoření předpokladů pro dobrou filtrovatelnost a stabilitu čirosti piva precipitací tríslobílkovinných komplexů a zamezení nadměrné tvorby termických produktů s negativním vlivem na senzoryckou stabilitu piva. Jde o požadavky zčásti protichůdné, proto je nutno činit uvážené kompromisy vedoucí k optimální celkové kvalitě mladiny.

Obsah polyfenolů v chmelové surovině, respektive jejich poměr k obsahu alfa kyselin ve chmelu je významný pro hladinu polyfenolových látek v pivu. Koncentrace celkových polyfenolů, flavanolů i flavonolů v pivu roste proporcionálně k jejich dávce při chmelení. Chmelové polyfenoly se uvolňují do sladiny rychle, během asi 15 minut, z pohledu polyfenolů je využita i poslední dávka chmele před koncem chmelovaru. Aplikace 100 % jemného aromatického chmele (ŽPČ) rezultuje v 50 – 60 % zvýšení koncentrace polyfenolů v porovnání s chmelením chmelovým extraktem bez polyfenolů.

V pilotních várkách českého světlého ležáku (200 l) bylo studováno chování chmelových polyfenolových látek během procesu chmelovaru v různých režimech chmelení. Celkové polyfenoly jsou z chmelového produktu do mladiny uvolňovány velmi rychle a jejich nárůst je determinován obsahem ve chmelu (tab. E1). Do 15 minut po přidavku pelet je koncentrace celkových polyfenolů na úrovni 85 – 90 % jejich hodnoty ve studené mladině. Chmelení chmelovým extraktem bez polyfenolů rezultuje v nulový nárůst v mladině, chmelení peletami ŽPČ ve zhruba dvojnásobnou koncentraci v mladině oproti sladince a chmelení dělenou dávkou 50:50 % chmelový extrakt a pelety ve zhruba poloviční nárůst oproti 100% chmelení peletami. Z hlediska celkových polyfenolů je chmelová surovina využita i při poslední dávce 20 minut před koncem varu. Použití kratších nízkotlakých varů (PE-TWB, PE-TDWB) nemá na koncentraci celkových polyfenolů v mladině významný vliv. Koncentrace celkových polyfenolů v pivu je v relaci s použitými chmelovými surovinami, u várek chmelených 100 % pelet a 50 % pelet je o 65 % respektive 30 % vyšší oproti várce chmelené chmelovým extraktem.

Vývoj hodnot anthokyanogenů v průběhu chmelovaru měl v první fázi, do 30 minut varu obdobný trend, v další fázi varu byl mírný pokles hodnot (tab. E1). Pro atmosférické chmelovary byl další pokles koncentrace anthokyanogenů mezi horkou a studenou mladinou, zřejmě v důsledku tvorby a vyloučení kalů. Pokles byl i pro chmelení CO₂ extraktem bez polyfenolů, na tvorbě kalů se podílejí jak chmelové, tak sladové polyfenoly. U tlakových chmelovarů s vyšší teplotou varu nebyl tento pokles zaznamenán. Hodnota anthokyanogenů reprezentuje skupinu polyfenolových látek (katechinů, leukoanthokyanidinů) s potenciálem tvořit tríslobílkovinné komplexy, které částečně precipitují ve formě kalů při chmelovaru. Další vyloučení těchto kalů je při kvašení a zrání piva zejména v důsledku poklesu pH.

Koncentrace anthokyanogenů v pivu je v relaci s použitými chmelovými surovinami, u várček chmelených 100 % pelet a 50 % pelet byla hodnota o 60 % respektive 30 % vyšší oproti várce chmelené chmelovým extraktem. U obou nízkotlakých chmelovarů (PE-TWB, PE-TDWB) byl zaznamenán výrazně nižší úbytek anthokyanogenů mezi mladinou a pivem a tyto varianty měly za následek o 40 % vyšší koncentraci anthokyanogenů oproti atmosférickému chmelovaru (PE-ATM), a tím i potenciál k horší koloidní stabilitě piva.

Koncentrace celkových polyfenolů v meziproduktech a pivu korelovala s hodnotou antioxidační aktivity (DPPH) i s hodnotou redukční kapacity (DCPI) na hladině pravděpodobnosti $P=0,01$ ($n=33$; $r=0,82$ resp. $r=0,48$). Koncentrace anthokyanogenů korelovala s hodnotou antioxidační aktivity (DPPH) na hladině pravděpodobnosti $P=0,01$ ($n=33$; $r=0,71$).

Koncentrace flavanolů (katechin, epikatechin) v mladině a pivu je rovněž výrazně ovlivněn chmelovou surovinou, při chmelení aromatickým chmelem bohatým na polyfenoly (ŽPČ) jsou 2/3 jejich množství v pivu ovlivněny chmelem. Naproti tomu koncentrace jejich mono-O-glukosidů v pivu nezávisí na chmelení, glykosidy jsou přítomny pouze ve sladu (obr. E1). Flavonoly kvercetin, kempferol a multifidol se nacházejí v mladině a pivu hlavně v glykosidické formě (obr. E2). Zdrojem všech těchto látek v pivu je výlučně chmel. Slad je naopak jediným zdrojem myricetinu a myricetin-O-glukosidu v pivu. Hlavní část flavonoidů pocházejících z chmele se uvolňuje během chmelovaru do vroucí mladiny během 15–30 minut po nadávkování chmelové suroviny. Rozdělení dávky chmele nebo technologie varu s přetlakem neměly významný vliv na polyfenoly se zdravotním benefitem. Pivo chmelené chmelem bohatým na flavonoidní polyfenoly obsahuje relativně vysoké množství polyfenolů podporujících zdraví, zatímco pivo chmelové chmelovým extraktem bez polyfenolů je chudé na polyfenolové antioxidanty.

Na koncentraci proanthokyanidinů v mladině a následně v pivu má rovněž výrazný vliv chmelová surovina. Například při chmelení hořkým chmelem Rubín (Alfa = 10,0 %) nebo chmelem Kazbek (Alfa = 6,2 %) bylo v pivu stanoveno o 40 % resp. 30 % méně proanthokyanidinů v porovnání s chmelením ŽPČ (Alfa = 3,4 %). Doba aplikace chmele (rozložení dávek) má určitý, ne však podstatný vliv na obsah a složení proanthokyanidinů v pivu, pro aplikaci části chmele ke konci chmelovaru (dělená dávka 30% po zavaření, 50% po 30 min, 20% 15 min. před koncem) je patrný trend k vyšším hodnotám oproti celé dávce na začátku chmelvaru (obr. E3).

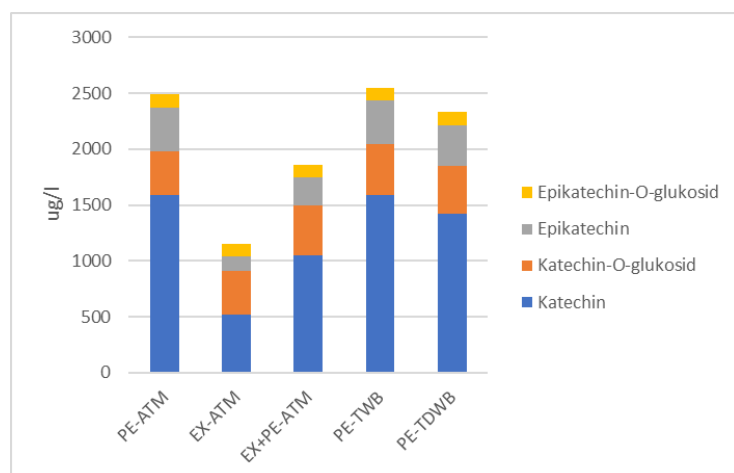
Antioxidační vlastnosti chmelových polyfenolů se neprojevují jen při konzumaci piva, mají rovněž, podobně jako sladové polyfenoly dopad na senzorickou stabilitu nápoje. Pilotní várky zaměřené na stanovení vlivu podílu chmelových pelet ve chmelení a načasování dávkování v průběhu chmelovaru na karbonylové sloučeniny v uskladněném pivu prokázaly, že redukční aktivita piv a skladovaných piv závisí na dávce chmelových pelet. Piva s nižším množstvím chmelových antioxidantů vykazovala během skladování piva zvýšenou tvorbu karbonylových sloučenin. Byla nalezena korelace mezi antiradikálovou aktivitou DPPH aktivitou a obsahem některých skupin karbonylových látek, včetně důležitých markerů 2-furfuralu a (E) -2-nonenalu. Klastrová analýza karbonylových látek jasně rozlišila čerstvá a stařená piva chmelená různými dávkami chmelových pelet. Výsledky senzorické analýzy odpovídaly hodnotám analytických kritérií. Výsledky této studie přinášejí další důkaz nepostradatelného účinku chmelových antioxidantů na potlačení tvorby nežádoucích karbonylových sloučenin v průběhu skladování piva, což může být významné u piv chmelených aromatickým chmelem.

Chmelové antioxidanty jsou i podle výsledků dalších prací jedním z významných faktorů ovlivňujících senzorické stárnutí piva. Senzorická stabilita piva je z hlediska chmelových látek ovlivněna i dalšími faktory, někteří autoři považují chmelové alfa kyseliny za významnější lapače volných radikálů (ROS) nežli polyfenolové látky a může být ovlivněna i transformací a úbytky chmelových silic, jak vyplynulo z varních experimentů zaměřených na porovnání senzorické kvality a stability piv chmelených sérií různých genotypů českých chmelů

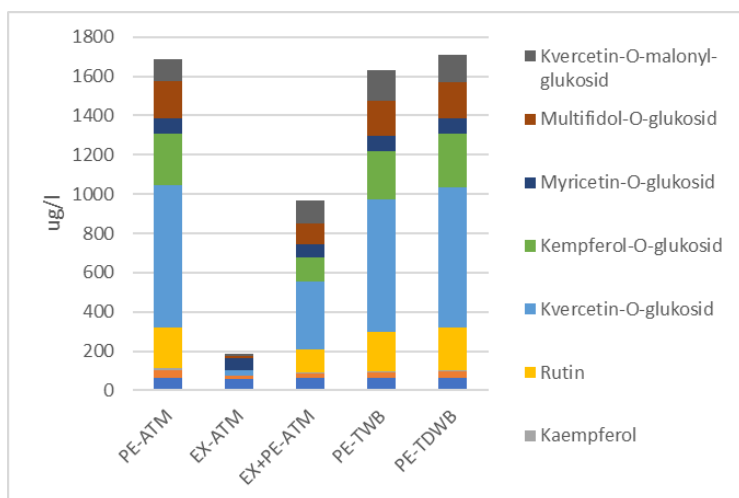
Tab. E1 Vývoj koncentrace celkových polyfenolů a anthokyanogenů, antioxidační aktivity a redukční kapacity během chmelovaru a do hotového piva

	0 min	30 min	60 min	75 min	90 min	CW	BE
Celkové polyfenoly							
PE-ATM	137	233	229	236	234	253	175
EX-ATM	152	152	151	151	155	143	106
EX+PE-ATM	152	153	187	180	187	195	138
PE-TWB	139	212	232	234		246	174
PE-TDWB	160	225	231	225		250	171
Anthokyanogeny							
PE-ATM	43	69	69	66	65	61	30
EX-ATM	42	43	37	37	39	29	19
EX+PE-ATM	43	40	44	42	46	41	25
PE-TWB	42	56	60	60		61	42
PE-TDWB	44	58	57	56		57	44
Antioxidační aktivita DPPH							
PE-ATM	56	69	65	70	72	86	52
EX-ATM	57	57	57	58	60	63	53
EX+PE-ATM	60	61	67	69	70	74	51
PE-TWB	59	74	76	80		77	41
PE-TDWB	62	74	77	81		82	56
Redukční kapacita DCPI							
PE-ATM	34	50	54	58	61	72	75
EX-ATM	20	28	30	35	35	41	55
EX+PE-ATM	27	32	39	44	45	56	59
PE-TWB	35	40	46	48		55	66
PE-TDWB	36	46	51	51		53	58

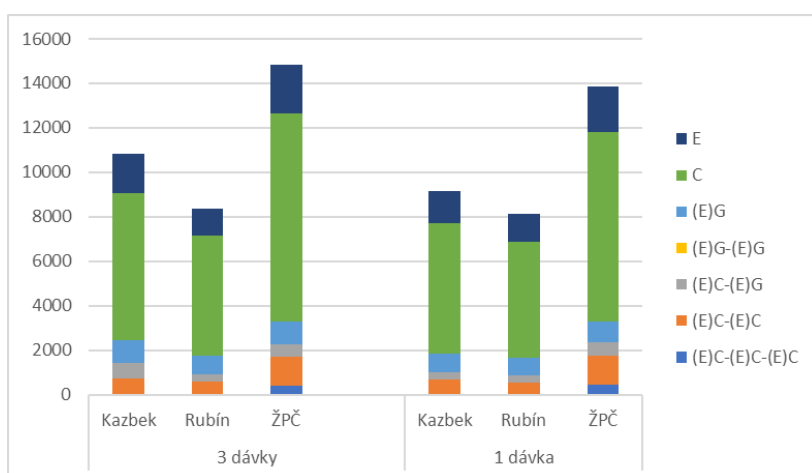
PE - chmelové pelety ŽPČ; EX - Chmelový CO₂ extrakt; ATM - Atmosférický chmelovar; TWB – Nízkotlaký chmelovar; TDWB - Dynamický nízkotlaký chmelovar; CW – Studená mladina; BE – Finální pivo;



Obr. E1 Koncentrace flavan-3-olů v pivu při různých postupech chmelovaru



Obr. E2 Koncentrace flavonolů v pivu při různých postupech chmelovaru



Obr. E3 Vliv chmele na koncentraci proanthokyanidinů v pivu

3 dávky – chmelení na tři dávky 30 % začátek chmelovaru, 50 % po 30 min., 20% 15 min. před koncem chmelovaru;
1 dávka – 100 % na začátku chmelovaru

II f) Kvašení, filtrace

Kvasný proces a závěrečné operace výroby piva po finální výrobek naplněný do transportních obalů mohou významnou měrou ovlivnit koncentraci a složení polyfenolových látek v pivu. V průběhu chlazení mladiny, hlavního kvašení, dokvašování (zrání) dochází ke značnému snížení koncentrace polyfenolových látek přirozenou cestou, precipitací tříslobílkovinných komplexů v důsledku vzájemných interakcí složek a snížení pH. Známý jsou vysoké ztráty prenylflavonoidů sorpcí na kaly a kvasničné buňky.

Ve finálních operacích pivovarské výroby, filtraci a koloidní stabilizaci piva může docházet ke ztrátám sorpcí na filtrační a stabilizační materiály. Za zákalotvorné polyfenoly jsou považovány zejména kondenzované, oxidované struktury katechinů, proanthokyanidinů, které vytvářejí komplex, zákal s bílkovinami sladu, a v případě koloidní stabilizace piva směřované na polyfenoly se sorbují na polymerní sorbent s funkcí modelové bílkoviny (polyvinylpyrrolidon /PVPP/, polyamid).

K nejvýznamnějšímu snížení koncentrace celkových polyfenolů, flavan-3-olů (katechinů) a jejich glykosidů dochází při hlavním kvašení. Koncentrace flavonoidů, glykosidů flavonoidů a prenylflavonoidů se významně nemění. V průběhu 2 až 3 týdnů ležení piva markantně poklesne koncentrace celkových polyfenolů, katechinů a prenylflavonoidů, s dalším ležením se již výrazně nemění. Glykosidy flavanolů a flavonolů jsou značně stabilní a jejich koncentrace s dobou ležení významně neklesá.

Filtrace piva deskami pro hloubkovou filtraci snižuje obsah zákalotvorných polyfenolů při zachování zdravotně prospěšných flavanolů, flavonolů a prenylflavonoidů. Sekundární filtrace piva PES membránou pro studenou sterilaci snižuje obsah všech skupin polyfenolových látek, velmi významný je úbytek prenylflavonoidů. Stabilizace piva sorbentem bílkovin na bázi silikagelu nemá na žádnou skupinu polyfenolových látek významný vliv. Stabilizace piva sorbentem polyfenolů na bázi PVPP významně redukuje jak koncentraci zákalotvorných polyfenolů, tak volných flavanolů, flavonolů a prenylflavonoidů. Zachovány jsou ale jejich glykosidy.

Změny koncentrace jednoduchých flavanolů a flavonolů, glykosidů těchto látek a prenylflavonoidů v průběhu zrání piva, při primární filtraci piva, filtraci na membránových filtrech a koloidní stabilizaci piva sorbenty nebyly dosud komplexně prozkoumány, problematika byla řešena v pilotních 200 l várkách světlého ležáku s dobou zrání odstupňovanou od 2 až 6 týdnů a dalších várkách zaměřených na vliv primární filtrace (desky pro hloubkovou filtraci ze směsi celulózy, křemelin a perlitů, následně sekundární filtrace membránovým filtrem s polyester sulfonovou membránou (PES) pro studenou sterilaci piva a stabilizace piva filtrovaného deskovým filtrem sorbentem bílkovin Vulcostabil 40C nebo sorbentem polyfenolů Polyclar Super R).

Výsledky sledování polyfenolových látek v průběhu kvašení a zrání ukazují (tab. F1), že k hlavní redukci koncentrace celkových polyfenolů dochází v průběhu hlavního kvašení a prvních 2 – 3 týdnech zrání, další ležení do 6 týdnů nemělo na ztráty polyfenolů dopad. K výraznému snížení flavanolů katechinu a epikatechinu o více než 50 % došlo po 2–3 týdnech zrání, mezi 4. a 6. týdnem zrání se již hodnoty prakticky neměnily. Naproti tomu úroveň glykosidů, katechin-O-

glukosidu a epikatechi-O-glukosidu po poklesu mezi mladinou a zeleným pivem o přibližně 25 % se již v průběhu zrání neměnila. Glykosidy flavanolů jsou zjevně stabilnější nežli příslušné aglykony a v menší míře podléhají fyzikálně chemickým změnám, jejich množství v pokusných pivech bylo na úrovni přibližně jedné čtvrtiny množství volného katechinu či epikatechinu. Úroveň měřených volných flavanolů, myricetinu, kvercetinu a kempferolu v mladínách a pivech byla stejně jako úroveň jejich glykosidů kvašením a ležením ovlivněna malou měrou, koncentrace myricetinu a myricetin-O-glukosidu se nezměnila, totéž platí pro rutin. Mírné snížení s dobou ležení bylo zaznamenáno u kvercetin-O-glukosidu a kvercetin-O-malonylglukosidu (úbytek 10 % po 6 týdnech zrání).

Z výše uvedeného rozboru výsledků plyne, že hlavní změny flavonoidů probíhají v prvních 2 – 3 týdnech zrání piva, prodloužení doby zrání nemá již na ztráty flavonoidních polyfenolů výrazný dopad a zkrácení doby zrání piva by se odrazilo v senzorickém profilu finálního výrobku.

Filtrace piva hloubkovými filtračními deskami měla za následek redukci koncentrace celkových polyfenolů o asi 10 % a anthokyanogenů o 20 %, neměla ale měřitelný efekt na jednoduché flavonoidní polyfenoly ze skupin flavanolů a flavonolů a prenylflavonoidů (tab. F2, obr. F1). Z toho lze usoudit, že tyto desky zachycují pouze větší, oligomerní struktury polyfenolů na bázi flavanolů a leukokyanidinů. Stabilizace piva filtrovaného deskami sorbentem bílkovin Vulcostabil 40C měla na celkové polyfenoly a flavonoidy polyfenoly jen zanedbatelný vliv, nízký úbytek (8 %) byl pro anthokyanogeny, pravděpodobně v důsledku sorpce tríslobílkovinných komplexů. Naproti tomu výsledky analýzy po filtraci piva membránovým filtrem ukázaly markantní pokles koncentrace flavan-3-olů katechinu (20 %) a epikatechinu (15 %), jejich glykosidy sorbovány nebyly. Ještě vyšší pokles katechinu (50 %) a epikatechinu (40 %) byl po stabilizaci sorbentem polyfenolů, koncentrace glykosidů se významně nezměnila.

Obdobně byl zjištěn značný úbytek některých flavonolů (kvercerin, kempferol) ve výši asi 35 – 40 % a úbytek jejich glukosidů (kvercetin-O-glukosid, kempferol-O-glukosid) o 15 – 20 % po filtraci membránovým filtrem a stejně tak po stabilizaci Polyclarem Super R, vliv membránové filtrace byl vyšší. Naproti tomu úroveň rutinu (kvercetin-O-rutinosid) nebyla ovlivněna ani stabilizací, ani membránovou filtrací.

Filtrace piva hloubkovými filtračními deskami významně redukovala množství anthokyanogenů, ale neměla efekt na monomerní flavonoidní polyfenoly. Tato technika může zlepšit koloidní stabilitu při zachování flavonoidů. Naopak filtrace PES membránovým filtrem ve velké míře snížila obsah prenylflavonoidů (o 85 %), a snížila množství flavanolů a flavonolů v míře srovnatelné s účinkem sorbentu polyfenolů na bázi PVPP (o 25 – 35 %).

Z pohledu vztahu stabilizace piva sorbentem polyfenolů a senzorické stability piva je však na základě pilotních pokusů cílených na tento aspekt pravděpodobné, že přes markantní snížení některých polyfenolových látek (anthokyanogeny o 30 – 40 %) a snížení antioxidační aktivity piva (DPPH ARA o 5 – 15 %) provázeného vyšší tvorbou některých karbonylových látek v průběhu skladování je stabilizované pivo senzoricky stálejší. Koloidní stabilizací sorbentem polyfenolů Polyclarem AT jsou zjevně odstraněny především nežádoucí polyfenolové sloučeniny. Tato technologie má příznivý efekt z hlediska zpomalení jak tvorby koloidního zákalu, tak i senzorického stárnutí piva.

Tab. F1 Výsledky analýzy mladín, mladých piv a piv v průběhu ležení na koncentraci polyfenolových látek

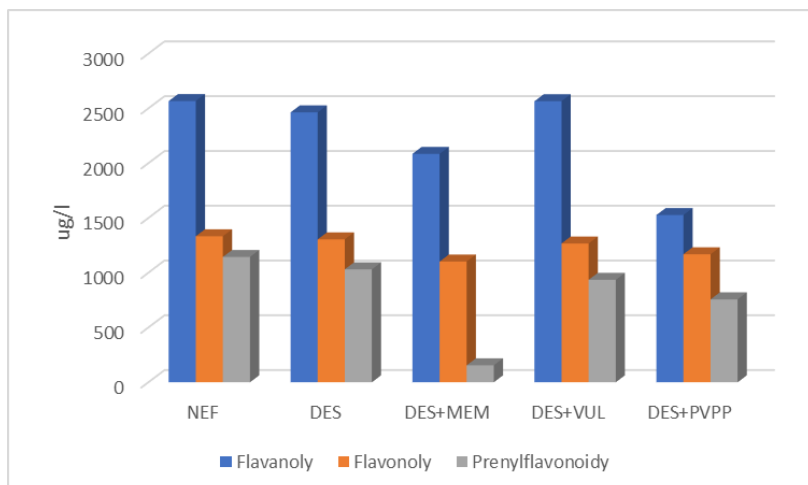
		M	MP	2T	3T	4T	5T	6T
Celkové polyfenoly	mg/l	223	206	185	173	167	170	168
Flavanoly	ug/l							
Katechin		2202	2000	1639	1101	955	925	1018
Epikatechin		436	354	257	207	175	168	177
Katechin-O-glukosid		548	417	461	415	424	463	423
Epikatechin-O-glukosid		150	116	124	102	108	107	109
Flavanoly	ug/l							
Myricetin		70	71	77	77	77	77	77
Kvercetin		35	48	47	28	27	30	25
Kempferol		6	12	12	3	2	4	1
Rutin		106	117	131	116	121	123	114
Kvercetin-O-glukosid		444	399	408	371	361	405	368
Kaempferol-O-glukosid		214	187	197	177	178	187	188
Myricetin-O-glukosid		75	75	85	84	84	85	83
Multifidol-O-glukosid		102	92	104	92	96	97	97
Kvercetin-O-malonylglukosid		92	99	89	85	81	88	78
Prenylflavonoidy	ug/l							
Isoxanthohumol		984	888	569	530	496	517	498
Xanthohumol		333	281	26	20	18	17	16
8-prenylnaringenin		115	96	20	16	13	15	14
6-prenylnaringenin		380	364	82	67	61	63	68

M – mladina; MP – mladé pivo; 2T – pivo po 2 týdnech ležení

Tab. F2 Výsledky analýzy filtrovaných a stabilizovaných piv na obsah polyfenolových látek

		NEF	DES	DES+ MEM	DES+ VUL	DES+ PVPP
Celkové polyfenoly	mg/l	256	230	207	220	203
Anthokyanogeny	mg/l	67	53	47	49	41
DPPH ARP	%	72	71	71	71	64
Flavanoly	ug/l					
Katechin		1723	1623	1292	1697	830
Epikatechin		532	492	485	511	455
Katechin-O-glukosid		218	254	216	259	152
Epikatechin-O-glukosid		95	95	92	99	90
Flavanoly	ug/l					
Myricetin		9	8	7	8	7
Kvercetin		25	31	20	28	23
Kempferol		14	21	13	20	16
Rutin		262	261	257	253	256
Kvercetin-O-glukosid		441	430	334	418	361
Kaempferol-O-glukosid		365	356	283	348	318
Myricetin-O-glukosid		12	12	11	12	11
Multifidol-O-glukosid		104	101	101	98	100
Kvercetin-O-malonylglukosid		101	85	76	82	77
Prenylflavonoidy	ug/l					
Isoxanthohumol		820	785	123	728	605
Xanthohumol		97	57	10	42	31
8-prenylnaringenin		47	38	0	34	23
6-prenylnaringenin		180	151	22	131	98

NEF – nefiltrované pivo; DES filtrace hloubkovými deskami; DES+MEM – filtrace PES membránou; DES+VUL – stabilizace sorbentem bílkovin; DES+PVPP – stabilizace sorbentem polyfenolů



Obr. F1 Změny flavanolů, flavonolu a prenylflavonoidů při filtraci a stabilizaci piva

NEF – nefiltrované pivo; DES filtrace hloubkovými deskami; DES+MEM – filtrace PES membránou; DES+VUL – stabilizace sorbentem bílkovin; DES+PVPP – stabilizace sorbentem polyfenolů

II g) Souhrnné hodnocení

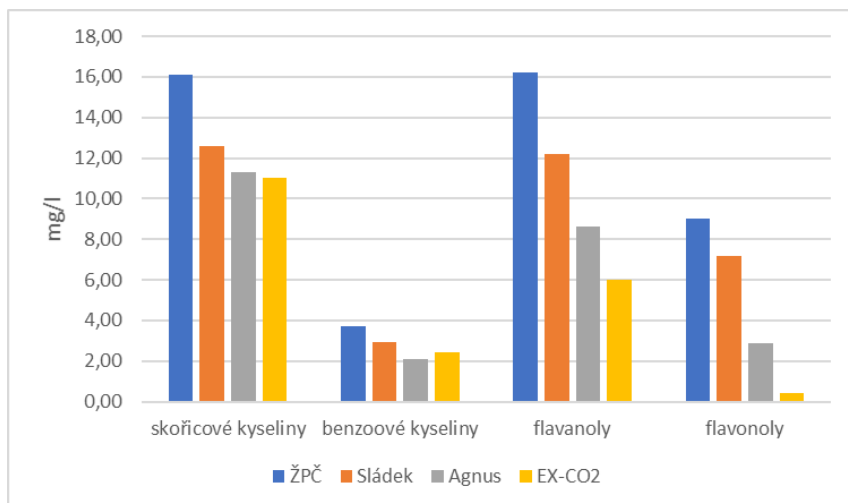
Z výše uvedených přehledů obsahu, složení a variability polyfenolových látek v surovinách i jejich dalšího osudu v průběhu výroby piva je možno vyvodit, že stěžejním faktorem ovlivňujícím hladinu polyfenolových látek v pivu je již samotná volba surovin.

Koncentraci sumy polyfenolových látek i zastoupení jednotlivých skupin polyfenolů v pivu je zásadně možno ovlivnit chmelením, použitou chmelovou surovinou. S chmelem do piva přichází převážná část flavonolů a jejich glykosidů, chmel je výlučným zdrojem prenylflavonoidů. Chmelem je kromě flavonoidních polyfenolů ovlivněna i koncentrace fenolových monokarboxylových kyselin, jak je patrné z porovnání volných fenolových látek v 12 % světlých ležáckých pivech ze 100 % chmelených chmely ŽPČ, Sládek, Agnus a chmelovým extraktem neobsahujícím polyfenolové látky (obr. G1). Koncentrace celkových polyfenolů ve filtrovaných pivech klesala od ŽPČ po chmelový extrakt v pořadí 210 – 189 – 142 a 123 mg/l. Dosažení vysoké koncentrace polyfenolů je však provázáno snížením koloidní trvanlivosti, která u těchto piv stoupala v pořadí 105 – 110 – 170 a 175 dnů. Modelování přirozené stability čirosti je zjevně možné kombinací chmelových surovin, a v případě piv s dlouhou garancí stabilizací směřovanou na bílkoviny a zároveň šetrnou stabilizací směřovanou na polyfenoly.

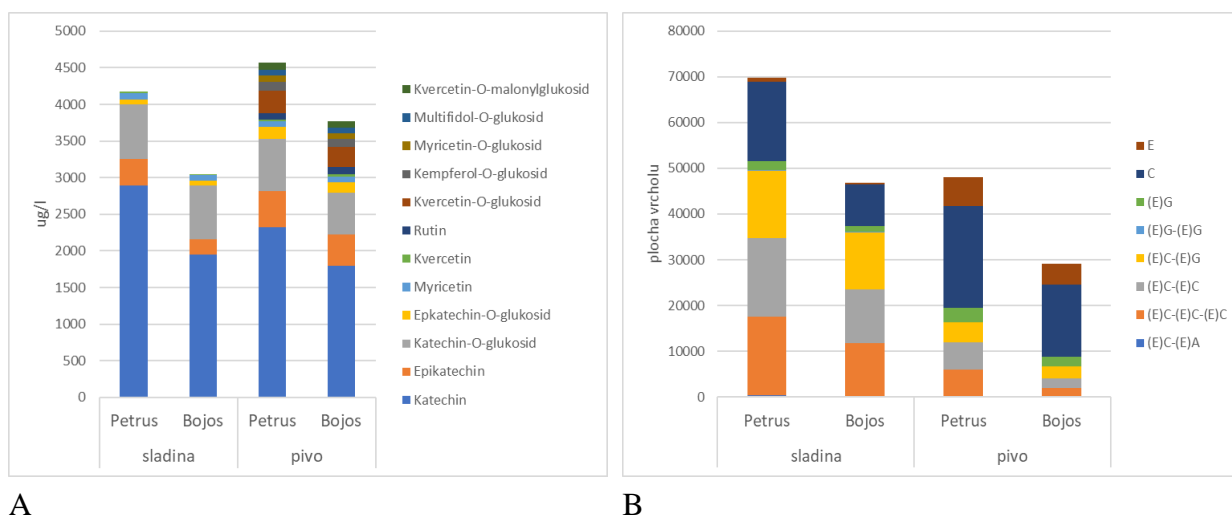
Koncentraci sumy polyfenolových látek a v menší míře i zastoupení jednotlivých skupin polyfenolů v pivu je možno ovlivnit i volbou sladů (odrůd) s vyšším obsahem polyfenolů. Je zřejmé, že tímto způsobem je například při chmelení 11% světlého ležáku 50% pelet ŽPČ a 50 % chmelového extraktu při použití sladu z ječmene odrůdy Petrus v porovnání s odrůdou Bojos dosáhnout koncentrace celkových polyfenolů v pivu o 25 % vyšší (224 oproti 278 mg/l) a markantně vyšší koncentrace flavonoidních polyfenolů v pivu (obr. G2).

Další operací, ve které je možno ovlivnit koncentraci polyfenolů v pivu je výroba sladiny, intenzita rmutování. U méně rozluštěných sladů, specifických pro České pivo má použití dekokčního postupu větší vliv na zvýšení koncentrace polyfenolů nežli u sladů hluboce rozluštěných. Z dat v tabulce G1 jsou zřetelně patrné změny koncentrace celkových polyfenolů i dalších skupin polyfenolových látek v 12% světlém ležáckém pivu vyrobeném infuzním nebo dvourmutovým dekokčním postupem s variantním chmelením 100 % chmelového extraktu, 100 % pelet ŽPČ a kombinací těchto surovin v poměru 50 : 50. Je rovněž zřejmé, že jak dekokční postup, tak chmelové polyfenoly zvyšují antiradikálovou aktivitu DPPH. Doba dávkování chmelové suroviny v průběhu chmelovaru má jen malý vliv na koncentraci polyfenolů v pivu, jejich kvantitativní extrakce z chmele do vroucí sladiny proběhne během 10 – 15 minut.

Se ztrátami polyfenolových látek je nutno počítat zejména při hlavním kvašení, a dále při zrání piva. V rozmezí 3 – 6 týdnů nemá doba zrání žádný vliv na polyfenoly. K dalšímu snížení koncentrace polyfenolových látek dochází při filtraci piva, redukce je do značné míry selektivní například koncentrace zdravotně prospěšných glykosidů flavonoidů není ovlivněna. Výsledky experimentů ale indikují nebezpečí významné sorpce flavonoidů a prenylflavonoidů na PES membránové filtry, používané pro zajištění biologické trvanlivosti nepasterovaných piv, „studenou sterilaci“ piv. Koloidní stabilizace piva sorbenty bílkovin nemá na polyfenolové látky prakticky žádný vliv, stabilizace sorbenty polyfenolů je do značné míry selektivní, nejmenší redukce je u glykosidů. V případě tohoto typu stabilizačního zásahu je potřeba citlivě volit optimální dávku.



Obr. G1 Koncentrace volných fenolových látek v pivech chmelených různými odrůdami chmele a chmelovým extraktem



Obr. G2 Koncentrace flavanolů, flavonolů (A) a proanthokyanidinů (B) v pivech z odrůd ječmene s kontrastním obsahem polyfenolů

Tab. G1 Vliv rmutování a chmelení na polyfenolové látky ve sladince a pivu

		Infuze				Dekokce			
		Sladina	Pivo			Sladina	Pivo		
			E	E+P	P		E	E+P	P
Celkové polyfenoly	mg/l	84,0	89	140	162	129,0	135	180	223
Anthokynogeny	mg/l	21,6	24,3	37,4	39,1	35,5	27,2	38,6	50,6
Flavonoidy	mg/l	10,8	7,8	12,6	17,1	19,4	10,4	13,4	23,9
Fenolové kyseliny	mg/l	7,2	6,2	6,1	6,6	9,7	7,5	8,9	9,0
Flavonoly	mg/l	0,7	0,10	0,80	1,60	1,1	0,10	6,70	7,50
RC-DCPI	%	27	58	60	57	35	56	62	55
DPPH- ARA2	%	37	44	54	62	50	58	66	75

E - chmelový extrakt; E+P - pelety + extrakt; P - chmelové pelety; RC-DCPI – redukční kapacita; DPPH-ARA2 – antiradikálová aktivita

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

V současné výrobní praxi nejsou polyfenolové látky systematicky a komplexně sledovány a hodnoceny, polyfenolům je věnována pozornost pouze z hlediska prodloužení garance čirosti výrobku, koloidní stabilizace piva redukcí obsahu zákonotvorných polyfenolů nebo zajištění požadované koncentrace polyfenolů ve finálním výrobku u značek piv s logem CHZO České pivo. Pomíjen je potenciální zdravotní benefit vyššího obsahu polyfenolových antioxidantů v pivu nebo ochrana citlivých sloučenin extraktu piva před oxidací těmito antioxidanty v průběhu výrobního procesu.

Vypracovaná metodika „Možnosti zvýšení obsahu polyfenolových látek v pivu volbou surovin a technologie“ představuje ucelený postup pro hodnocení zdrojů polyfenolů v pivu, obsahu a zastoupení různých skupin polyfenolových látek v pivovarských surovinách, jejich převodu do roztoku v jednotlivých operacích pivovarské výroby a jejich změn v průběhu výrobního procesu až do finálního výrobku, a je tak vhodným nástrojem pro komplexní přístup k problematice zvýšení obsahu pozitivních polyfenolových látek v pivu volbou surovin počínaje a nastavením procesních parametrů konče, to vše v kontextu aktuálních zdrojů surovin a výrobních postupů používaných v tuzemských pivovarech. Metodika je v návaznosti na CHZO České pivo specificky vhodná pro výrobce používající logo CHZO České pivo i další pivovary, které chtějí podpořit komplexně pojatou kvalitu svých výrobků nebo inovovat výrobu.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika „Možnosti zvýšení obsahu polyfenolových látek v pivu volbou surovin a technologie“ je určena primárně pro výrobní sféru, pivovary vyrábějící pivo s Chráněným zeměpisným označením České pivo i další tuzemské pivovary, svoje uplatnění může najít i u širší škály uživatelů na univerzitách a středních odborných s výukou v oboru sladařství a pivovarství. Kromě vědeckých prací nebyla dosud k dispozici přehledná informace o obsahu a složení polyfenolových látek v aktuálních tuzemských pivovarských surovinách a vlivu surovin a technologie na hladinu polyfenolových látek ve finálním výrobku přístupná širší odborné veřejnosti a praxi. Metodika umožňuje komplexní přístup, hodnocení a dokumentaci řady aspektů polyfenolových látek ve spojení s volbou a kontrolou surovin a surovinovými a technologickými zásahy ve výrobě, ať již je cílem dodržení předepsané koncentrace celkových polyfenolů při výrobě piva dle CHZO České pivo, podpora fyzikálně chemické a senzorické kvality a stability výrobku, nebo zvýšení obsahu polyfenolových antioxidantů se zdravotním benefitem v konkrétní značce piva.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY

Ekonomické aspekty, přínos při uplatnění metodiky ve výzkumné a výrobní praxi jsou nepřímé, jedná se o nástroj pro výběr surovin a procesních parametrů s cílem zvýšení obsahu látek

se potenciálním zdravotním benefitem v pivu u stávajícího sortimentu, nebo pro vývoj nových značek pív. Přímý dopad má metodika pro výrobce používající CHZO České pivo pro zajištění předepsané hladiny celkových polyfenolů v pivu.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt E.K., Becker T., 2014. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4): 289–314.
2. Analytica-EBC, 2010. Nürnberg, Fachverlag Hans Carl, 2010. ISBN: 978-3-418-00759-5.
3. Aron, PM., Shellhammer, TH., 2010. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing* 116(4): 369–380.
4. Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, K.)2010. *Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva*). Praha, VŠCHT, 2010, 863 p. ISBN 978-80-7080-734-7.
5. Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., Riviere, C., 2018. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews* 17:1047–1090.
6. Callemien, D., Bennani, M., Counet, C., Collin, S., 2005. Which polyphenols are involved in aged beer astringency? Assessment by HPLC and time-intensity method. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, Prague, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD-ROM, 2005, 809-814.
7. Callemien, D., Collin, S., 2010. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer – a rewiev. *Food Rewievs International* 26:1-84.
8. Derdelinckx, G., 2008. Polyphenols in wort and beer: State of art in 2008: Where and why? *Cerevisia* 33 (4): 174-187.
9. Gangopadhyay N., Rai D. K., Brunton N. P., Gallagher E., Hossain M. B., 2016. Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain. *Food Chemistry*, 210, 212-220.
10. Guido, LF., Curto, AF., Boivin, P., Benismail, N., Goncalves, CR., Barros, AA., 2007. Correlation of Malt Quality Parameters and Beer Flavor Stability: Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 728-733.
11. Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., Dostálek, P., 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances* 33: 1063-1090.
12. Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., Dostálek, P., 2016. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol. 00, 1-26.
13. Kavalier AR., Litt A., Ma C., Pitra NJ., Coles MC., Kennelly EJ., Matthews PD., 2011. Phytochemical and Morphological Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Cones over Five Developmental Stages Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry, Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection, and Light Microscopy Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 4783–4793.

14. Lotito, S. B., Actis-Goretti, L., Renart, M., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H. H., Steinberg, F. M., Keen, C. L., Fraga, C. G., 2000. Influence of Oligomer Chain Length on the Antioxidant Activity of Procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 945–951. <http://doi:10.1006/bbrc.2000.3571>.
15. McLaughlin, I. R., Lederer, C., Shellhammer, T.H., 2008. Bitterness-modifying properties of hop polyphenols extracted from spent hop material. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 66(3): 174-183.
16. MEBAK: Collection of Brewing Analysis Methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission: Raw materials, Nürnberg, Fachverlag Hans Carl, 2018. ISBN 978-3-9815960-3-8.
17. Nowak R., Olech M., Nowacka N., 2014. Plant polyphenols as chemopreventive agents. In: Watson R, Preedy V, Zibadi S, editors. *Polyphenols in human health and disease*. San Diego: Elsevier Inc. P 1289-307.
18. Nowak, R., Olech, M., Nowacka, N., 2014. Plant polyphenols as chemopreventive agents. In: Watson R, Preedy V, Zibadi S, editors. *Polyphenols in human health and disease*. San Diego: Elsevier Inc. P 1289–307.
19. Oladokun, O., Tarrega, A., James, S., Smart, K., Hort, J., Cook, D., 2016. The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry* 205: 2012-220.
20. Possemiers, S., Heyerick, A., Robbens, V., De Keukeleire, D., Verstraete W., 2005. Activation of Proestrogens from Hops by Intestinal Microbiota; Conversion of Isoxanthohumol into 8-Prenylnaringenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6281-6288.
21. Quinones, M., Miguel M., Aleixandre A., 2013. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research* 68:125-131.
22. Siebert, KJ., Lynn, PY., 2008. On the mechanism of adsorbent interactions with haze-active proteins and polyphenols. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 66(1):48-54.
23. Steiner, E., Becker, T., Gastl, M., 2010. Turbidity and Haze Formation in Beer –Insights and Overview. *Journal of the Institute of Brewing* 116(4): 360–368.
24. Stevens, JF, Taylor, AW, Clawson, JE, Deinzer, ML., 1999. Fate of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops to Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2421-2428.
25. Úřední věstník EU, C016, 23/01/2008, 0014 – 0022 in *Kvasný Průmysl*. 54 (11-12), 2008, 348-351.
26. Wannenmacher J., Gastl M., Becker T., 2018. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol. 0, 1-36.
27. Zimmermann B. F., Galensa R., 2007. One for all- all for one: Proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids - analysis of proanthocyanidins in barley and malt. *European Food Research and Technology*, 224(3), 385-393.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

1. Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, L., Malachová, A., Cerkal, R., 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science* 73(January 2017): 40-45.
2. Mikyška A., Krofta K., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P., 2011. The Influence of Hopping on Formation of Carbonyl Compounds During Storage of Beer. *Journal of the Institute of Brewing* 117(1), 47–54.
3. Mikyška, A., Dušek, M., 2019. How wort boiling process affects flavonoid polyphenols in beer. *Kvasný Průmysl* 65(6): 182-200.
4. Mikyška, A., Dušek, M., 2019. Komplexní pohled na chování polyfenolových látek při chmelovaru . *Kvasný* 1(5): 3-11.
5. Mikyška, A., Dušek, M., 2019. Může proces rmutování ovlivnit antokyjanidiny a prenylflavonoidy v pivu? *Kvasný* 1(5): 30-35.
6. Mikyška, A., Dušek, M., Čejka, P., 2019. Influence of barley variety and growing locality on the profile of flavonoid polyphenols in malt. *Kvasný Průmysl* 65(5): 149-157.
7. Mikyška, A., Dušek, M., Psota, V., 2019. Profil proanthokyanidinů ve sladech 18 odrůd ječmene. *Kvasný* 1(Speciální číslo): 30-34.
8. Mikyška, A., Dušek, M., Slabý, M., 2019. How does fermentation, filtration and stabilization of beer affect polyphenols with health benefits. *Kvasný Prum.* 65(4): 120-126.
9. Mikyška, A., Jurková, M. 2019. Varietal specificity of polyphenols, free phenolics and antioxidant potential in hops. *Kvasný Průmysl* 65(6): 178-185.
10. Mikyška, A., Psota, V., 2019. Chemical and sensory profiles of beers from barley varieties registered in the Czech Republic. *Journal of Food and Nutrition Research* 58(4): 349-362.
11. Mikyška, A., Vrzal, T., Dušek, M., Jurková M., 2018. Factors affecting the polyphenol compounds and antiradical activity of hops: Long-term study of Czech hop varieties. *Kvasný Průmysl* 64(6): 323–330.