

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	11
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 ANTIOXIDANTY	13
2.1.1 Flavonoidy	15
2.1.2 Antioxidační aktivita	16
2.1.2.1 Měření antioxidační aktivity.....	17
2.1.2.2 Chemické metody	18
2.1.2.3 Fyzikální metody	22
2.2 CHMEL OTÁČIVÝ (HUMULUS LUPULUS)	23
2.3 PIVO	24
2.3.1 Přírodní polyfenoly piva.....	25
2.3.2 Reakce přírodních polyfenolů a jejich změny v průběhu technologie	28
2.3.3 Výroba piva	30
2.3.4 Druhy piva	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	34
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	34
3.2.1 Rozpouštědla	34
3.2.2 Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity	34
3.2.3 Vzorky piv	34
3.3 PRACOVNÍ POSTUP – ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	36
3.3.1 Příprava standardů a vzorků	36
3.3.2 Metoda ABTS.....	36
3.3.3 Metoda DPPH.....	36
3.3.4 Metoda FRAP	36
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	38
4.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	38
4.1.1 Metoda ABTS.....	38
4.1.2 Metoda DPPH.....	39
4.1.3 Metoda FRAP	42

4.1.4	Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity	44
5	LITERATURA	47
6	ZÁVĚR	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Absorbance
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dichlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
DMPD	N,N-dimethyl-p-fenylendiamindihydrochlorid
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
FRAP	Metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů (Feric Reducing Antioxidant Power)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
MEBAK	Středoevropská komise pro pivovarskou analytiku (Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission)
ORAC	Metoda stanovení antioxidační aktivity založená na shášení fluorescence (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
TAA	Celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity)
TEAC	Celková antioxidační kapacita vztažená ke standardu Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

1 ÚVOD

Fenolické látky rostlin jsou aromatické metabolity, které obsahují nebo původně obsahovaly jednu či více „kyselých“ hydroxylových skupin vázaných na aromatický kruh. Jedná se buď o metabolity primární (mají úlohu v buněčné stěně) nebo sekundární. Úlohou sekundárních metabolitů je ochrana rostlin, určení specifických vlastností dřeva a kůry, dodání chuťových a vonných vlastností, dodání barvy květům aj. Mají významnou úlohu při regulaci růstu, vývoji, reprodukci a obraně rostlin¹.

Rostliny obsahují několik typů fenolických látek. Jedná se o lignany, ligniny, suberiny, flavonoidy (anthokyaniny, proanthokyanidiny), isoflavonoidy, dále o kumariny, furanokumariny, stilbeny, styrylpyrony a ostatní typy látek.

Polyfenoly se vyskytují v plodech, zelenině, zrnech a nápojích jako je čaj², pivo^{2,3}, červené víno² aj.

Přesný vliv polyfenolických látek v pivu na lidské zdraví se především přisuzuje antioxidačním účinkům, které jsou schopny eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Obecně všechny antioxidanty mají příznivé účinky na lidské zdraví. Především se jedná o antioxidační, antikancerogenní^{3,4}, antimikrobiální, imunomodulační a protizánětlivé účinky. Dále se účastní procesů regulace tlaku krve a hladiny glukózy v krvi. Pravidelný příjem antioxidantů v nápojích snižuje trombotické jevy a tím přispívá ke zlepšení aterosklerózy, snížení výskytu onemocnění a úmrtnosti na nemoci cévní soustavy.

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*)^{5,6} obsahuje pryskyřice, hořčiny (např. humulon, lupulon a další), silice s terpenoidy (např. humulen, myrcen aj.), flavonoidy, fytoncidy, fytosteroly, vosky, cholin aj. Látky obsažené v chmelu posléze přechází do piva.

Polyfenolické látky, jako nejširší skupina antioxidantů v pivovarství, hrají důležitou úlohu i v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování. Oxidační proces zde může způsobit tvorbu řady sensoricky negativních látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ANTIOXIDANTY

Během posledních desetiletí se látky s antioxidačními účinky dostávají do popředí zájmu odborníků nejen v řadě oborů potravinářství, ale i lékařství, zejména v souvislosti s jejich potvrzenými pozitivními účinky na lidské zdraví.

Jedná se o látky, které v potravíně nebo in vivo mohou ve vhodných koncentracích zabránit oxidaci substrátu vedoucí k nežádoucím změnám. Při značném nahromadění reaktivních forem kyslíku, kdy organismus není schopen je sám likvidovat, dochází ke vzniku oxidačního stresu. Oxidační stres v těle poškozuje buňky (zejména buněčné membrány a proteiny), enzymy, genetický materiál, přispívá ke vzniku aterosklerózy, cukrovky, infekčních, nádorových a degenerativních nervových onemocnění aj.

Reaktivní formy kyslíku jsou agresivní molekuly tj. volné radikály, reaktivní anionty obsahující atom kyslíku nebo molekuly s kyslíkem, které buď mohou vytvořit volné radikály nebo jsou volnými radikály aktivovány. Vznikají v těle z exogenních a endogenních příčin. U endogenních příčin je jejich hlavním zdrojem aerobní metabolismus. Vznikají i při řadě buněčných pochodů (metabolismus živin, biosyntéza některých látek, transport elektronů v mitochondriích), fagocytóze a zánětlivých procesech, traumatech i tělesném cvičení. Mezi exogenní příčiny se řadí ionizační záření, škodliviny zevního prostředí (výfukové plyny, kouření), ozón, radiové frekvence, mikrovlny, některé jedy, xenobiotika a léky (např. paracetamol aj.).

Reaktivních forem kyslíku je mnoho druhů, proto organismus využívá různých druhů i směsí antioxidačně působících látek. Detoxikace je řetězovou reakcí. Jedná se o hydrofilní antioxidanty (rozpuštěné ve vodě), které účinkují zejména v extracelulární tekutině (vitamín C, kyselina močová, selen, bioflavonoidy aj.) a lipofilní antioxidanty (rozpuštěné v tucích), které účinkují převážně na membránách, uvnitř buněk (vitamín E, β -karoten, ubichinon Q10 aj.).

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům. Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem⁷.

Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu ($< 0,75$ V) jsou schopny redukovat

některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury. Reakce je velmi významná, neboť radikály jsou eliminovány dříve než reagují s dalšími buněčnými komponentami. Za určitých okolností mohou některé fenolické látky působit i jako prooxidanty. Za přítomnosti zvýšeného množství přechodných kovů může fenoxyllový radikál reagovat i s kyslíkem za vzniku superoxidu a chinonu.

Antioxidanty představují jeden z mechanismů, kterým jsou v organizmech eliminovány reaktivní oxidační procesy. Některé antioxidanty se vyznačují schopností reagovat s volnými radikály, aniž by při těchto reakcích docházelo k následné generaci radikálů jiných. Důsledkem tohoto faktu je princip „zhašení“ řetězových reakcí. Jiné antioxidanty redukují oxidační činidlo přímo, samy se při tom oxidují a musí být poté opět regenerovány, má-li být zachována jejich protektivní funkce⁸.

V lidském organismu tvoří ochranu před oxidačním poškozením nejen antioxidanty syntetizované v těle, ale i ty, které přijímáme potravou. Konzumace antioxidantně působících látek je spojována např. se sníženým rizikem vzniku aterosklerózy^{2,9}, rakoviny^{9,10}, kardiovaskulárních onemocnění^{10,11}, řídnutím kostí². Antioxidanty získáváme potravou hlavně z ovoce^{9,10} zeleniny^{9,10}, obilovin^{9,10}, cereálií⁹, luštěnin⁹, brambor⁹ a nápojů¹⁰ jako je čaj², pivo^{2,3} a červené víno². Nejvýznamnějšími přírodními antioxidanty jsou tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E), kyselina askorbová (vitamin C), fenolové látky (především flavonoidy, fenolové kyseliny, jednoduché fenoly, stilbeny) a karotenoidy, přičemž nejvíce zastoupenými antioxidanty v potravě jsou flavonoidy a fenolové kyseliny.

Epidemiologickými výzkumy byla potvrzena nezbytnost denní konzumace 400 g ovoce a zeleniny, čímž je umožněn dostatečný příjem fenolických látek (100 mg denně a více) a příjem ostatních živin, které jsou významnými faktory prevence neinfekčních chronických chorob. V oblasti metabolismu a trávení jsou tyto sloučeniny přítomné ve formě glykosidů, v lidském organismu jsou podrobeny částečné deglykosidaci, aktivnímu i pasivnímu transportu do krevního oběhu, biotransformacím v játrech a vylučování ve formě svých metabolitů a jejich konjugátů. V krevní plazmě je při běžném dietárním příjmu fenolických látek jejich koncentrace 1 μmol/l^{9,12}. Rostlinné fenolické látky zvyšují biologickou hodnotu potravin, ve kterých se vyskytují a jsou nositeli jejich kvality.

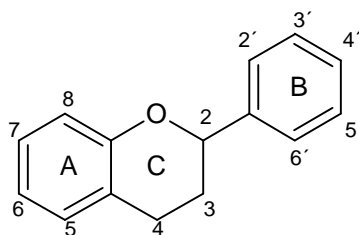
Obsah antioxidantů v potravinách lze nad přirozenou hladinu navýšit přidáním dalších antioxidantů, čehož se využívá při prodloužení trvanlivosti, zabránění vzniku nežádoucí vůně a chuti, či pro dosažení vyšší nutriční hodnoty potravin obsahujících

snadno oxidovatelné složky. Antioxidanty dodané do potravin by měly být zdravotně nezávadné, snadno aplikovatelné, účinné v nízkých koncentracích, bez nežádoucího aroma a chuti, přičemž musí být zvaženo jejich prooxidační působení. Používají se nejen pro stabilizaci potravin obsahujících tuk, ale i v nápojích pro stabilizaci aroma. Fenolické látky přijímané ve výživě člověka lze rozdělit do tří základních skupin: na fenolické kyseliny, flavonoidy a skupinu stilbenů a lignanů, která je méně častá.

2.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou chemické sloučeniny patřící do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů, jedná se převážně o barviva rozpustná ve vodě. Funkcí flavonoidů je interakce rostlina - živočich, hmyz či bakterie. Flavonoidy určující barvu květů patří mezi anthokyaniny: pelargonidiny - červené, oranžové a růžové, kyanidiny - karmínové a fialovorůžové, delfinidiny - modré, nachové a lila, flavonoly, flavony, chalkony, aurony, atd. Dále flavonoidy zajišťují indukovanou obranu proti napadení houbami, mikroby, hmyzem, odpuzování bíložravců hořkostí, trpkostí - proanthokyanidiny, ochranu rostlin proti UV-B záření, determinují kvalitu dřeva, jeho tvrdost, pevnost, odolnost proti hnití. Mají farmakologické účinky u živočichů, a to jako modulátory funkce hladkého svalstva, imunitního systému, dále protirakovinné, antivirální, antitoxické a hepatoprotektivní účinky¹.

V současné době je známo více než čtyři tisíce zástupců flavonoidních látek a stále se objevují nové. První zástupci, kteří byli podrobně zkoumáni, byli nápadní svojí žlutou barvou (z latinského flavus = žlutý byl odvozen název celé skupiny). Základem je flavan (obr. 1) skládající se ze dvou benzenových jader spojených pyranem. Přírodní flavonoidy mají nejčasteji podobu O-glykosidů, jejichž molekula se tedy dá „rozdělit“ na cukernou a necukernou část (aglykon). Z lékařského hlediska se dají flavonoidy definovat jako „skupina látek obsažených v ovoci a zelenině, jež je nezbytná pro využití vitamínu C a pro optimální funkci kapilární stěny.“



Obr. 1 – Struktura flavanu.

Flavonoidy zahrnují flavony, flavonoly, aurony, chalkony, flavonony, isoflavonoidy, leukoanthokyanidiny, katechiny a anthokyaniny. Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a isoflavonoidy. Dominantním flavonoidem ve výživě člověka je flavanol kvercetin.

Flavonoidy patří mezi významné antioxidanty. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, váží a inaktivují některé prooxidační ionty kovů (železo, měď). Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a také na jejich glykosylaci.

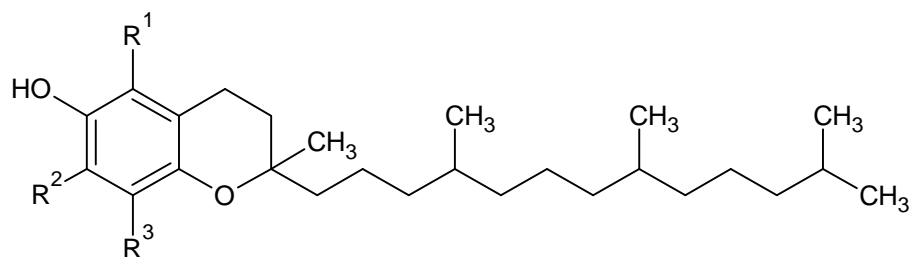
Flavonoidy se významně podílejí na prevenci onemocnění objevujících se v souvislosti s oxidačním poškozením biomembrán. Jedná se především o kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění a také záněty. Ukazuje se, že při terapii a prevenci zmíněných onemocnění je konzumace potravin obsahujících flavonoidy vhodnější než podávání samotných antioxidantů, jako je vitamin C a E.

2.1.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny nebo směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Měly bychom rozlišovat dva pojmy, a to antioxidační kapacita a aktivita. Antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku, zatímco aktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu¹³.

Antioxidační chování je třeba posuzovat z více sledovaných parametrů, neboť některé antioxidanty mohou inhibovat nárůst primárních oxidačních produktů, zatímco jiné mohou bránit jejich rozkladu, který se projevuje především vznikem senzorycky nežádoucích látek udělujících potravíně žluklé aroma. Důležitá je též přítomnost dalších látek v systému, které mohou působit synergicky, nebo antagonicky. Antioxidační účinek látek vyplývá z jejich specifické struktury. U látek fenolového typu (tokoferoly - obr. 2, flavonoidy, fenolové kyseliny), které jsou schopné přerušit řetězovou radikálovou reakci, závisí antioxidační schopnost na počtu a poloze hydroxylových skupin i typu dalších substituentů (alkyl, alkoxykupina, allylové uskupení, glykosidická část). Tyto strukturní faktory podmiňují snadnost odštěpení vodíku z molekuly antioxidantu, čímž se inaktivují radikály vzniklé oxidací lipidů nebo metabolickými pochody (např. hydroxylový radikál), dále ovlivňují míru stabilizace vzniklého radikálu antioxidantu, snadnost reakce s jiným radikálem či schopnost chelátovat kovy katalyzující oxidaci. Kromě struktury ovlivňuje

antioxidační aktivitu antioxidantů i pH systému a stabilita sloučenin během zpracování suroviny (teplota, fermentace)¹⁰.



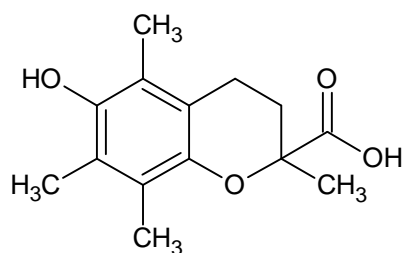
Obr. 2 – Obecný vzorec tokoferolů. Např. α -tokoferol: $R^1, R^2, R^3 = \text{CH}_3$.

2.1.2.1 Měření antioxidační aktivity

V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení potravin bylo vypracováno množství metod, které slouží ke stanovení tzv. celkové antioxidační aktivity vzorku (Total Antioxidant Activity, TAA). Jedná se o metody, které jsou principiálně značně odlišné a průběžně se vyvíjejí jejich modifikace. Úkolem těchto metod je charakterizovat v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí jejich antioxidační, případně redukční účinnost jako souhrnnou vlastnost sloučeniny.

Možností praktického využití výsledků systematického hodnocení TAA potravin rostlinného původu je několik. Mohou být používány jako alternativní kritérium biologické hodnoty potravin, mohou být používány jako srovnávací znak potravin v závislosti na různých podmínkách jejich získávání a úschovy (odrůdy, technologie, způsob skladování, klimatické a agrotechnické podmínky, apod.), jsou podnětem pro přehodnocení účelnosti nahrazení ovoce, zeleniny a jiných potravin rostlinného původu farmaceutickými antioxidanty.

Souhrnně lze stanovení TAA potravin hodnotit jako snahu standardními postupy určit fyziologicky interpretovatelnou antioxidační účinnost vzorku, a to způsobem, který by byl metodicky, materiálově a instrumentálně dostupný a použitelný k početným sériovým analýzám. Jeho výsledky by měly korespondovat s biologickými hodnotami téhož vzorku¹⁴. Existuje velké množství metod pro stanovení a vyjádření TAA. Nejčastěji používanou metodou je TEAC¹⁵ (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Jedná se o metodu, která vyjadřuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní určitému množství standardu Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina) (obr. 3).



Obr. 3 - Trolox

TEAC je definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající antioxidační aktivitě testované látky o koncentraci 1mmol/l pro čisté látky. Pro směsné vzorky se jedná o látkové množství Troloxu, které odpovídá aktivitě 1 g nebo 1 ml vzorku. Metoda je použitelná pro měření čistých látek, vodných roztoků i nápojů.

Metody stanovení antioxidačních účinků v pivovarnictví je možné rozdělit do dvou základních skupin, a to na metody chemické a metody fyzikální.

Chemické metody jsou založeny na použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí slepého a měřeného vzorku udává obsah látek s antioxidačními účinky. Avšak srovnání výsledků poskytovaných jednotlivými metodami není snadné, protože antioxidantů i reaktivních látek, které způsobují oxidační změny je celá řada a prakticky žádná z metod není schopna obsáhnout tento fakt v celé jeho šíři.

Fyzikální metody sledují změny fyzikálních vlastností, které tyto procesy provázejí.

2.1.2.2 Chemické metody

Metoda TEAC - (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Metoda TEAC využívá činidel, které iniciační akcí jiné látky přecházejí na svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potraviny se redukuje, a tím odbarvuje, je měřena relativní zhášecí schopnost antioxidantu v porovnání s Troloxem. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření této kvality vzorku bylo standardní, stanovuje se shodným postupem TEAC v přítomnosti pouhého askorbátu, Troloxu, gallátu, epikatechinu nebo jiných klasických antioxidantů.

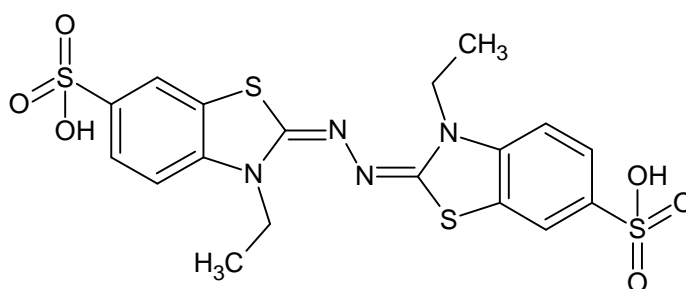
Nejčastěji používaným prekursorem radikálu je tzv. ABTS (obr. 4). Dále se používá TPTZ (obr. 5), DPPH (obr. 6) aj.

Metoda ABTS

Iniciátorem, který ABTS (obr. 4) přeměňuje na modrozelený kationradikál $ABTS^{*+}$, je látka AAPH tj. 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid^{3,13,14}. Směs ABTS s AAPH byla inkubována v acetátovém pufru o pH 4,3 při 45 °C po dobu 60 min. Po ochlazení a přidání vzorku, resp. pufru v případě slepého vzorku, se po 25 min. měřila absorbance při vlnové délce 734 nm. Stanovená hodnota je v pivovarství považována za odpovídající indikátor antioxidačních účinků výhradně polyfenolických látek. Dále lze jako iniciátor $ABTS^{*+}$ použít peroxid vodíku^{13,14}, $K_4[Fe(CN)_6]$ ^{13,14}, $K_2S_2O_8$ ^{13,14}, aj.

ABTS radikál je stabilní při pokojové teplotě do 35°C a při hodnotách pH do 7,5¹⁶.

TEAC vyjadřuje počet radikálových kationtů $ABTS^{*+}$ inaktivovaných jednou molekulou antioxidantu. Relativní antioxidační aktivita je definována jako koncentrace TROLOXu se stejnou antioxidační aktivitou, jako má stanovovaný vzorek o koncentraci 1 mol/l. Stanovení TEAC je závislé na čase inkubace i na poměru množství vzorku a koncentrace $ABTS^{*+}$. Jedním z omezení této metody je její malá selektivita při reakci s donory vodíkových atomů. ABTS test je vhodný pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů. $ABTS^{*+}$ má silnou absorbanci ve viditelné oblasti 600–750 nm a tudíž může být antioxidační aktivita snadno stanovena spektrofotometricky¹³.

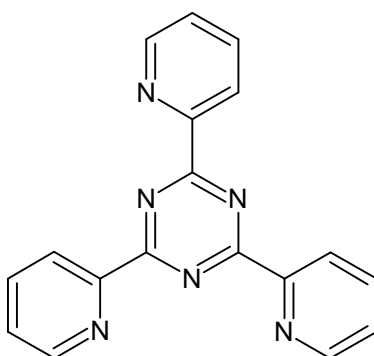


Obr. 4 – ABTS

Metoda FRAP (Ferric reduction antioxidant power)

Metoda FRAP je založena na redukci železitého komplexu TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) (obr. 5) s hexokyanatanem draselným $K_3[Fe(CN)_6]$ ^{13,14}, nebo chloridem železitým $FeCl_3$ ¹³, které jsou téměř bezbarvé a po redukci, eventuálně po reakci s dalším činidlem vytváří barevné, modře zbarvené železnaté komplexy měřitelné spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm¹³.

Reakce při metodě FRAP se provádí v prostředí pufru, kdy kromě vzorku, resp. standardu, se přidává roztok hexakynoželézitanu draselného a chloridu železitého. Látky s odpovídajícím redukčním potenciálem redukuji železitou sůl na železnatou, ta reaguje s hexakynoželézitanem za vzniku modrého zbarvení, které se měří spektrofotometricky při 700 nm¹⁴. Jako standard lze použít roztok kyseliny gallové, epikatechinu nebo TROLOXu. Výsledky se vyjadřují ekvivalentním množstvím standardu odpovídají 1 g nebo 1 ml vzorku se stejnou redukční aktivitou¹⁴.

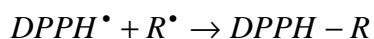
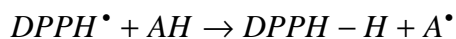


Obr. 5 - TPTZ

Metoda DPPH

DPPH test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH test je při reakci s donory vodíku selektivnější než ABTS^{•+}. Při tomto testu se využívá sloučeniny DPPH (obr.6), která je v metanolovém roztoku v barevné radikálové formě. DPPH[•] a vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Redukce DPPH antioxidantem nebo radikálem se projevuje odbarvením roztoku, které se měří spektrofotometricky při 517 nm¹³.

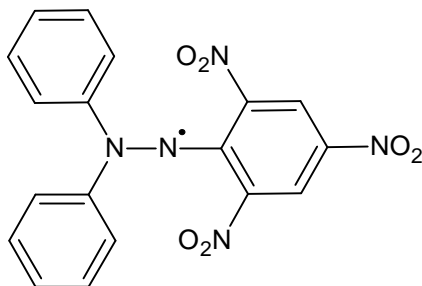
Úbytek látky může být sledován detekcí HPLC, kdy je sledovanou veličinou plocha pásu odpovídající DPPH – metoda dle Kanedy³.



Jako standard lze, kromě Troloxu, použít kyselinu gallovou či epikatechin. Určuje se množství standardu, které je ekvivalentní redukční účinnosti testovaného vzorku. Jedná se o metodu nepřímou, jejíž výsledky nepostihují skutečný antioxidační potenciál potravin

in vivo tj, po jejich požití, ale jsou mu pouze úměrné. Proto je metoda považována pouze za orientační¹⁴.

DPPH test se dále používá ke kinetické analýze, kdy se měří pokles absorbance v závislosti na čase¹².



Obr. 6 - DPPH[•]

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Metoda ORAC je založena na vytvoření peroxylového radikálu feroeritru, a to jeho oxidací činidlem ABAP (2,2'-azobis-2-methyl-propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku¹⁴.

Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová) - metoda MEBAK³

Jedná se o standardní metodu podporovanou MEBAK (Mittleeuropäische Brautechnische Analysenkommission). Principem je reakce 2,6-dichlorfenolindofenolu s endiolovou skupinou polyfenolů za vzniku bezbarvých dioxosloučenin. Změnu zbarvení je možné stanovit spektrofotometricky. V případě, kdy není možné použití optických metod (tmavá piva, kvasnicová piva), se používá kombinace s voltametrickou detekcí. Výsledky se vyjadřují jako ekvivalenty množství kyseliny L - askorbové, která slouží jako standard.

Stanovení celkového antioxidačního stavu³

Tato metoda byla doposud využívána v medicínské praxi při stanovení antioxidačních vlastností krve a séra. Metoda spočívá v reakci methmyoglobinu s peroxidem vodíku za tvorby radikálu ferrylmyoglobinu. Uvedený radikál reaguje s ABTS v substrátu a vytváří radikál-kation ABTS^{•+} modrozelené barvy. Antioxidanty v systému

zabraňují tvorbě ABTS^{•+} v množství odpovídající jejich koncentraci. Reakce probíhá při 37°C a se měří při vlnové délce 600 nm.

Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem³

Metoda je založena na reakci železitých iontů s 2,2'-bipyridylem. Vzniklý komplex je silné oxidační činidlo, které reaguje se širokou skupinou redukujících látek. Barevný přechod je z bezbarvé oxidované formy na červenou redukovanou. Tato změna je měřitelná spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm po tříminutové prodlevě.

Metoda spoluoxidace β -karotenu v linoleátovém modelovém systému³

β -karoten je díky systému dvojných vazeb ve svém řetězci výborným pohlcovačem radikálů. Je přidáván do vzorku a spolu s ním podroben oxidaci. Měří se pokles absorbance β -karotenu při vlnové délce 470 nm za a bez přítomnosti antioxidantů ze vzorku. Antioxidační vlastnosti jsou vyjádřeny jako procenta inhibice oxidace β -karotenu.

Inhibice lipoxygenasové aktivity³

Metoda inhibice lipoxygenasové aktivity se používá pro určení antioxidačních schopností v ječmenných a sladových extraktech. Lipoxygenasová aktivita se vyjadřuje v nanomolech spotřebovaného kyslíku za sekundu. Antioxidační kapacita bývá pak vyjadřována v procentech inhibice v porovnání se srovnávacím vzorkem.

2.1.2.3 Fyzikální metody

Elektronová spinová rezonance (ESR)³

Metoda na určování přítomnosti iontů obsahujících nepárové elektrony. Metoda je vhodná pro stanovení volných kyslíkových radikálů, případně jejich komplexů s některými kovovými ionty. Metoda se používá pro stanovení endogenní antioxidační aktivity piva. Tato technika umožňuje i predikci chuťové stability piva.

Stanovení redox potenciálu³

Metoda, kdy stanovujeme rH (redox potenciál vztažený ke standardní vodíkové elektrodě). Metoda se používá pro stanovení tří skupin látek, které rozhodující měrou ovlivňují hodnotu redox potenciálu v pivovarském procesu. Jedná se o rozpuštěný kyslík

(hodnota rH je lineárně závislá na jeho koncentraci), těžké kovy a jejich komplexy (zejména železo a měď) a látky povahy reduktonů.

Chemiluminiscence³

Použití chemiluminiscence jako metody pro stanovení intenzity oxidace lipidů. Jako luminiscenční činidlo se nejvíce osvědčil 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion (isoluminol) a 6-fenyl-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a] pyrazin-3-on. Bylo zjištěno, že rozhodující vliv na intenzitu oxidace lipidů má teplota, kdy bylo dosaženo největší intenzity luminiscence při teplotách okolo 65°C a intenzita míchání. To odpovídá podmínkám, které jsou běžné při rmutování.

Speciální metody¹⁴

Briggs-Rauscherova metoda využívá peroxylový radikál malonátu, jehož tvorba v umělém systému je moderována aplikovaným vzorkem. Kvantitativní hodnocení radikálu je oscilometrické, metoda je výjimečně citlivá.

Další metoda spočívá na vytvoření superoxidového anionu a jeho zhasnutí vzorkem, koncentrace tohoto radikálu se měří pomocí specifického biosenzoru.

Osvědčují se rovněž velmi jednoduché metody, např. směs měďnaté soli s činidlem na sůl měďnou (bathocuproin = disodná sůl 2,9-dimethyl-4,7-difenyl-1,10-fenantrolin disulfonové kyseliny), kdy se určuje množství redukované formy vytvořené potravními antioxidanty.

2.2 CHMEL OTÁČIVÝ (HUMULUS LUPULUS)

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*)^{5,6} je dvouděložná dvoudomá vytrvalá bylina s dlouhými lodyhami z řádu kopřivokvėtųých, čeledi konopovitých. Lodyha je ovíjivá, pravotočivá, drsně chlupatá. Listy jsou dlouze řapíkaté, dlanitě členěné, se 3 až 7 laloky na okraji osinkatě pilovitými. Květy jsou drobné, nenápadné, světle zelené, samčí pětičetné, uspořádané v latnatá květenství, samičí v hustých svazečcích, které se v době dozrání mění v šištice složené ze zvětšených, žlutavě zbarvených listenů.

Pro pivovarské účely se sbírají pouze samičí šištice nebo chmelové (lupulinové) žlázy zvané lupulin, které vyrůstají na listenech tvořících šištici. Samčí šištice se ze zákona ničí, protože oplodněné hlávky mají sníženou pivovarskou hodnotu. Šištice se sbírají ve druhé polovině srpna nebo začátkem září, kdy obsahují nejvíce účinných látek.

Suší se za teplot nepřesahujících 40°C. Lupulin se získává proséváním a dalším čištěním chmelových šištic.

Chmel obsahuje pryskyřice, hořčiny (např. humulon, lupulon a další), silice s terpenoidy (např. humulen, myrcen aj.), flavonoidy, fytoncidy, fytosteroly, vosky, cholin a další látky.

Chmel působí sedativně, podporuje trávení, má desinfekční účinky a protože obsahuje látky podobné ženským pohlavním hormonům, napomáhá u žen regulovat menstruační cyklus a u mužů tlumí, stejně jako pivo, pohlavní pud.

2.3 PIVO

Pivo je oblíbený slabě alkoholický nápoj, který je pro svůj osvěžující charakter, příjemnou hořkou chuť a dietetické účinky velmi rozšířen u nás i v zahraničí. Jeho obliba se projevuje v celosvětovém růstu výroby. V České republice představuje pivo jeden z nejvýznamnějších zdrojů antioxidantů, neboť průměrná spotřeba je kolem 160 l na osobu za rok (nejvíce na světě)³.

V dnešní době je asi nejzávažnějším problémem pivovarského průmyslu zajištění dostatečně dlouhé doby trvanlivosti, aniž by došlo ke změnám v kvalitativních vlastnostech piva. Musí být zachována čirost, barva, chuť, vůně, pěnivost, a to během transportu i skladování. Polyfenolické látky mají těsný vztah k výše uvedeným vlastnostem piva. Do piva se dostávají z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových výrobků jako přírodní složky, které ovlivňují jeho senzorické vlastnosti i trvanlivost^{3,4}.

Jejich hlavními představiteli jsou flavonoidy, zahrnují se mezi ně i kumarinové deriváty, chinony, ubichinony, štěpné produkty testinových kyselin, deriváty kyseliny chlorogenové a volné fenolové kyseliny. Přesný vliv polyfenolických složek piva na lidské zdraví se především přisuzuje antioxidantním účinkům, které jsou schopny eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Fenolické látky piva a červeného vína inhibují mědí katalyzovanou oxidaci LDL (nizkodenzitní lipoprotein), mají proti ní silné antioxidantní účinky. Ve chmelu a pivu přítomné prenylované flavonoidy jsou schopny inhibovat oxidaci LDL, mající klíčovou úlohu ve vzniku aterosklerózy. Hlavní prenylchalon xanthohumol vykazuje vysokou účinnost při inhibici oxidace LDL. V pivu se nachází i jeho isomer isoxanthohumol s prokázaným antikancerogenním účinkem. Při blokaci škodlivých enzymů je účinnější než xanthohumol. Polyfenoly obsažené v pivu jsou schopny vázat LDL a VLDL (velmi nizkodenzitní lipoprotein) v plazmě. Dále se předpokládá, že xanthohumol je původcem oestrogení aktivity. Z uvedeného přehledu

jsou patrné pozitivní účinky na lidské zdraví, ale na straně druhé nesmí být opomenut fakt, že pivo je nápoj alkoholický, který při nadměrné konzumaci může být původcem řady zdravotních poškození. Zdraví prospěšná konzumace, tzv. řízené neboli moderované pití by nemělo přesáhnout 0,5 – 1 l denně, s ohledem na celkový zdravotní stav konzumenta. Konzumace piva je doporučována během jídla, kdy je vstřebávání pomalejší a ochranný účinek delší.

Přírodní polyfenolické složky piva pocházející z ječmene, sladu a chmele vykazují výrazné antioxidační účinky, které se projevují především v inhibici oxidačních přeměn lipidických složek a tím blokováním procesů stárnutí chuti piva⁴.

2.3.1 Přírodní polyfenoly piva⁴

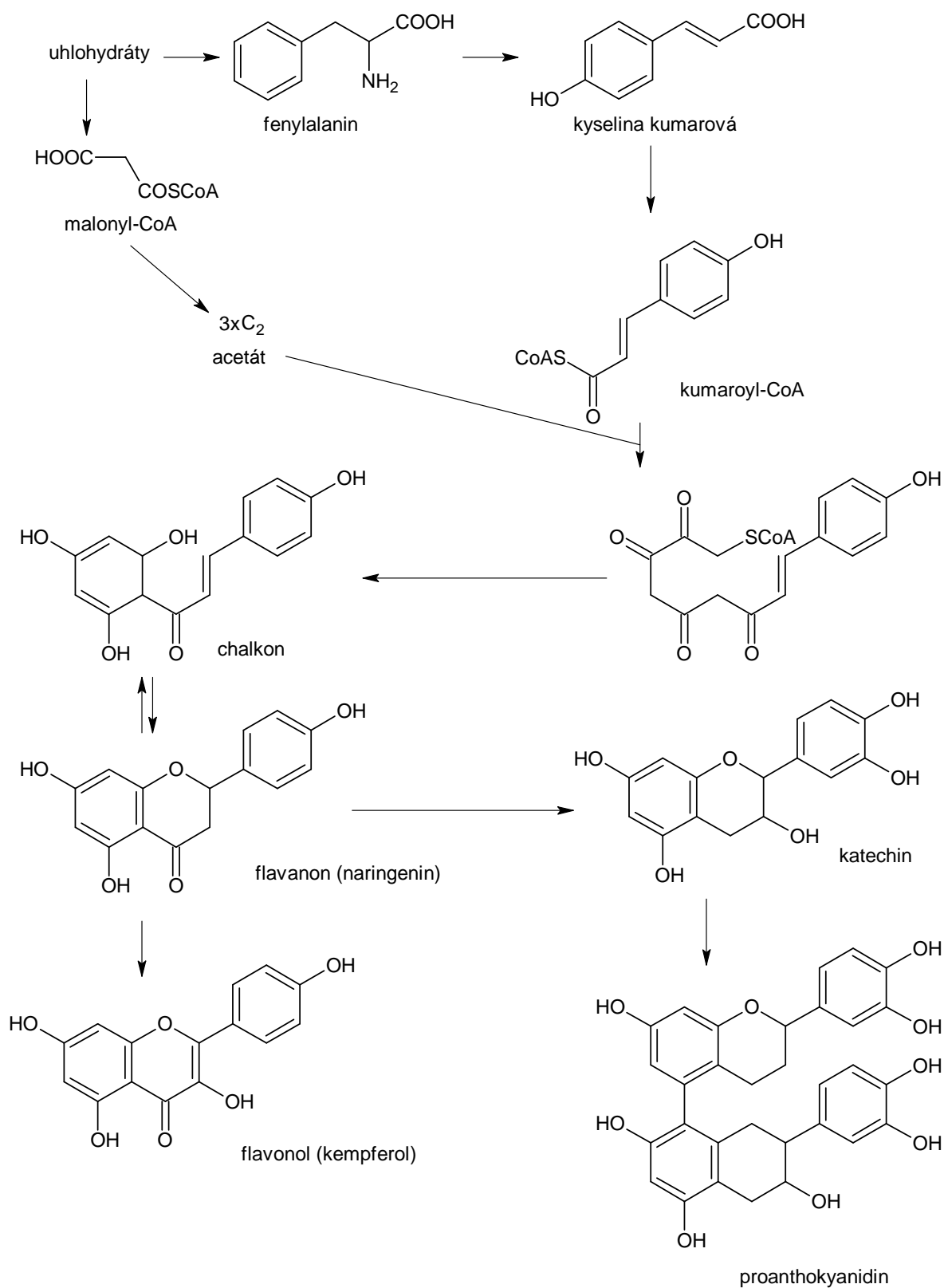
Nejvíce zastoupenou skupinu polyfenolických složek piva představují flavonoidy, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů obsahujících v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem, jejich struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu (obr. 1, kap. 2.1.1).

Uvedené polyfenoly se obvykle rozdělují do 4 podskupin na chalkony, flavanoidy, flavonoly a anthokyanidiny. Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthásou (obr. 7). Další adice prenylu, nebo geranylu mohou vést k prenylovaným chalkonům. Flavononová struktura vzniká isomerací chalkonu enzymem chalkonisomerásou a její následná oxidace vede k flavanolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavanolová polymerace může vést ke vzniku proanthokyanogenů.

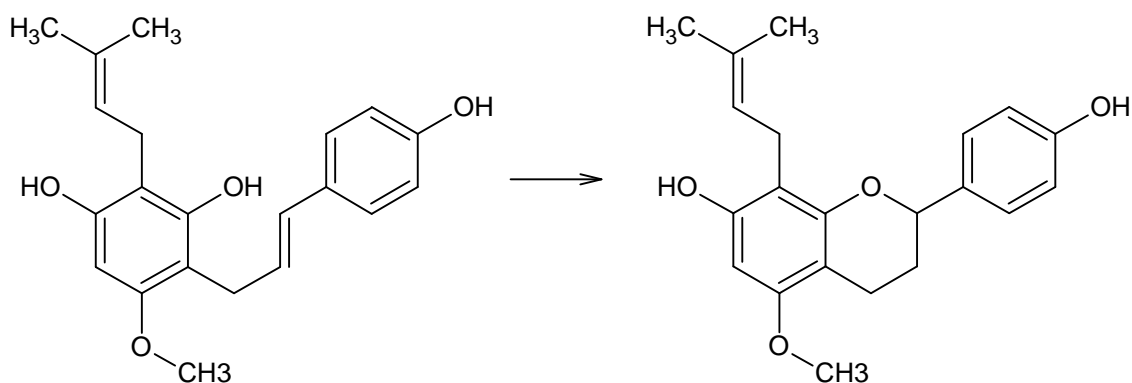
Krátké polymery do 10 jednotek jsou označovány za oligomery, kdežto dlouhé řetězce za taniny. Z chmele se dostávají do piva flavonoidy s prenylovým substituentem na kruhu A. Více než 80 % z nich tvoří xanthohumol, který přechází do piva v isomerizované formě jako isoxanthohumol (obr. 8). Do piva přecházející flavanoly z chmele jsou reprezentovány hlavně flavan-3-oly, katechinem a anthokyanogeny (obr. 9).

Jednoduché flavanoly (monomery, dimery, trimetry) představují menší část chmelových flavanolů. Byly nalezeny dva monomery katechin a epikatechin. Většinu dimerové frakce tvoří proanthokyanidin B1 (tvořený molekulou katechinu vázanou na epikatechin) a proanthokyanidin B3 (tvořený dvěma molekulami katechinu). Hlavním trimetrem je proanthokyanidin C2 (tři katechinové jednotky). Oligomerní frakce tvoří až 80% flavanoidního extraktu chmele. Flavanoly přicházejí do pivovarského procesu

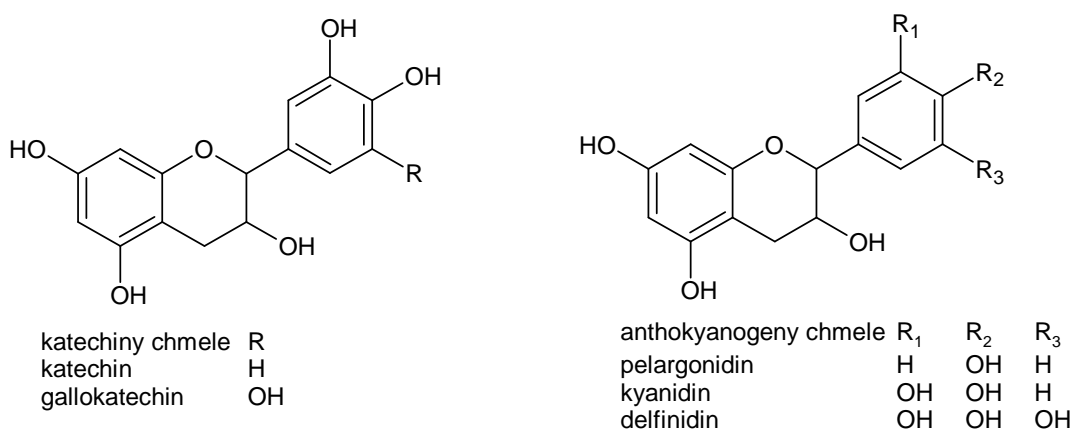
převážně ve formě flavonolových glykosidů. Většina z nich jako mono-, di-, tri –glykosidy kvercertinu a kempferolu (obr.10).



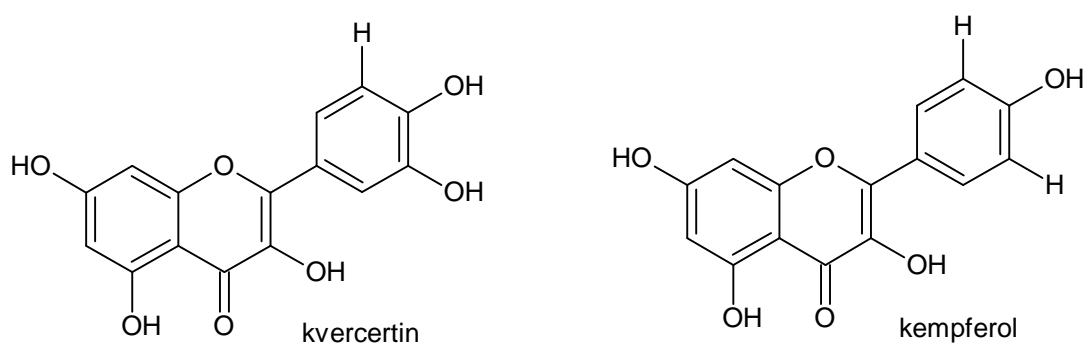
Obr. 7 – Biosyntéza flavanoidů



Obr. 8 – Isomerace xanthohumolu na isoxanthohumol během chmelovaru



Obr. 9 – Základní struktura katechinů a anthokyanogenů



Obr. 10 – Kvercertin a kempferol

Přes vysoké antioxidační účinky flavonolových glykosidů se předpokládá, že flavonoly jen málo přispívají k redukční síle chmele a mladiny. Kumarinové deriváty jsou

přítomny ve chmelu, ječmenu i sladu. Vyskytují se jako volné aglykony nebo glykosidy, obvykle β -D-glykosidy se strukturou odvozenou od laktonů o-hydroxykyselin, zejména o-hydroxyskořicové kyseliny, resp. kumarinu.

Chinony a ubichinony přecházejí do piva z ječmene a sladu jako minoritní složky a jsou spojeny s oxidoredukčními přeměnami. Deriváty kyseliny chlorogenové, kávové a p-hydroxybenzoové tvoří bohatou skupinu aromatických hydroxy- a methoxykyselin. Snadno podléhají kondenzačním reakcím, oxidačním přeměnám na chinony, které se napojují na chemismus hnědnutí mladiny. Aromatické kyseliny a stejné produkty testinových kyselin představovaných hlavně kyselinou vanilínovou, syringovou, ferulovou, sinapovou, které se vyskytují v klíčcích sladového ječmene i chmele.

Do této skupiny polyfenolicých látek patří i cukerné estery kyseliny gallové, častěji m-digallové a deriváty kyseliny ellagové, která je produktem oxidace kyseliny gallové.

Z výše uvedeného přehledu je patrná široká diverzifikace polyfenolických složek přecházejících do piva během pivovarského procesu v nepozměněné, ale častěji v pozměněné formě. Proces se stává složitější tím, že chmel se zpracovává ve formě chmelových výrobků, pelet, extraktů, hydrogenovaných a isomerovaných preparátů, při jejichž výrobě dochází ke změnám složení polyfenolických látek.

2.3.2 Reakce přírodních polyfenolů a jejich změny v průběhu technologie⁴

V pivu je přítomna široká škála polyfenolických látek. Volné aromatické kyseliny jsou látky o nižší molekulové hmotnosti a v pivovarském procesu se uplatňují v menší míře, na rozdíl od složitějších flavonoidů představovaných především flavanoly a flavonoly.

Polyfenolické látky uplatňující se v pivovarském procesu lze rozdělit do dvou skupin. První velká skupina zahrnuje fenolické kyseliny a deriváty kyseliny benzoové (para-, ortho-) a deriváty kyseliny skořicové. Do první podskupiny patří kyselina salicylová, gentisová, p-hydroxybenzoová, protokatechová, gallová, vanilinová a syringová. Do druhé podskupiny patří kyselina p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Druhou velkou skupinou jsou flavonoidy, které se dále dělí na flavany (flavanoly a prokyanidiny), anthokyany a flavonoly. V průběhu pivovarské technologie dochází k množství chemických přeměn polyfenolických složek pocházejících ze surovin, hlavně v průběhu chmelovaru, kvašení, filtrace, stabilizace koloidních vlastností piva a v průběhu stárnutí piva, které se projevuje snížením sensorických vlastností. Jde o reakce hydrolytické, isomerační, kondenzační, polymerační a oxidoredukční. Hydrolytické reakce vedou ke

štěpení glykosidů na aglykon a sacharidovou část, významně se na kvalitě hotového piva nepodílejí. Z isomeračních reakcí je nejdůležitější přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol během chmelovaru (obr. 8, kap.2.3.1).

Kondenzační a polymerační reakce poskytují výšemolekulární celky s vysokou srážecí aktivitou, které se snadno sráží s bílkovinami a mohou tvořit koloidní zákal. Stabilizační postupy jsou založeny na adsorpci zákalotvorných prekurzorů na inertní filtrační materiály. Zatím nevyřešeným problémem zůstává otázka sensorické stability piva, která přímo souvisí s oxidačně-redukčními procesy probíhajícími v pivu po naplnění do konzumního obalu. Procesy v něm probíhající jsou označovány za stárnutí piva a důležitou roli při tom hrají polyfenolické složky. Tvorba volných radikálů způsobujících autooxidaci polynenasycených lipidických složek extraktu piva je iniciována působením světla, tepla, kovových iontů, mechanického pohybu a dalších faktorů. Tímto vznikají těkavé karbonylové sloučeniny odpovědné za nepříznivé chuťové vlastnosti. Karbonylové sloučeniny mohou vznikat různými mechanismy. Antioxidanty pak působí jako „lapače“ volných radikálů a kyslíku, též jako maskovací činidlo v důsledku tvorby chelátů s kovovými ionty. Polyfenoly, zejména flavonoidy jsou považovány za nejúčinnější přirozené antioxidanty piva. Ovlivnění chuťové stability polyfenolickými látkami závisí na absolutní i relativní koncentraci dihydroxy- a trihydroxy- flavonoidů v pivu. Byla zjištěna závislost mezi antioxidačními vlastnostmi sladu, resp. sladiny na skladbě a obsahu polyfenolických látek. Antioxidační účinnost je závislá na odrůdě ječmene a technologii sladování.

Stárnutí piva je jedním z klíčových problémů pivovarského výzkumu a technologie. V dnešní době se uznává platnost radikálové teorie, podle které mohou za stárnutí piva radikály organických a anorganických sloučenin, které podporují průběh radikálových procesů. Zvláštní význam mají sloučeniny kyslíku a jeho excitované stavy. Polyfenolické složky piva mají silné antioxidační účinky. Jsou schopny likvidovat hydroxylové radikály vzniklé při fotolýze peroxidu vodíku, reagují s O^{2-} , 1O_2 a peroxyradikály, včetně terminace řetězové reakce během autooxidace mastných kyselin. Aktivita flavonoidů klesá v pořadí myricetin > kvercetin > rhamnetin > naringenin > katechin > 5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon > kempferol > flavon. Aktivita vzrůstá s počtem hydroxylových skupin substituovaných na aromatickém kruhu B. Přítomnost hydroxyly na C-3 a jeho glykosylace dále nezvyšuje „pohlcovací“ schopnost.

2.3.3 Výroba piva

Pro výrobu piva se používají následující ingredience: voda, obiloviny, chmel, koření a pivovarské kvasnice. Voda jako základní surovina významně ovlivňuje kvalitu produktu, proto je sledována její tvrdost, obsah minerálů a solí. Pro výrobu českých piv se používá převážně voda měkká až středně tvrdá. Z obilovin je nejtypičtěji používán ječmen, v menší míře pšenice, či spíše její směsi, přídavky rýže, kukuřice aj. Chmel, nezbytná surovina, která dodává pivu charakteristické aroma a lehce nahořklou chuť, má mimo jiné i dobré konzervační účinky. Další zásadní surovinou jsou pivovarské kvasnice, jejichž speciálně vyšlechtěné kmeny jsou střeženy jako výrobní tajemství. Koření (zázvor, koriandr aj.) je při výrobě českého piva používáno jen výjimečně.

Výroba piva¹⁷ se skládá ze dvou kroků, jedná se o sladování a samotnou výrobu piva. Přečištěný a roztříděný ječmen je máčen, aby došlo ke zvýšení obsahu vláhy v obilce a mohlo začít klíčení, během kterého se aktivují enzymy důležité pro správné štěpení látek. Následuje hvozdnění (sušení) za účelem snížení obsahu vláhy v obilce bez poškození enzymů a přitom dojde k vytvoření charakteristického aroma a barvy – typické znaky pro daný typ sladu. Před samotným vařením piva je několik týdnů uskladněný slad namlet. Během vaření piva (mladiny) za pomoci vody, sladu a chmele dochází k vystírání (smíchání sladového šrotu s vodou a aktivaci přírodních enzymů), rmutování, což je proces, při kterém se složitější cukry mění na cukry jednoduché (zkvasitelné). Po scezení směsi tj. oddělení sladového výluhu od mláta, je získaná sladina podrobena chmelovaru. Chmelovar je proces, při němž je vařena sladina s chmelem za vzniku hořké mladiny. Následuje proces oddělení kalů a chlazení mladiny, propagace kvasnic. Přidáním pivovarských kvasnic k mladině začne hlavní kvašení při teplotě 5-12°C po dobu 7-10 dnů. Typické pro české pivo je použití spodního kvašení tj. na konci kvašení se kvasinky usazují na dno kádě. Dokvašování (zrání a ležení piva) probíhá v uzavřených tancích při 1-2°C. Za mírného přetlaku dochází k sycení oxidem uhličitým, doba zrání je cca 1 měsíc. Následuje filtrace, stáčení a balení výrobku.

2.3.4 Druhy piva¹⁸

Původní členění piv podobně jako dnes vycházelo ze stupňovitosti (koncentrace) původní mladiny, která se určovala výpočtem z obsahu alkoholu a skutečného extraktu a udávala se v hmotnostních procentech (% hm.). Podle toho se piva dělila na výčepní (do 10% hm.), ležáky (11 - 12,5% hm.) a piva speciální (nad 12,5% hm.). Se stupňovitostí piva souvisel i obsah alkoholu, udávaný v objemových procentech (% obj.). Tak např. 8% piva

mávala přibližně 2% obj. alkoholu, 10% výčepní piva okolo 3% obj. alkoholu a 12% ležáky 3,5 - 4% obj. alkoholu, ale někdy i více.

Toto rozdělení piv bylo v roce 1997 nahrazeno novým, zvyklostem Evropské unie lépe vyhovujícím, dělením piv podle barvy na čtyři skupiny a podle extraktu původní mladiny před zakvašením (EPM; blíže přílohy č. 1 a 2 vyhlášky č. 468/2003 Sb. zákona č. 156/2003 Sb.), obsahu alkoholu či způsobu konečné úpravy na 11 podskupin (§ 12 oddílu 3 vyhlášky č. 335/1997 Sb. zákona č. 111/1997 Sb.): skupiny piv, světlá, tmavá, polotmavá a řezaná a dále podskupiny piv: ležáky, výčepní, speciální, portery, pšeničná, kvasnicová, nealkoholická, bylinná, lehká, se sníženým obsahem alkoholu, se sníženým obsahem cukrů. Tento způsob členění byl v roce 2000 mírně pozměněn (§11 a §12 oddílu 3 vyhlášky 45/2000 Sb. zákona č. 16/2000 Sb.) a v této podobě platí dodnes.

Skupiny piv:

- světlá – piva vyrobená převážně ze světlých sladů
- polotmavá – piva vyrobená z tmavých sladů, sladů karamelových, případně z barevných sladů ve směsi se světlými slady
- tmavá – viz. polotmavá piva
- řezaná – piva vyrobená při stáčení smíšením světlých a tmavých piv stejné skupiny

Podskupiny piv:

- lehká - piva vyrobená převážně z ječných sladů, do 7 % hm. EPM, obsah využitelné energie max. 1300 kJ/l (na etiketě musí být uveden i obsah sacharidů, tuků a bílkovin a energetická hodnota musí být označena nejen v kJ/l, ale též v kcal/l)
- výčepní - piva vyrobená převážně z ječných sladů, 8 až 10% hm. EPM
- ležáky - piva vyrobená převážně z ječných sladů, 11 až 12% hm. EPM
- speciální - piva vyrobená převážně z ječných sladů, 13 a více% hm. EPM
- portery - tmavá piva vyrobené převážně z ječných sladů, 18 a více% hm. EPM
- se sníženým obsahem alkoholu - piva s obsahem alkoholu nejvýše 1% hm.
- se sníženým obsahem cukrů - hluboce prokvašená piva s obsahem alkoholu do 0,75 g/100 ml a bílkovin do 0,4 g/100 ml
- pšeničná - piva vyrobená s podílem extraktu z použitého pšeničného sladu vyšším než jedna třetina hmotnosti celkově dodaného extraktu

- kvasnicová - piva vyrobená dodatečným přidávkem podílu rozkvašené mladiny do hotového piva v průběhu stáčení (Pozn.: Tímto se liší od tzv. nefiltrovaných piv, do kterých žádné kvasnice přidávány nejsou. Kvasnice jsou v nich přítomny pouze ve formě neodfiltrovaného zbytku po kvašení.)
- nealkoholická - piva s obsahem alkoholu nejvýše 0,5% obj. (0,4% hm.)
- ochucená - s přidávkem látek určených k aromatizaci (bylin nebo bylinných výluhů, ovocného koncentrátu, přírodního aroma, medu aj.), potravních doplňků popř. lihovin nebo jiných alkoholických nápojů (s obsahem alkoholu od 1,2 do 15% obj. alkoholu, kromě vína a burčáku). Podíl lihovin a jiných alkoholických nápojů nesmí překročit 10% obj.

Podle způsobu kvašení je možno dále dělit piva na svrchně nebo spodně kvašená. Zatímco svrchní kvašení probíhá při 15-20°C a s využitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* popř. spontánní mikroflóry mléčných nebo octových bakterií, spodní kvašení probíhá při teplotách nižších (8-14°C) a s použitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum* (*carlsbergensis*):

Svrchně kvašená piva:

- Ale – středně silné až silné, hluboce prokvašené pivo s vyšší hořkostí a celou škálou barev. Existuje celá řada piv, která se podle barvy, hořkosti a chuti dělí do skupin Pala ale, India ale, Bitter, Mild ale, Scotch ale atd. Často má výrazný ovocný akcent.
- Pšeničné – (Weizenbier, Weissbier) – středně silné, převážně vyráběné s použitím pšeničného sladu. Vyznačuje se menší hořkostí, vysokým nasycením CO₂ a výrazným aroma po banánu. Vyrábí se v mnoha chuťových i druhových variantách, jak kvasnicové, tak filtrované.
- Stout - velmi tmavé až černé, silně hořké, hluboce prokvašené, ale různě silné pivo. Podíl barvicích sladů činí až 20% a často se při výrobě přidává karamelový cukr. Vyznačuje se kompaktní a trvanlivou pěnou.
- Porter - velmi tmavé, hluboce prokvašené, hořké pivo s vysokým obsahem alkoholu. Občas se při výrobě porterů používají kvasinky rodu *Brettanomyces* pro sekundární dokvašování, které dávají porteru výraznou ovocnou chuť.

- Trappist - vyznačuje se tmavě měděnou až tmavou barvou, vysokou hořkostí, ovocnou, slabě nakyslou chutí a vůní a obsahem alkoholu.

Spodně kvašená piva:

- Pils- převážně světlé pivo, chuťově plné, s výraznou jemnou až mírně drsnou hořkostí. Vyrábí se v mnoha variantách a jehož nejznámějším představitelem je Plzeňský Prazdroj, podle kterého je tento druh piva také pojmenován.
- Bock - velmi silné světlé nebo tmavé pivo se sladko-hořkou chutí.
- Märzen - silnější jantarově zbarvené pivo s výraznější plnou chutí a různou hořkostí. Někdy se používá přídavek nakouřeného sladu.
- Piva bavorského typu - vyrábějí se z mnichovských sladů s přísadou barvicích sladů ve dvou odstínech - tmavě rubínové a tmavohnědé. Vyznačují se vysokým podílem extraktu, výraznou chmelovou hořkostí a hustou, trvalou pěnou. Jsou to silná piva, plné sladovo-chmelové chuti.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Měření antioxidační aktivity bylo provedeno na UV spektrofotometru Biochrom Libra S22. Standardy a vzorky byly připraveny pomocí mikropipet Biohit – Proline s nastavitelným objemem 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l, 1 – 5 ml. Dále byly použity digitální váhy Kern 870 (Kern, Německo). Pro kontrolu pH byl používán pH – metr Orion.

3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

3.2.1 Rozpouštědla

Pro přípravu standardů a vzorků byl použit methanol (Sigma Aldrich, Německo) a deionizovaná voda upravená na čistícím zařízení Demiwa 5-ROI (Watek, Ledec nad Sázavou) a SG Ultra Clear (SG, Německo).

3.2.2 Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity byla použita ABTS diamonná sůl (Sigma Aldrich, Německo) a peroxodisíran draselný p.a. (Lachema, Neratovice) pro metodu ABTS, pro metodu DPPH byl použit syntetický radikál DPPH (Sigma Aldrich, Německo). Chlorid železitý p.a. (Lachema, Neratovice), HCl 35% (Lachema, Neratovice) a TPTZ (Fluka, Německo) byl použit pro metodu FRAP. Pro porovnání výsledků byl použit standard Trolox (Fluka, Německo).

3.2.3 Vzorky pív

Studované vzorky pív byly zakoupeny v místní obchodní síti.

Tabulka 1: Studované vzorky pív

Název piva	Označení	Druh piva
Hoegaarden White	P1	Světlé pšeničné
Sváteční ležák Bernard	P2	Světlý ležák
Stella Artois	P3	Světlý ležák
Bernard	P4	Světlý ležák
Bernard	P5	Světlé výčepní
Bernard	P6	Tmavé speciální

Hoegaarden White

Světlé speciální ochucené svrchně kvašené pšeničné pivo, dokvašované v lahvi, s obsahem alkoholu 4,9 %, sladce nakyslá a zároveň kořeněná chuť. Výroba je bez filtrace, přirozeným dokvašováním v sudech a lahvích. Velmi osvěžující pivo s jemnou hořkostí, rozeznatelnou chutí koriandru a náznakem pomeranče¹⁹.

Sváteční ležák Bernard

Ležák obohacený kulturními kvasinkami. Je to pivo šampaňského typu, jehož dokvašování probíhá přímo v lahvích. Vyniká výrazným řízem, jemnou kvasinkovou chutí a vůní. Je zdrojem vitaminů skupiny B, enzymů, stopových prvků a biokatalyzátorů. Na dně lahví se nachází kvasinková sedlina, takže pivo je při konzumaci lehce zakaleno. Extrakt cca 12 % - alkohol 5,0 % obj., doba zrání: hlavní kvašení 7-10 dní, ležácký sklep 30 dní²⁰.

Stella Artois

Stella Artois je elegantní, kultivovaný ležák vařený z nejlepších surovin a s obsahem alkoholu 5,2% obj. Ležák s charakteristickou chutí, řízem a příjemnou hořkostí, jež ho odlišuje od ostatních ležáků na světovém trhu²¹.

Světlý ležák Bernard – jedenáctka

Nepasterizovaný tradiční český ležák s chutí vyvážené hořkosti v harmonii s lahodnou plností, chmelovou vůní a s bohatou pěnou. Alkohol: 4.5% obj.²⁰.

Světlé výčepní Bernard – desítka

Nepasterizované světlé pivo s intenzivní hořkostí, výrazným řízem, s chmelovou vůní a s bohatou pěnou. Alkohol: 3.8% obj.²⁰.

Tmavé speciální Bernard

Speciální 13° tmavé pivo s přísadou jemných kulturních kvasinek. Jedná se o speciální tmavý ležák vyráběný z pěti druhů sladu, s výraznou plnou chutí s jemnou hořkostí. Pro svoji výraznou chuťovou odlišnost je ojedinělý na českém pivním trhu. Extrakt 13 % - alkohol 5,1 % obj., doba zrání: hlavní kvašení 7-10 dní, ležácký sklep 40 dní, dokvašováno v lahvích²⁰.

3.3 PRACOVNÍ POSTUP – ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

3.3.1 Příprava standardů a vzorků

Standard Trolox byl rozpuštěn v methanolu a z tohoto zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada obsahující 0,005 – 0,05 μmol Troloxu pro metodu ABTS, 0,01 - 0,08 μmol Troloxu pro metodu DPPH a 0,02 – 0,1 μmol Troloxu pro metodu FRAP (vše absolutní množství v nadávkovaném objemu). Vzorky piv byly odplyněny a analyzovány bez dalších úprav. Pipetované množství k analýze bylo 25 μl pro metodu ABTS a FRAP a 100 μl pro metodu DPPH.

3.3.2 Metoda ABTS

Radikál kation ABTS byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem draselným. Tableta ABTS diamonné soli byla rozpuštěna v destilované vodě ($c = 3,5 \text{ mmol/l}$) a poté byl přidán roztok $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($c = 0,06 \text{ mol/l}$) v poměru 50 : 1. Roztok byl ponechán 12 – 16 hodin reagovat za nepřístupu světla při laboratorní teplotě. Takto vzniklý roztok byl smíchán s čerstvě připraveným octanovým pufrům o pH 4,3 v poměru 39:1 (pufr : ABTS). Ke 2 ml této reakční směsi bylo přidáno 25 μl vzorku a vše bylo důkladně promícháno. Roztok byl ponechán reagovat po dobu 30 minut a poté byl změřen úbytek absorbance A při vlnové délce $\lambda = 734 \text{ nm}$. Původně zelený roztok se odbarvil na světle zelený až čirý. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

3.3.3 Metoda DPPH

Ze zásobního roztoku DPPH ($c = 0,2 \text{ mol/l}$) v methanolu byl připraven pracovní roztok o koncentraci $c = 100 \mu\text{mol/l}$ obsahující octanový pufr o pH 4,3 v poměru 1 : 2 (DPPH : pufr). K analýze bylo pipetováno 1,9 ml pracovní směsi a 100 μl vzorku. Úbytek absorbance byl měřen při vlnové délce $\lambda = 515 \text{ nm}$ v intervalech 30 s po dobu 10 minut v případě studie rychlosti průběhu reakce a pro zjištění celkové antioxidační aktivity byl měřen úbytek absorbance po 30 minutách. Původně fialový roztok se odbarvil na světle fialový až čirý. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

3.3.4 Metoda FRAP

Jedná se o metodu, kdy se pracuje ve vodném prostředí. Reakční směs byla připravena smícháním roztoků chloridu železitého ($c = 20 \text{ mmol/l}$), TPTZ s přídatkem kyseliny

chlorovodíkové ($c = 10 \text{ mmol/l}$) a octanového pufru o pH 3,6 v poměru 1 : 1 : 10 (FeCl_3 : TPTZ : pufr). Ke 2 ml reakční směsi bylo pipetováno 25 μl vzorku. V tomto případě byl měřen, na rozdíl od předchozích metod, nárůst absorbance při vlnové délce $\lambda = 593 \text{ nm}$ 10 minut od začátku reakce. Nárůst absorbance byl přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Pro měření byly použity tři dříve optimalizované metody²².

4.1.1 Metoda ABTS

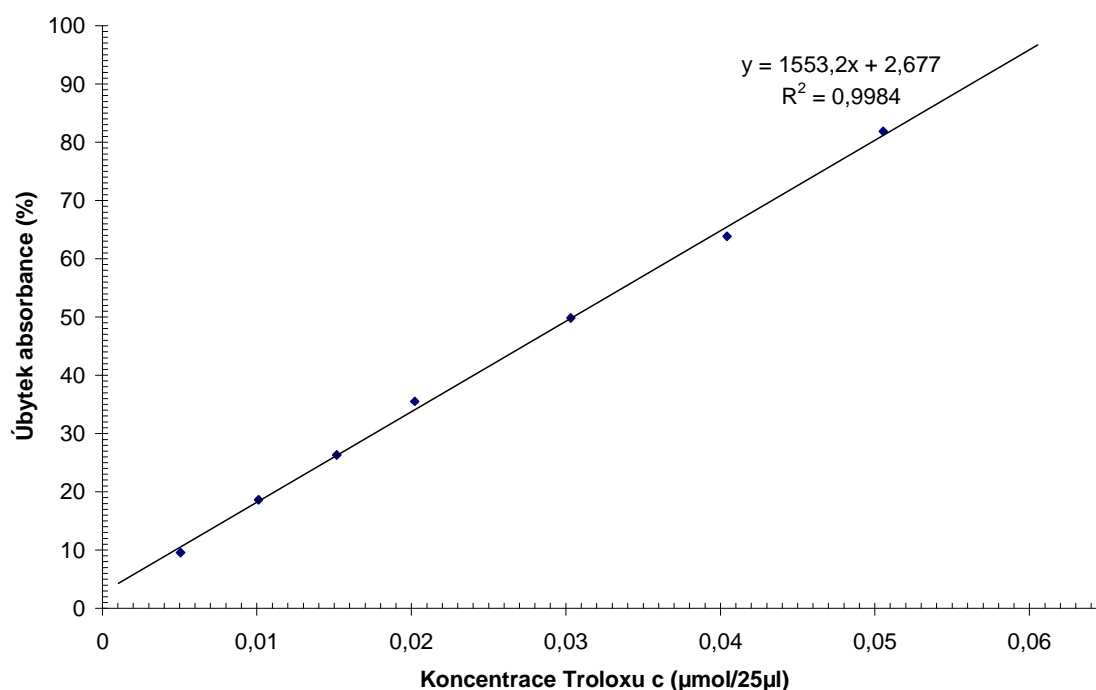
Radikál kation byl generován reakcí ABTS diamonné soli a peroxidisíranu draselného podle postupu popsaného v experimentální části (kapitola 3.3.2).

Zjištěná závislost úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu je znázorněna na obr. 11.

Úbytek absorbance A byl vypočten podle vzorce (1):

$$\text{úbytek } A (\%) = \frac{A - A_0}{A} \cdot 100 \quad (1)$$

kde A je absorbance v čase $t = 30$ minut od začátku reakce, A_0 je počáteční absorbance v čase $t = 0$.



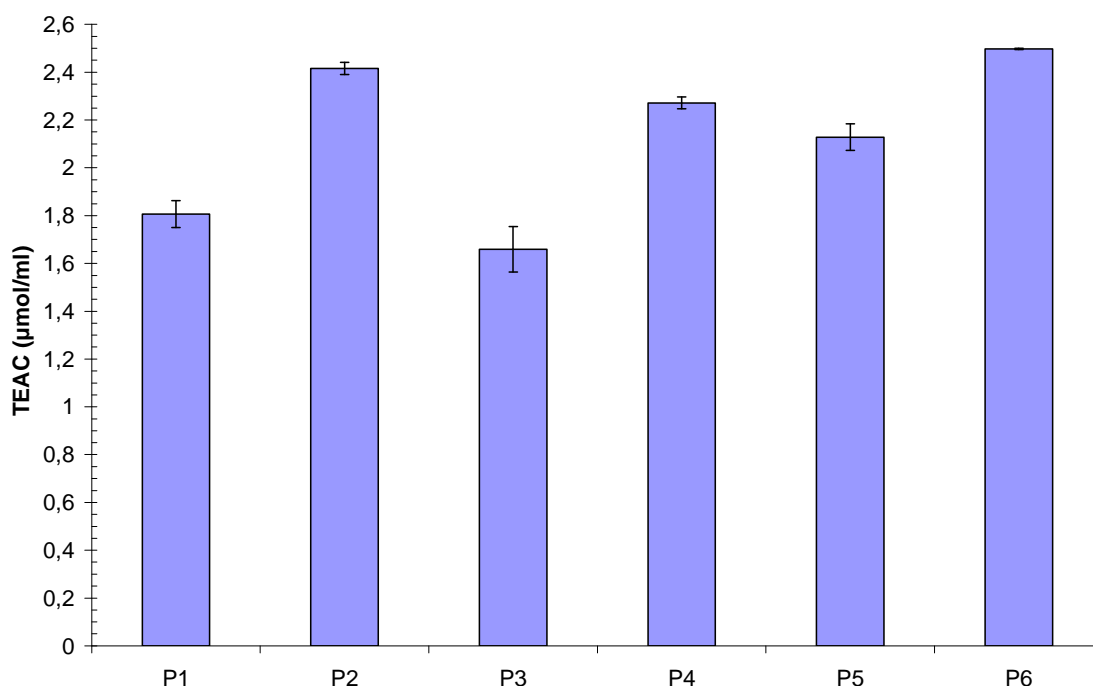
Obr. 11 - Závislost úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu – metoda ABTS

Měření antioxidační aktivity piva

Bylo proměřeno celkem 6 vzorků piv (tabulka 1, kap. 3.2.3).

Úbytek absorbance studovaných piv byl pomocí rovnice regrese kalibrační křivky závislosti úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

U každého vzorku bylo provedeno celkem pět měření a vypočtena průměrná hodnota TEAC, která byla vztažena na 1 ml piva. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2 (kap.4.1.4) a grafické znázornění na obr. 12. Z obrázku je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu má tmavé speciální pivo Bernard 13° (P6) a ze světlých piv, 12° ležák Bernard (P2), další zástupci této značky vykazují aktivitu přibližně shodnou. Naopak nejnižší aktivitu vykazuje světlý ležák Stella Artois (P3). Rozdílnou míru antioxidační aktivity lze vysvětlit tím, že jednotlivé druhy piv mají jako výchozí surovinu jiný druh chmelu a sladu. Též i technologické zpracování je odlišné jak u jednotlivých pivovarů, tak i druhů piv. K nejmarkantnějšímu znehodnocování zdraví prospěšných látek dochází při tepelné pasterizaci piva.



Obr. 12 - Antioxidační aktivita studovaných piv – metoda ABTS

4.1.2 Metoda DPPH

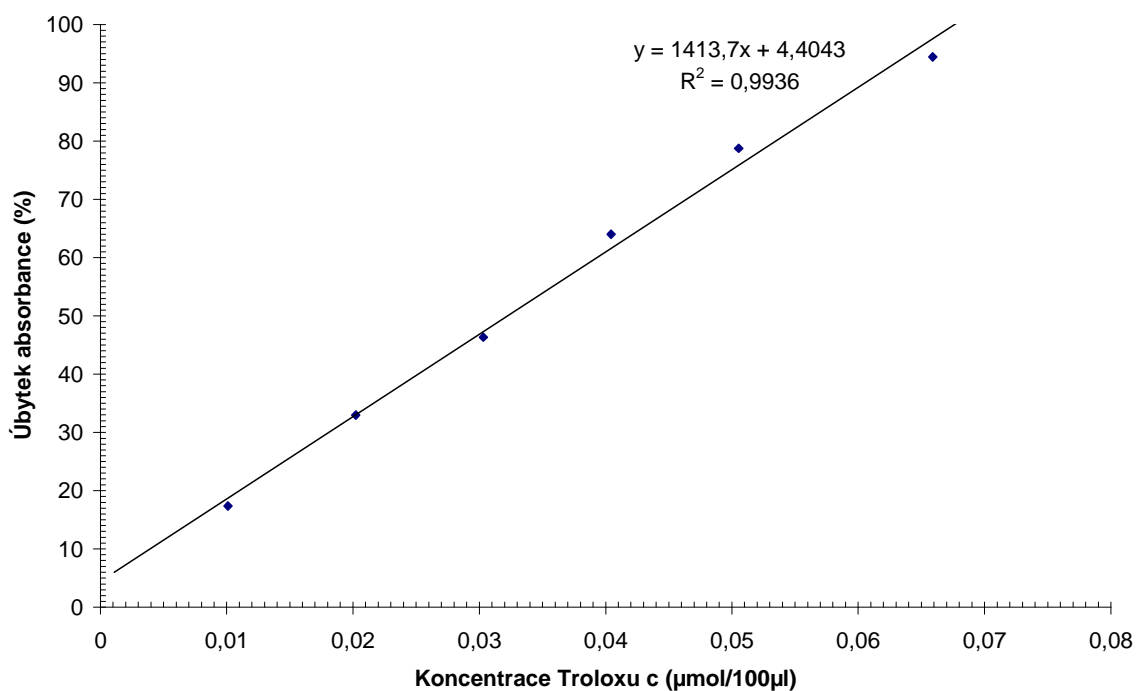
Postup přípravy reakčního činidla je uveden v experimentální části (kap. 3.3.3). Proměřovaný objem byl 1,9 ml roztoku DPPH a 100μl vzorku piva, nebo Troloxu. Úbytek absorbance byl vypočten podle vztahu (1). Úbytek absorbance byl pomocí rovnice regrese kalibračního grafu závislosti úbytku absorbance na množství Troloxu (obr. 13) přepočten

na ekvivalentní množství Troloxu a konečná hodnota byla vztažena na 1ml vzorku piva. Dále byl studován kinetický průběh reakce každých 30 s po dobu 10 minut od začátku reakce.

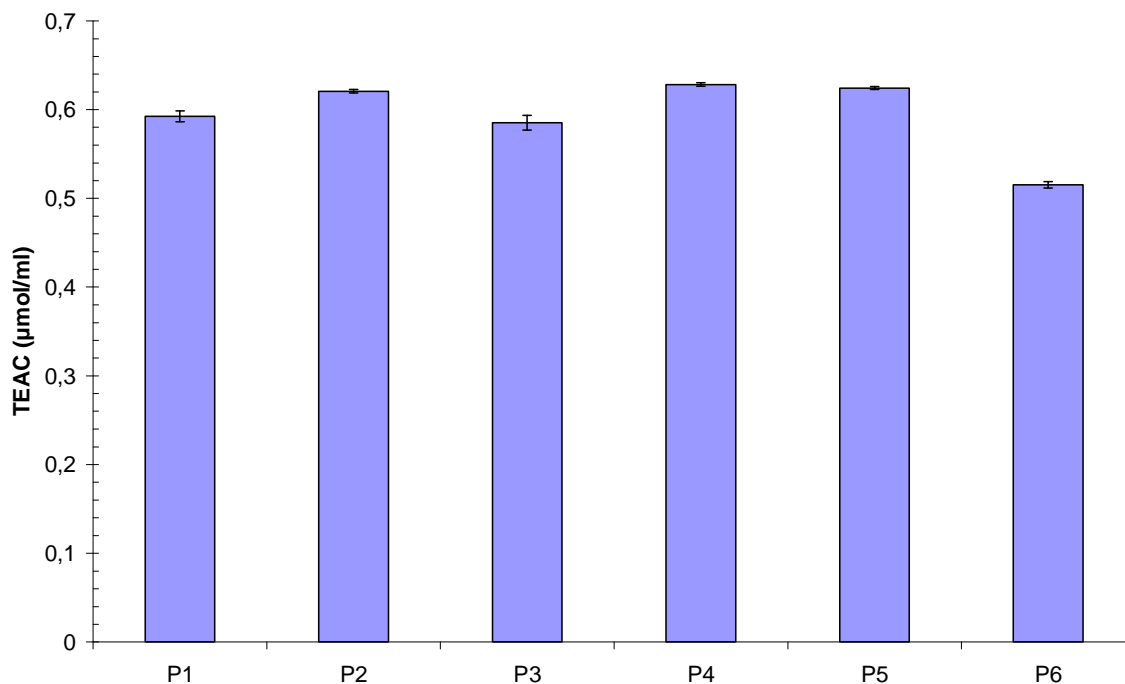
Měření antioxidační aktivity piva

Bylo proměřeno 6 vzorků piva a u každého vzorku bylo provedeno měření celkové antioxidační aktivity v čase $t = 30$ min a kinetický průběh reakce, který byl měřen po 30 s po dobu $t = 10$ min.

U každého vzorku bylo provedeno celkem pět měření a vypočtena průměrná hodnota TEAC, která byla vztažena na 1 ml piva. Grafické znázornění je na obr. 14. Z obrázku jsou patrné vyrovnané úbytky A světlých piv, úbytek A tmavého piva je nižší. Průměrné hodnoty naměřené v čase $t = 30$ min jsou uvedeny v příloze v tabulce 2 (kap. 4.1.4).



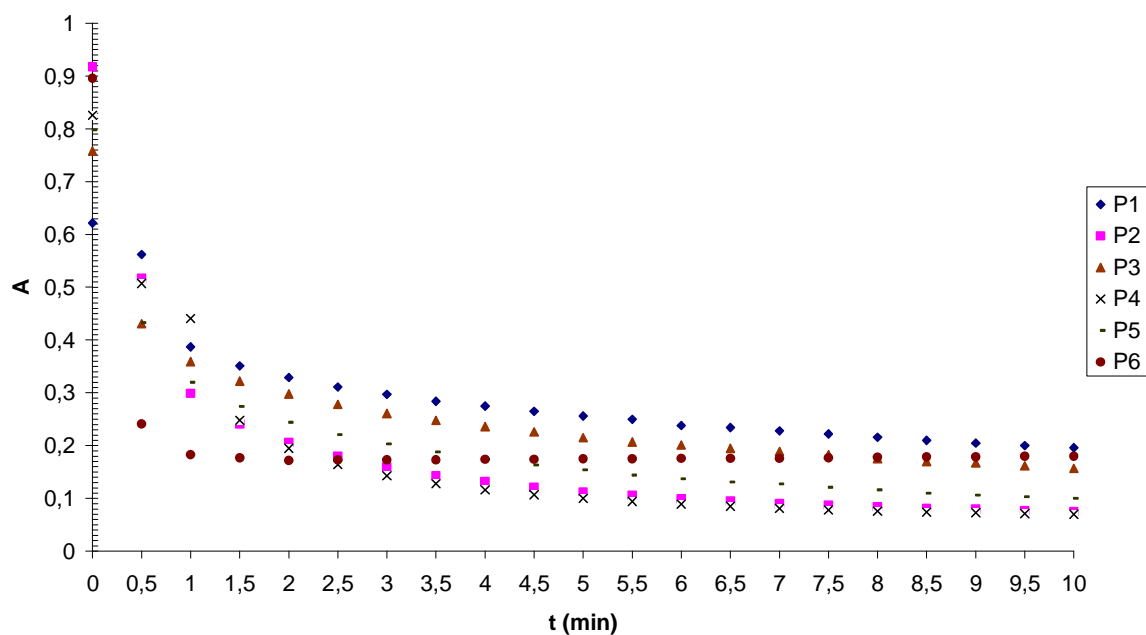
Obr. 13 - Závislost úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu – metoda DPPH



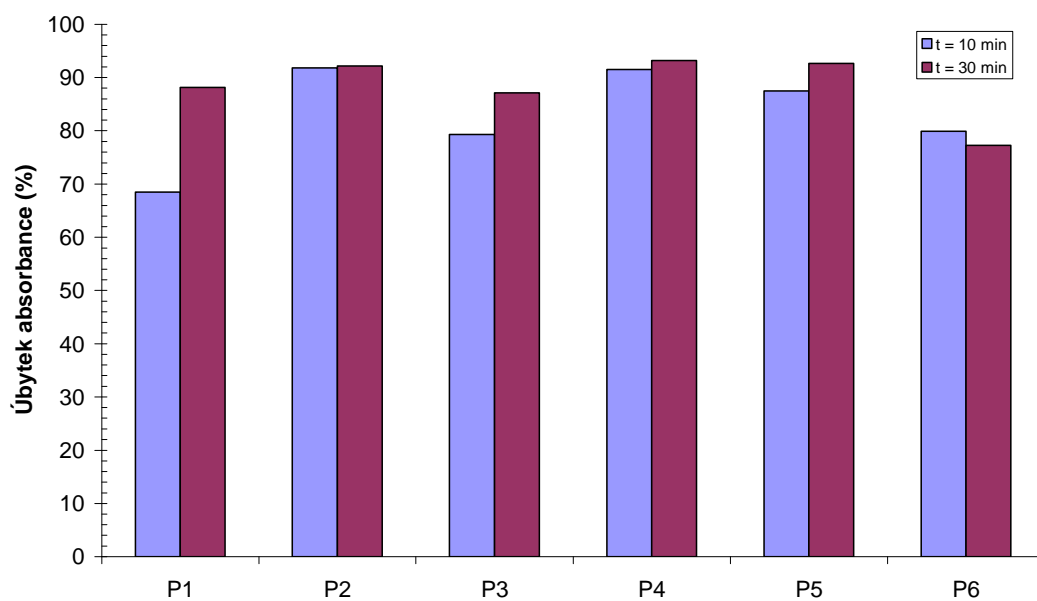
Obr. 14 - Antioxidační aktivita studovaných piv v čase $t = 30$ min – metoda DPPH

Kinetický průběh chemické reakce jednotlivých piv je znázorněn na obr. 15. Z grafického průběhu je zřejmý prudký pokles absorbance všech piv, kromě piva světlého pšeničného (P1), jehož pokles je průběžný. Dále pivo tmavé (P6) vykazuje po prudkém poklesu ze začátku reakce téměř konstantní průběh až do 10. minuty reakce. Ostatní světlá piva vykazují po prudkém poklesu na začátku reakce dále pozvolný pokles.

Dále bylo provedeno porovnání poklesu absorbance v čase $t = 10$ min a $t = 30$ min (obr. 16), kdy nejvýraznější rozdíl (přibližně 20%) byl zjištěn u světlého pšeničného piva (P1), u ostatních světlých piv (P2 – P5) je pokles absorbance po 10. minutě reakce v řádu jednotek.



Obr. 15 - Závislost úbytku absorbance A na čase t – metoda DPPH



Obr. 16 - Antioxidační aktivita studovaných piv – metoda DPPH, porovnání hodnot v čase t = 10 min a t = 30 min od začátku reakce

4.1.3 Metoda FRAP

Metoda FRAP měří redukční vlastnosti látek, které jsou mírou antioxidační aktivity, ale s celkovou antioxidační aktivitou nemusí souhlasit.

Reakční činidlo bylo připraveno dle postupu uvedeného v experimentální části (kap. 3.3.4). Proměřovaný objem byl 2 ml reakční směsi a 25 µl vzorku piva, nebo Troloxu.

Na rozdíl od předchozích metod, zde dochází k nárůstu absorbance. Rozdíl nárůstu absorbance před a po skončení reakce se vypočte dle vztahu (2):

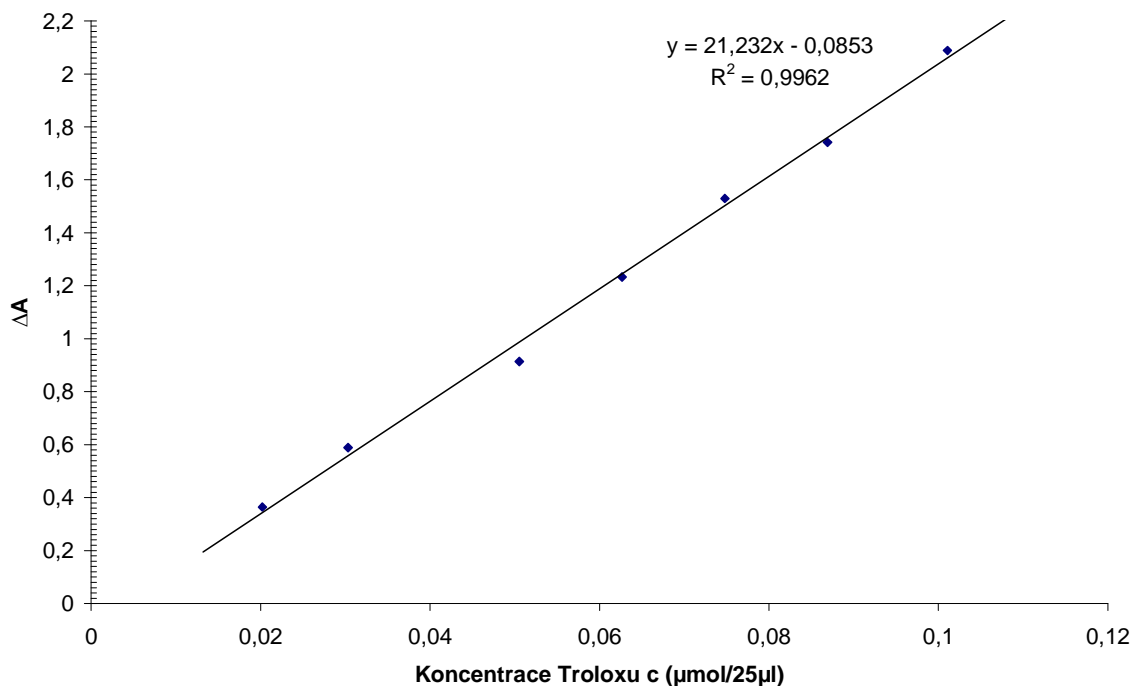
$$\Delta A = A - A_0 \quad (2)$$

kde A je absorbance na konci reakce tj. v čase $t = 10$ min a A_0 je absorbance na počátku reakce, tj. $t = 0$ min.

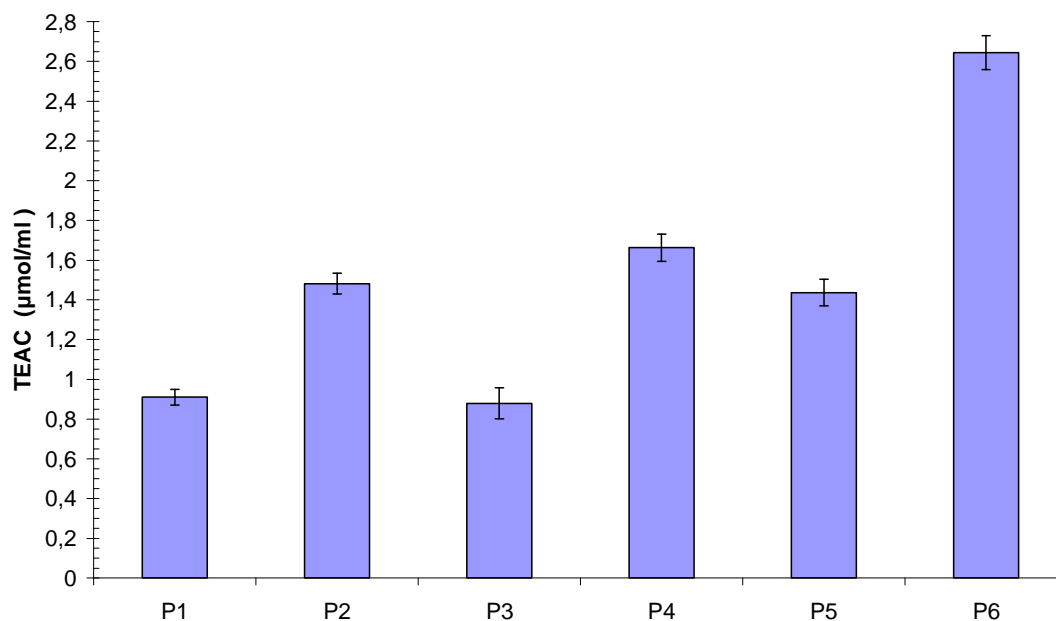
Změna absorbance jednotlivých vzorků byla pomocí regresní přímky kalibračního grafu (obr. 17) přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu a poté byla konečná hodnota vztažena na 1 ml vzorku piva. Takto získané hodnoty lze porovnávat s ostatními výše popsanými metodami.

Měření antioxidační aktivity piva

Jako v předchozích metodách bylo proměřeno 6 vzorků piv a u každého vzorku bylo provedeno 5 experimentů a vypočtena hodnota TEAC, která udává látkové množství TROLOXu na 1 ml piva. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v příloze v tabulce 2 (kap. 4.1.4) a grafické znázornění je na obr. 18. Z obrázku je zřejmé, že tmavé pivo (P6) má výrazně vyšší redukční vlastnosti oproti pivům světlým, z nichž výrazně nižší hodnoty vykazuje pivo světlé pšeničné (P1) a světlý ležák (P3), zástupci světlých piv Bernard (P2, P4, P5) vykazují přibližně stejné hodnoty.



Obr. 17 - Závislost změny absorbance A na množství Troloxu - metoda FRAP



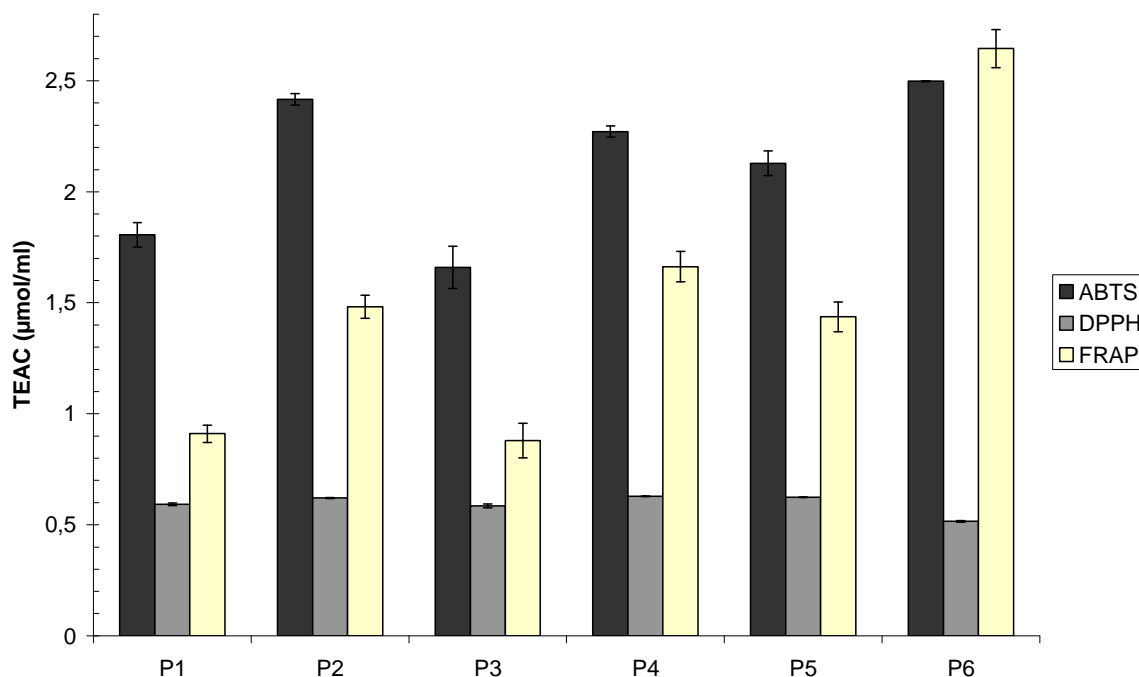
Obr. 18 - Antioxidační aktivita studovaných piv – metoda FRAP

4.1.4 Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity

Pro porovnání jednotlivých metod byly získané hodnoty TEAC vyneseny do jednoho grafu (obr. 19). Jelikož každá z těchto metod používá různé činidlo, které reaguje

s jinak širokým okruhem látek různými mechanismy, není možné získané výsledky mezi sebou porovnávat. Lze však danou metodou hodnotit látky stejné povahy.

Nejvyšší hodnoty poskytuje metoda ABTS, protože její radikál kation $ABTS^{*+}$ reaguje s lipofilními i hydrofilními antioxidanty, avšak reakce s donory vodíkových atomů je málo selektivní. DPPH \cdot radikál reaguje pouze s donory atomu vodíku a tím se redukuje, proto poskytuje nejnižší hodnoty TEAC. Jedná se o nepřímou metodu, jejíž výsledky jsou antioxidačnímu potenciálu úměrné. Metodou FRAP se zjišťují redukční vlastnosti látek, které však nemusí antioxidační kapacitě odpovídat. U světlých piv je TEAC hodnota mnohem nižší v porovnání s metodou ABTS, ale u piva tmavého jsou přibližně na stejné úrovni.



Obr. 19 – Antioxidační aktivita studovaných piv – metoda ABTS, DPPH, FRAP

Tabulka 2: Průměrné hodnoty TEAC vzorků piv, metoda ABTS, DPPH a FRAP

označení	druh	TEAC ($\mu\text{mol/ml}$)		
		ABTS	DPPH	FRAP
P1	Světlé pšeničné	1,806	0,592	0,910
P2	Světlý ležák	2,416	0,621	1,482
P3	Světlý ležák	1,659	0,585	0,880
P4	Světlý ležák	2,271	0,628	1,663
P5	Světlé výčepní	2,128	0,624	1,437
P6	Tmavé speciální	2,497	0,515	2,645

5 LITERATURA

1. http://kfrserver.natur.cuni.cz/kfrserver/studium/prednysky/biochemie/Biochemie_4.pdf, 30.5.2008.
2. Negroao M. R., Kratiny E., Faria A., Azevedo I., Martins J. M.: *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 4982-4988.
3. Karabin M., Dostálek P., Hofta P.: *Chem. Listy*, **2006**, 100, 184-189.
4. Čepička J., Karabin M.: *Chem. Listy*, **2002**, 96, 90-95.
5. <http://chmelar.hajsl.cz/biologie.php> - chmelové stránky, 2.6.2008.
6. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K615.php>, 2.6.2008.
7. <http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>, Trna J., Táborská E.: Přírodní polyfenolicé antioxidanty, 30.5.2008.
8. Jirkovský D.: Vysokoučinné separační techniky v analýze fyziologicky významných látek, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, **2007**, Olomouc.
9. Zloch Z.: *Vojenské Zdravotnické Listy*, **2003**, 72, 226-229.
10. Parkányiová J., Parkányiová L., Pokorný J.: Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů, VŠCHT Praha.
11. Araki S., Komára T., Shimizu C., Furusho S., Takashio M., Shinotsuka K.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1997**, 57, 34-37.
12. Goupy P., Divour C., Loonis M., Dangles O.: *J. Agr. Food Chem.*, **2003**, 51, 615-622.
13. Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V.: *Chem. Listy*, **2007**, 101, 584-591.
14. Zloch Z., Čelakovský J., Aujezdská A.: Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu Danone, **2004**.
15. Gliszczynska-Swiglo A.: *Food Chemistry*, **2006**, 96, 131-136.
16. Cano A., Hernández-Ruiz J., Gárcia-Cánovas F., Acosta M., Arnao B. M.: *Phytochemical Analysis*, **1998**, VOL.9, 196-202.
17. http://www.bernard.cz/sub_page.php?page=1&parent=0, 28.5.2008.
18. <http://www.svet-piva.cz/clanky/tipy-a-druhy-piva.php>, 28.5.2008.
19. <http://www.pilsnerpubs.net/beers/hoegaarden-white/>, 9.6.2008.
20. http://www.bernard.cz/sub_page.php?page=17&parent=01, 9.6.2008.
21. <http://www.pivovary-staropramen.cz/web/znacky/stella>, 9.6.2008.

22. Fidler M.: Analýza prenylovaných flavonoidů v chmelu a pivu, **2007**, Univerzita Pardubice.

6 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla zpracována literární rešerše se zaměřením na stanovení antioxidační aktivity přírodních látek. Dále byla stanovena antioxidační aktivita polyfenolických látek obsažených v pivu. K jejímu stanovení byly použity tři metody, které se běžně používají v pivovarské analýze. Jednalo se o metody ABTS, DPPH a FRAP. Veškeré získané výsledky byly přepočteny na ekvivalentní množství standardní látky TROLOXu a vzájemně porovnány.

Principem metody ABTS a DPPH je zhášení syntetických radikálů antioxidanty obsaženými ve vzorku. Metoda ABTS poskytuje nejvyšší hodnoty, protože reaguje s širokým okruhem látek vykazujících antioxidační aktivitu. DPPH nereaguje s prenylovanými flavonoidy a některými dalšími fenolickými látkami, proto stanovené hodnoty byly nižší. Dále byla použita metoda FRAP, u které dochází působením antioxidantů k redukci železitého komplexu na železnatý. Princip této metody je zcela odlišný oproti předchozím metodám.

Tyto metody mohou sloužit jako alternativní kritérium biologické hodnoty potravin, nebo mohou být použity jako srovnávací metody pro určení závislosti různých podmínek při jejich zisku a skladování.

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu
Autor práce	Zdeňka Martinková
Obor	Chemie a technická chemie
Rok obhajoby	2009
Vedoucí práce	Ing. Lenka Česlová, Ph.D., (roz. Kolářová)
Anotace	Literární rešerše je věnována problematice antioxidantů především z pohledu jejich prospěšného vlivu na lidské zdraví. Dále je literární rešerše zaměřena na polyfenolické látky obsažené v chmelu a pivu a metod pro určení jejich antioxidační aktivity. Ke stanovení antioxidační aktivity polyfenolických látek v pivu byly použity tři optimalizované metody. Metody ABTS a DPPH, které jsou založeny na zhášení syntetických radikálů a metoda FRAP založena na redoxních vlastnostech železitého komplexu.
Klíčová slova	Antioxidační aktivita, chmel, pivo, polyfenolické látky.