

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE VLASTNOSTÍ NÁPOJŮ S NÍZKÝM OBSAHEM
ALKOHOLU SPEKTROSKOPICKÝMI METODAMI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

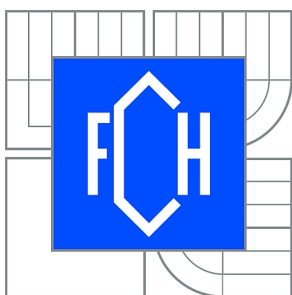
ZDENĚK FAJTL

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE VLASTNOSTÍ NÁPOJŮ S NÍZKÝM OBSAHEM ALKOHOLU SPEKTROSKOPICKÝMI METODAMI

CHARACTERISATION OF ALCOHOLIC BEVERAGES BY MEANS OF SPECTROSPIC METHODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ZDENĚK FAJTL

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN POLOVKA, Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0725/2012** Akademický rok: **2012/2013**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Zdeněk Fajtl**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí práce **Ing. Martin Polovka, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Charakterizace vlastností nápojů s nízkým obsahem alkoholu spektroskopickými metodami

Zadání bakalářské práce:

- 1, Zpracování teoretického přehledu k zadané problematice
- 2, Studium vybraných vlastností alkoholických nápojů s nízkým obsahem alkoholu s ohledem na technologické podmínky její výroby
- 3, Vyhodnocení získaných experimentálních charakteristik s ohledem na stabilitu- trvanlivost studovaných komodit
- 4, Korelace výsledků s existujícím stavem poznatků v dané problematice, zpracování bakalářské práce

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

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

Zdeněk Fajtl
Student(ka)

Ing. Martin Polovka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V práci se věnuje pozornost problematice termooxidační stability míchaných nápojů s nízkým obsahem alkoholu typu Radler. V teoretické části práce popisuje základní postupy při výrobě piva a míchaných nápojů na bázi piva typu Radler. Věnuje se též problematice antioxidantů resp. oxidačním procesům, probíhajících v pivu. Autor též věnuje pozornost spektroskopickým metodám, které se v poslední době využívají na charakterizaci různých kvalitativních i kvantitativních parametrů potravin, dominantní UV-VIS, IČ a EPR spektroskopii. Tyto metody byly zvolené s ohledem na studovanou problematiku. V experimentální části autor prakticky otestoval využití EPR spektroskopie a metody spinových lapačů při charakterizaci termooxidační stability vybrané skupiny komerčně dostupných vzorků piv typu Radler, přičemž koreloval získané hodnoty délky indukční periody jako míry termooxidační stability zjištěné pro piva typu Radler s hodnotami indukčních period zjištěných pro komerčně dostupné vzorky klasických piv typu ležák od identických výrobců.

ABSTRACT

The bachelor's project is focused on the problem of determination of thermo-oxidative stability of mixed Radler - type drinks with low alcohol content. The project consists of both, theoretical and practical parts. The theoretical part describes the basic technological procedures used in the production of lager-type beer and also mixed drinks of Radler type. It also deals with the issue of antioxidants and/or oxidative processes with specific focus on beer and its components. The author also pays attention to spectroscopic methods, which are recently extensively applied to characterize different qualitative and quantitative parameters of foods; predominantly UV-VIS, IR and EPR spectroscopy. These methods were chosen with respect to the topic being studied. In the experimental part, the application of EPR spectroscopy and spin traps methods for the characterization of thermo-oxidative stability of the selected group of commercially available samples of Radler-type beer is presented. The values of the induction periods which were taken as a measure of thermo-oxidative stability, are compared, both for the group of Radler-type beers under study and for the commercially available samples of typical lager-type beers of identical producers, which were taken as for reference.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pivo, míchané nápoje typu Radler, termooxidační stabilita, antioxidanty, spektroskopické techniky, EPR, spinové lapače, indukční perioda

KEYWORDS

Beer, Radler-type mixed drinks, thermooxidative stability, antioxidants, spectroscopic methods, EPR spectroscopy, spin traps, induction period

FAJTL, Zdeněk. *Charakterizace vlastností nápojů s nízkým obsahem alkoholu spektroskopickými metodami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 36 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Polovka, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Martina Polovky, Ph.D., a Ing. Blanky Tobolkové, v rámci spolupráce Fakulty chemické VUT Brno a Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě. Uvedl jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpal. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Zdeněk Fajtl

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Martinu Polovkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Blance Tobolkové za pomoc při měření a kontrole bakalářské práce.

OBSAH

Obsah.....	5
1 Úvod.....	6
2 Teoretická část.....	7
2.1 Pivo.....	7
2.1.1 Suroviny pro výrobu piva.....	7
2.1.2 Výroba sladu.....	8
2.1.3 Výroba mladiny.....	10
2.1.4 Výroba piva.....	12
2.1.5 Míchané nápoje na bázi piva.....	13
2.1.6 Trvanlivost piva.....	14
2.2 Antioxidanty.....	15
2.2.1 Antioxidanty vyskytující se v pivu.....	16
2.3 Spektroskopické metody.....	16
2.3.1 UV-VIS spektroskopie.....	17
2.3.2 IR Spektrometrie.....	18
2.3.3 EPR spektroskopie.....	19
3 Cíl práce.....	23
4 Experimentální část.....	24
4.1 Vzorky a použité chemikálie.....	24
4.2 Základní charakterizace vzorků.....	24
4.2.1 Složení použitých vzorků.....	24
4.3 Příprava roztoků a vzorku na měření.....	25
4.4 Použité přístroje.....	25
4.5 Zpracování naměřených EPR spekter.....	26
5 Výsledky a diskuze.....	27
6 Závěr.....	33
7 Seznam použitých zdrojů.....	34
8 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	36

1 ÚVOD

Míchané nápoje na bázi piva, tzv. Radlery se v posledních letech těší vzrůstající oblibě. Jedná se o alkoholické nápoje s nízkým obsahem alkoholu, připravované mícháním hotově připraveného piva s nealkoholickou složkou. Jako nealkoholická složka se běžně používají ovocné šťávy, limonády nebo nápojové koncentráty smíchané se sodou. Pivo je obvykle mícháno s nealkoholickou složkou v poměru 1:1 a to až po vlastní filtraci piva, výsledný produkt je už pouze podroben pasteraci.

Kvalita výsledného produktu je ovlivňována vlastnostmi použitého piva a vlastnostmi nealkoholické složky. Vedle svých standardních užitkových vlastností, pro které je pivo, nebo pivo typu Radler vyhledávaným nápojem mezi konzumenty, důležitými aspekty při posuzování kvality nápojů jsou mimo jiné jejich antioxidační vlastnosti a v neposlední řadě stabilita.

Vlastní antioxidační kapacita piva je z velké části ovlivněna polyfenoly získanými z chmele a sladu. U vzorků míchaných nápojů na bázi piva vstupuje mimo těchto složek ještě přidaná nealkoholická složka, která do velké míry ovlivňuje jak senzoričké, tak i fyzikálně-chemické parametry nápoje, včetně jeho antioxidačního statusu a stability.

Tato práce se zabývá otázkou změny stability míchaného nápoje s nízkým obsahem alkoholu na bázi Radler, v porovnání s termooxidační stability standardního, komerčně dostupného piva typu ležák bez aditiv. Otázkám vlivu aditiv nebo míchání nápojů na jejich výslednou stabilitu je podle našich poznatků nedostatečně prozkoumána.

V teoretické části se práce zabývá vybranými aspekty technologie výroby piva a následně míchaných nápojů na bázi piva, prezentovány jsou také základní postupy sledování kvality a stability nápojů. Samostatná část je věnovaná problematice antioxidantů a oxidačních procesů v pivě typu ležák nebo míchaném pivě typu Radler. Prezentovány jsou taky moderní spektroskopické metody, využitelné pro studium kvality resp. stability piva, zejména infračervená spektroskopie a spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti. Důraz v této části je položen na rezonanční spektroskopické metody, zejména EPR spektroskopii, která se v poslední době poměrně často a efektivně využívá ke studiu antioxidačních vlastností různých potravin, a mimo jiné také studiu jejich oxidační stability.

Následně v experimentální části jsme na skupině komerčně dostupných vzorků klasických piv typu ležák a vzorků míchaných piv typu Radler od identických výrobců sledovali vliv aditivace a míchání na výslednou termooxidační stabilitu piva pomocí EPR spektroskopie s využitím metody spinových lapačů. Tato metoda byla v minulosti efektivně využita při charakterizaci termooxidační stability různých druhů piv typu ležák, avšak aplikace této metody na míchané nápoje typu Radler nám není známa. [1,2]

Princip sledování termooxidační stability piva a míchaných nápojů na bázi piva vychází z předpokladu oxidačního stresu, vyvolaného během tepelného namáhání vzorku při teplotě 60 °C. Ve vzorku vznikají volné radikály, které jsou konkurenčními reakcemi terminovanými antioxidanty nebo látky vykazujícími antioxidační aktivitu nebo reagují se spinovým lapačem, který je přidán do reakční směsi za vzniku stabilních spinových aduktů detekovatelných pomocí EPR. Rostoucí čas termického namáhání má za následek postupné vyčerpání vlastní – vnitřní – antioxidační kapacity piva, co se projeví následně postupným nárůstem koncentrace spinových aduktů v čase. Okamžik vyčerpání vnitřní antioxidační kapacity, resp. prudkého nárůstu koncentrace spinových aduktů se označuje jako indukční perioda a je považován za míru termooxidační stability piva. Z předchozích prací vyplývá, že tento parametr je možné v dobré shodě korelovat se stabilitou/trvanlivostí nápoje udanou výrobcem, nebo s výsledky jiných testů kvality. [3]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pivo

Pivo patří mezi jeden z nejstarších, lidmi vyráběných alkoholických nápojů. Jedná se o slabě alkoholický nápoj, vyrobený kvašením cukernatého chmeleného roztoku. Cukr nutný pro kvašení se získává ze škrobnatých surovin. Většina historiků se shoduje, že výroba piva začala na blízkém východě v Mezopotámii přibližně 6000 let př.n.l. První písemné zmínky se objevují v Egyptských a Mezopotámských textech okolo roku 3300-3100 př.n.l.

2.1.1 Suroviny pro výrobu piva

2.1.1.1 Ječmen

Pro pivovarský, respektive sladařský průmysl je ječmen nejdůležitější surovinou. Ječmen pronikl do Evropy asi 7000–4000 let př.n.l. pravděpodobně z oblasti mezi Egyptem a Íránem. V našich zemích je pěstování ječmene písemně doloženo z roku 1227 v Čechách i na Moravě. V 17. století se postupně rozšiřovalo sladování ječmene místo pšenice, což mělo za následek rozmach ve stavbě sladoven. Na přelomu 19. a 20. století byl na Moravě jarní ječmen nejdůležitější obilninou a zároveň exportní plodinou. Ječmen se pěstoval na Hané na 27–50 % orné půdy, v některých hospodářstvích na Českomoravské vrchovině se jarní ječmen pěstoval na 7 % orné půdy. [4] Termín sladovnický ječmen je pak používán pro kvalitní jarní ječmen od 40. let devatenáctého století. [5]

Pro účely sladařského průmyslu se využívá ječné zrnko (obilka), které se skládá z obalových částí (pluch a plušek), zárodku (klíčku a embrya) a endospermu. Endosperm zaujímá největší část obilky a je hlavním zdrojem zásobních sacharidů, bílkovin a dalších složek nutných při vytváření charakteristických vlastností sladu. Ječné zrnko obsahuje 80–88 % sušiny a 12–20 % vody. [5] Sušinu tvoří organické dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny a anorganické látky. Skupinu organických látek v zrnku ječmene představují především sacharidy, které tvoří asi 80 % hmotnosti ječného zrna. Nejvíce zastoupenou složkou sacharidů je škrob. Lipidy tvoří asi 2–3 % zrna a 10–11,5 % tvoří dusíkaté látky. [5] Významnou složkou ječného zrna jsou tříslovinné látky (polyfenoly). K fenolovým sloučeninám patří jednoduché fenolové kyseliny, tanoidy a anthokyanogeny. Zrnko dále obsahuje enzymy. Nejpočetnější třídou enzymů jsou oxidoreduktázy. Při hvozdění se buď částečně, nebo zcela ničí. Oxidačně redukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku, nebo elektronů, případně vestavěním atomu kyslíku do substrátu. Oxidoreduktázy hrají významnou roli při dozrávání, skladování a klíčení ječmene. Ovlivňují obsah polyfenolů, barvu sladiny a piva, koloidní a senzoryckou stabilitu piva. V zrnku ječmene jsou rovněž obsaženy vitamíny. Mnohé z nich tvoří součást aktivních skupin různých enzymů, a tím vlastně působí na enzymatickou aktivitu klíčícího zrna. [6]

V České republice je v současné době sladovnická kvalita odrůd ječmene hodnocena podle Ukazatele sladovnické jakosti, který vznikl na základě požadavků zpracovatelského průmyslu. Znaky hodnocené v rámci USJ jsou obsah dusíkatých látek, obsah extraktu, relativní extrakt při 45 °C, Kolbachovo číslo, diastatická mohutnost, dosažitelný stupeň prokvašení, friabilita (křehkost) a obsah β -glukanů ve sladince. [5]

2.1.1.2 Varní voda

Voda je ve sladařském a pivovarském průmyslu důležitou surovinou, neboť přímo ovlivňuje kvalitu piva. Podle technologického postupu a vyspělosti technického zařízení se spotřebuje na výrobu 1 tuny sladu 10–15 hl vody a na 1 hl vystaveného piva se spotřebuje 12–15 hl vody. [4] Vodu používanou v pivovarech lze rozdělit na spodní vodu a povrchovou vodu. Spodní vody mají nízký obsah organických látek, vyšší obsah iontů a nižší obsah mikroorganismů. Povrchové vody obsahují zákalý tvořené částicemi nerozpustných zemin, rozpuštěné a koloidní látky organického a anorganického původu, řasy a vyšší obsah mikroorganismů. Voda používaná při přípravě mladiny musí mít charakter

pitné vody, proto je vždy potřeba používanou vodu upravovat vhodným způsobem. Úprava spodních vod je obecně jednodušší než úprava povrchových vod.

Podzemní vody často obsahují vyšší koncentrace Fe^{2+} , Mn^{2+} a CO_2 . Rozpuštěný CO_2 se odstraňuje buď odplyněním, nebo přidavkem $\text{Ca}(\text{OH})_2$. K separaci Fe^{2+} a Mn^{2+} se využívá oxidačních postupů. Oba kovy jsou převedeny na sloučeniny s vyšším oxidačním stupněm a následně jsou vyloučeny ve formě nerozpustných sloučenin $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a MnO_2 .

Vzhledem k současnému stavu a vývoji znečištění prostředí a povrchových vod je tato úprava komplikovanější. Tuhé nečistoty jsou odstraňovány na česlích, případně sítích výhradně mechanicky bez přidavku jakýchkoliv činidel. Koloidní látky se odstraňují přidáním činidel podporujících koagulaci látek s vysokou molekulární hmotností. Pro tento účel se používají soli Fe^{3+} a Al^{3+} . Po jejich přidavku do vody se hydrolyzou tvoří polyhydroxykomplexy uvedených iontů, které jsou nositeli kladného elektrického náboje. Koloidní látky a látky s vysokou molekulární hmotností nesou převážně záporný náboj, kterým se zachytí na koagulátu a vytvoří agregáty. Vzniklý kalový mrak je poté z vody odstraněn sedimentací a filtrací. Mikrobiologická nezávadnost vody se zabezpečuje chlorováním, aplikací oxidu chloričitého, ozónováním nebo působením UV paprsků. [5]

2.1.1.3 Chmel

Chmel, jako jedna ze základních pivovarských surovin, je představován usušenými chmelovými hlávkami samičích rostlin chmele evropského (*Humulus lupulus* var. *europaeus*). Botanicky se zařazuje chmel do čeledě rostlin konopovitých. Je rozšířen jako rostlina vytrvalá v mírném pásmu obou polokoulí a v plné plodnosti vydrží až 25 let. Chmel je rostlina dvoudomá, tj. květy samčí a samičí jsou na různých rostlinách. K pivovarským účelům se pěstují pouze rostliny samičí. [5] Chmel poskytuje pivu typickou hořkou chuť, přispívá k tvorbě charakteristického aroma a má další technologicky důležité vlastnosti, například zlepšování kvality pěny. Pěstování chmele je v České republice státně kontrolováno a řízeno. Povoleny jsou pouze tři pěstitelské oblasti – Žatecko a Ústěcko v Čechách a Tršicko na Moravě. [4] Z pivovarského hlediska se odrůdy chmele dělí na jemné a vysokoobsažné odrůdy. Jemné (aromatické) odrůdy mají příjemné chmelové aroma, a jsou představovány především žateckými odrůdami. Vysokoobsažné (hořké) odrůdy mají vysoký obsah pryskyřic, ale zpravidla hrubé aroma. Podle zabarvení chmelové révy se rozdělují chmelové odrůdy na červenky, představované hlavně žateckými odrůdami, a na zeleňáky pěstované hlavně v zahraničí, zejména Anglii, Belgii a Americe. [4] Mezi hlavní technologicky účinné látky chmele patří hořké látky, chmelové polyfenoly a silice. Hořké látky jsou základní účinnou složkou chmele. Nejvíce hořkosti udílí pivu α -hořké kyseliny (humulony). [7]

Většina pivovarsky cenných látek chmele snadno podléhá chemickým změnám při skladování a transportu, proto se posledních desetiletích většina hlávkového chmele zpracovává na chmelové výrobky. Nejdůležitějšími složkami chmele jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly. [5]

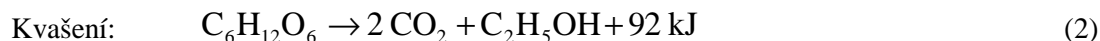
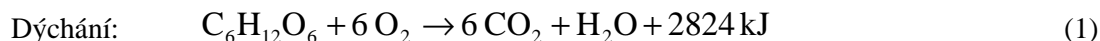
2.1.2 Výroba sladu

Cílem sladování je vyrobit řízeným procesem klíčení a hvozdění z ječmene slad, obsahující potřebné enzymy a aromatické i barevné látky nezbytné pro výrobu určeného druhu piva. Principem sladování je vytvoření optimálních podmínek pro klíčení ječmene, při kterém dochází k aktivaci a tvorbě technologicky důležitých enzymů. Vzniklý zelený slad je následným hvozděním přeměněn v hotový slad. [4]

2.1.2.1 Čištění, třídění a skladování ječmene

Čištění a třídění ječmene se provádí pro zbavení ječmene prachu, nečistot a přímísenin a roztřídění podle velikostí a kvalitativních znaků. Vyčištěný a vytříděný ječmen se skladuje na půdách nebo v silech. Sladovaný ječmen je živý rostlinný organismus, jehož životní projevy jsou utlumeny, nikoliv však zastaveny. energii potřebnou pro životní projevy získává zrna odbouráváním rezervních

polysacharidů. Podle okamžitých podmínek získává energii buď aerobním dýcháním v přítomnosti kyslíku, nebo anaerobním kvašením v nepřítomnosti kyslíku podle rovnic:



Produkty kvašení narušují, popřípadě usmrcují klíček, a proto je nutné vytvořit takové podmínky skladování, aby zrno bylo stále v přítomnosti kyslíku a metabolismus zrna nepřешel z dýchání na kvašení. Kromě toho je dýchání energeticky výhodnější a představuje menší ztráty hmotnosti zrna. I při dodržení optimálních skladovacích podmínek se část hmotnosti zrna prodýchá.

Při skladování se čerstvě sklizený ječmen nachází ve stádiu základního klidu, tzv. dormance, a není schopen rychle vyklíčit. Špatná klíčivost čerstvě sklizeného ječmene je způsobena přítomností inhibitorů klíčení, tzv. dorminů. Teprve jejich odbouráním oxidací dormance zaniká, uvolňuje se činnost stimulatorů klíčení gibberelinů, a zrno se stává schopným vyklíčit. Tento proces je možné záměrně urychlit máčením ječmene v 1% roztoku peroxidu vodíku, přidáním kyseliny gibberelové do máčecí vody, odstraněním obalových částí zrna nebo zahříváním na teplotu 40–50 °C. Z hygienických a ekologických důvodů se dnes dává přednost přirozenému odležení. [4]

2.1.2.2 Máčení ječmene

Cílem máčení je zvýšení obsahu vody v ječném zrně z 12–15 % na 42–48 %. [4] Dosažení obsahu vegetační vody je nezbytné pro enzymové pochody zajišťující optimální průběh sladařského klíčení. Dosažený obsah vody v namočeném ječmenu se nazývá stupeň domočení a liší se podle typu vyráběného sladu. Při výrobě světlých sladů je stupeň domočení 42–45 %, u tmavých sladů 45–48 %. [4] K máčení by se měla používat čistá voda neutrální reakce o maximální tvrdosti do 6,25 mmol·dm⁻³. [5] Nevhodné jsou vody s velkým obsahem organických látek, sloučenin Fe a Mn.

Při máčení vnika voda do neporušeného zrna především přes zárodek a částečně i přes horní část a ostatním povrchem. Přijímání vody je nejrychlejší na začátku máčení v prvních 4–8 hodinách, poté se zpomaluje. Příjem vody ovlivňuje teplota vody, velikost zrna, přístup kyslíku, chemické složení máčecí vody a technologie máčení. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím máčení je kyslík. Zrno během máčení začíná dýchat, spotřebovává kyslík a vytváří oxid uhličitý. Pokud dojde ke spotřebování kyslíku a k přílišnému nahromadění oxidu uhličitého, přechází normální dýchání v intramolekulární anaerobní dýchání spojené s kvašením. Metabolity vznikající anaerobním dýcháním (etanol) mohou poškodit klíček. Za dostatečného přístupu vzduchu se doba máčení zkracuje. Nejběžnější je způsob máčení se vzdušnými přestávkami. Celková doba máčení se pohybuje od 60 do 90 hodin. [4]

Máčení ječmene probíhá v náduvnících, které byly dříve kamenné, později železobetonové a dnes výhradně kovové z legovaných ocelí. Náduvníky bývají válcové nebo čtyřhranné se spádovým kónusem s úhlem 45°, aby ječmen mohl samovolně vytékat ven. [5]

2.1.2.3 Klíčení ječmene

Cílem sladařského klíčení ječmene je aktivace a tvorba enzymů a dosažení požadovaného stupně rozluštění při omezení ztrát vegetací. Dosahuje se toho umělým modelováním podmínek přirozeného klíčení vhodnou teplotou, vláhou a přístupem kyslíku. Klíčení je fyziologický proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjejí zárodky kořínků a listů za využití zásobních látek z endospermu. Současně se mění i vnitřní znaky zrna. Působením enzymů se štěpí rezervní látky a zvyšuje se rozpustnost a lušitelnost. Nejdůležitějším procesem při klíčení je nová tvorba a aktivace enzymů. Z enzymů mají největší technologický význam fosfatázy, cytázy, proteázy a hlavně amylázy. [8] Řízení klíčení ječmene ve sladovně se nazývá vedení hromad a liší se podle druhu vyráběného sladu, technického vybavení sladovny a kvality zpracování ječmene. Klíčení sladovnického ječmene se

provádí klasickým způsobem na humnech, nebo na moderních pneumatických sladovnách. Zelený slad je konečný produkt klíčení ječmene. [5]

2.1.2.4 Hvozďení sladu

Hvozďení je závěrečnou fází výroby sladu. Zelený slad je na hvozďě nejprve předsušen při teplotách do 60 °C, následně pak vyhřát a dotažen při teplotách od 80 do 105 °C. [5] Cílem hvozďení je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního sladu, zastavit životní a lušticí pochody v zrně a vytvořit aromatické, barevné a oxidoredukční látky charakteristické pro slad za minimálních nákladů a ztrát

Při sušení a hvozďení sladu se rozeznávají růstová, enzymová a chemická fáze. Růstová fáze probíhá do teploty 40 °C a při vlhkosti nad 20 %, v zrně ještě probíhají všechny vegetační pochody. Enzymová fáze probíhá při teplotách do 60 °C a vlhkosti pod 20 %. V zrně jsou již zastaveny vegetační pochody, ale enzymové reakce pokračují. Chemická fáze probíhá při teplotách nad 60 °C a při vlhkosti pod 10 %. V zrně dochází již jen k chemickým reakcím tvorby barevných, chuťových a oxidoredukčních látek. [5]

2.1.2.5 Odkličování a skladování sladu

Během odkličování je slad zbaven kořínků, poškozených zrn a prachu. K odkličování se používá odkličovačka. Odkličovačka je válec s hřídelí na které jsou upevněny odkličovací růžice s odkličovacími perutěmi. Existují i odkličovačky se šnekovým dopravníkem. Perutě nebo šnek slouží kromě ulamování sladového květu ještě k přepravě odkličovaného sladu. Slad se uskladňuje na sladových půdách nebo v silech, kde se nechá před dalším použitím 4–6 týdnů dozrát. [5]

2.1.3 Výroba mladiny

Mladina se připravuje ve varně pivovaru ze sladu, vody a chmele nebo chmelových přípravků.

2.1.3.1 Šrotování sladu

Šrotování je mechanické drcení sladového zrna s cílem dokonalého vymletí endospermu na vhodný poměr jemných a hrubších částic při zachování celistvosti pluch. Pluchy slouží jako filtrační materiál při scezování. Slad se mele ve šrotovnicích s čtyřmi až šesti válci. Slad se šrotuje buď za sucha, kondicionovaný (zvlhčený parou), nebo za mokra. Jemnost šrotování přímo ovlivňuje činnost sladových enzymů, neboť čím jemnější je šrot, tím lepší je přístup enzymů k jednotlivým částem sladu. Příliš jemný šrot způsobuje ucpávání filtračních kanálků ve vrstvě mláta a způsobuje potíže při scezování. [4]

2.1.3.2 Vystírání

Vystírání je proces, při kterém je sladový šrot nebo sladové náhražky smíchány s vodou za účelem převedení tuhých částí šrotu do vody. Pro docílení dobrého varního výtěžku je potřeba převést maximální množství rozpustných látek do roztoku. Tuhé části šrotu rozpustné ve vodě jsou hlavně cukry, sacharóza, malé množství maltózy, glukosy a fruktózy. Z neškrobových polysacharidů jsou rozpustné gumovité látky a jejich štěpné produkty, lipidy, polyfenoly, prakticky všechny anorganické sloučeniny ale jen malý podíl sladových enzymů. [8] Množství sladu, které je použito na jednu várku se nazývá sypání, objem vody použité k vystírání se nazývá nálev. Výsledné množství rozpuštěných látek v roztoku je závislé na sypání a objemu nálevu. Vystírání probíhá ve vystíracích nádobách při různých teplotách nálevu po dobu 10–30 minut. Studené vystírání se provádí s teplotou vody 20 °C, teplé vystírání s teplotou vody 35–38 °C a horké vystírání s teplotou vody 50–62 °C. [4]

2.1.3.3 *Rmutování*

Cílem rmutování je rozštěpit škrob na zkvasitelné sacharidy a převést optimální podíl extraktu surovin do roztoku. Běžně se používají dekokční a infuzní postupy rmutování. Dekokční způsob je založen na postupném vyhřívání jednoho až tří podílů rmutu na technologicky významné teploty s následným povařením těchto podílů. Infuzní postup je založen na rozpouštění a štěpení extraktu sladu dlouhodobým účinkem sladových enzymů bez povařování rmutů. Při rmutování probíhají děje mechanické, fyzikálně-chemické a především enzymové. Škrob je štěpen na zkvasitelné sacharidy působením amylolytických enzymů obsažených ve sladu. Štěpení škrobu probíhá ve třech stupních, kterými jsou mazovatění, ztekucení a zcukření, během kterých probíhají fyzikálně-chemické a enzymové procesy. Mazovatění je fyzikálně-chemický děj závislý hlavně na rychlosti a teplotě zahřívání a vlastnostech ječmenu použitého k výrobě sladu. Mazovatění probíhá při teplotách 52–57 °C. Ztekucení škrobu je enzymový děj, při kterém se postupně zkracují řetězce molekul amylosy a amylopektinu, než nakonec dojde ke zcukření. Jakmile dojde ke zcukření, roztok obsahuje pouze štěpné produkty škrobu. [8]

2.1.3.4 *Scezování sladiny*

Scezování je operace prováděná za účelem oddělení sladiny od pevného podílu mláta. Scezování se provádí ve scezovací kádi vybavené dvojitým děrovaným dnem a systémem odvodných trubek spojených s kohouty scezovací baterie. Sladina je během scezování oddělována od mláta přirozenou filtrací přes vrstvu sedimentovaných pluch a ostatních nerozpustných zbytků sladu. Scezování sladiny se provádí ve dvou fázích. V první fázi je oddělen hlavní podíl roztoku extraktu nazývaný předek. V druhé fázi promývání při tzv. vyslazování se mláto promývá horkou vodou a získává se zředěná sladina nazývaná výstřelky. Vyslazování se provádí za účelem vylouhování posledních zbytků rozpustného extraktu. Předek a výstřelky se shromažďují v mladinové pánvi, kde se postupným zahříváním roztok přiveden k varu. [4]

2.1.3.5 *Chmelovar*

Sladina získaná scezováním se v mladinové pánvi vaří s chmelem po dobu 60–120 minut. [5] Výsledným produktem je horká mladina. Během varu sladiny s chmelem probíhají významné technologické pochody a fyzikálně-chemické změny, které stabilizují koncentraci a složení mladiny. Mezi tyto pochody patří odpaření přebytečné vody. Protože k dokonalému vyslazení je potřeba použít přebytek vyslazovací vody, požadované koncentrace mladiny se dosahuje odpařením části vody při chmelovaru. Během varu dochází k inaktivaci enzymů a sterilizaci mladiny. Všechny enzymy jsou inaktivovány během varu sladiny a mikroorganismy jsou zničeny po 15 minutách varu při pH 5,3–5,7. [5]

Během varu dochází k poklesu hodnoty pH a nárůstu barvy. Pokles hodnoty pH je způsoben především tvorbou melanoidinů a v menší míře je způsoben reakcí vápenatých a hořečnatých solí obsažených ve vyslazovací vodě s hydrogenfosforečnanem sladu a chmelovými hořkými kyselinami. Tento přirozený pokles pH příznivě ovlivňuje koagulaci bílkovin. [5]

Během chmelovaru vznikají produkty tepelného rozkladu. Se vzrůstajícím tepelným zatížením se zvyšuje koncentrace těchto látek, které se souhrnně označují jako produkty Maillardovy reakce. Dochází k tvorbě redukujících látek nazývaných reduktony. Reduktony ochotně váží kyslík a chrání tak další složky extraktu hotového piva před oxidací. S rostoucím obsahem reduktonů se zvyšuje koloidní a chuťová stabilita piva. Mezi reduktony se řadí melanoidiny, některé polyfenoly, bílkoviny obsahující sulfhydrylové skupiny a hořké látky chmele. [8]

Důležitým procesem je také koagulace bílkovin a tvorba lomu. Původně čirá sladina se po zahájení varu zakalí a při pokračujícím varu se začnou vylučovat nejprve velmi jemné vločky, které se postupně zvětšují do objemných shluků označovaných jako lom mladiny. Tento jev je způsoben denaturací a následnou koagulací vysokomolekulárních bílkovin.

Rozpouštění a reakce účinných látek chmele ve vroucí mladině jsou významně ovlivněny hodnotou pH. Při varu mladiny částečně izomerují α -hořké kyseliny. Produkty izomerie jsou rozpustné i ve studené mladině, nezanedbatelný podíl isohumulonů se však adsorbuje na hrubé kaly mladiny, případně vypadnou z roztoku při poklesu pH na začátku kvašení. Hořkost piva je proto dána i zbývajícím podílem isohumulonů. Z celkové chmelem dodané hořkosti se využije v závislosti na podmínkách chmelovaru a kvašení 25–35 %. [5] Chmelové polyfenoly jsou rozpustné ve vodě a při chmelovaru přecházejí do mladiny. Svým redukujícím účinkem podporují tvorbu větších, málo rozpustných molekul bílkovin, které vpadávají při tvorbě lomu. Příznivě se uplatňují hlavně polyfenoly s nízkým oxidačním a polymeračním stupněm. Vyšší polymery udílí pivu drsnou hořkost a zhoršují jeho koloidní stabilitu. Chmelové silice se významně podílejí na aromatu piva. Po přidání chmelového preparátu do mladiny probíhá zároveň uvolňování silic do mladiny, jejich oxidace a těkání neoxidovaných silic s vodní parou. Aroma chmele ovlivňují hlavně myracen a linalool. Při varu mladiny nastávají také změny v obsahu dimethylsulfidu a jeho prekurzorů. [5]

2.1.4 Výroba piva

Pivo je vyráběno zakvašením mladiny pivovarskými kvasinkami svrchního kvašení při teplotách až do 24 °C nebo kvasinkami spodního kvašení při teplotách 6–12 °C. Kvašení mladiny je při použití klasické technologie výroby rozděleno do dvou fází, na hlavní kvašení a dokvašování. Při použití jednofázové technologie výroby piva v cylindrokónických tancích, probíhá hlavní kvašení a dokvašování v jediné velkoobjemové nádobě.

2.1.4.1 Hlavní kvašení mladiny

Prostor, ve kterém probíhá kvašení, se nazývá spilka. V ČR probíhá kvašení nejčastěji v otevřené kvasné kádi na spilce. V závislosti na použití kvasnic svrchního nebo spodního kvašení, je celý prostor spilky včetně kvasné kádě chlazen na příslušnou teplotu. Kvasné kádě jsou nejčastěji vyrobeny z nerezové oceli a pro dosažení dobré sedimentace při použití kvasinek spodního kvašení mají maximální hloubku přibližně 2 m. Součástí spilky je i propagační stanice, ve které jsou skladovány a ošetřovány násadní kvasnice. Při transportu mladiny na spilku je prováděno zakvašování pivovarskými kvasnicemi. Během transportu je mladina provzdušňována sterilním vzduchem, aby výsledný obsah rozpuštěného kyslíku byl 6–8 mg·l⁻¹. První vizuální projevy kvašení jsou pozorovatelné během 12–24 hodin. Na povrchu mladiny vzniká pěna, která je prouděním kvasící mladiny unášena od stěny kádě. Jedná se o stadium zaprašování a odrážení. Stadium nízkých bílých kroužků začíná během 24–36 hodin po naplnění kádě. [5] Na hladině kvasící mladiny se vytváří typické bílé růžice pěny. Stadium vysokých hnědých kroužků je pozorovatelné během třetího až čtvrtého dne. Barva kroužků postupně přechází do hnědé barvy, to je způsobeno vynášením kalů a mrtvých kvasinek do pěny. Poslední nastává stadium propadání, intenzita kvašení klesá a výška pěny se snižuje. Na konci propadání zůstává na hladině tmavá vrstva pěny, tzv. deka. Na dně kádě zůstává sediment kvasnic, skládající se ze spodní a horní vrstvy a jádra. Hlavní kvašení trvá přibližně 6–8 dní v závislosti na druhu vyráběného piva. [5]

2.1.4.2 Pivovarské kvasnice

V průmyslové výrobě piva se v ČR využívají výhradně kvasinky spodního kvašení druhu *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis*, které po kvašení sedimentují ke dnu kvasné nádoby. Kvasinky svrchního kvašení rodu *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* jsou po skončení kvašení vynášeny na hladinu, kde tvoří tzv. deku. Kvasničné buňky se rozmnožují vegetativně multilaterálním pučením a za zvláštních podmínek mohou tvořit i pseudomycelium. Počet pučení jedné mateřské buňky je průměrně asi 20 cyklů a po každém pučení zůstává na povrchu buňky jizva, přes kterou již neprobíhá transport živin a metabolitů. [5]

2.1.4.3 *Procesy probíhající při kvašení mladiny*

Biochemické procesy probíhající při hlavním kvašení jsou velmi komplexní a mnoho jich ještě není plně objasněno. Během hlavního kvašení jsou kvasinkami asimilovány živiny ze sladu pro získání energie a jako hlavní metabolit vzniká alkohol a CO₂, jako vedlejší metabolity vzniká pestrá škála chemických sloučenin, které ovlivňují výsledné organoleptické vlastnosti piva. Z vedlejších metabolitů vznikajících během hlavního kvašení jsou to hlavně vicinální diketony, vyšší alkoholy, estery, fenolické sloučeniny (4-vinylguajakol, 4-vinylfenol) a SO₂. [8] Obsah SO₂ v pivu je nepřímo úměrný nárůstu biomasy, a vykazuje antioxidační vlastnosti a zvyšuje chuťovou stabilitu výsledného piva. Během kvašení dochází k poklesu extraktu původní mladiny v závislosti na technologických parametrech výroby, na složení a provzdušnění mladiny a na druhu kvasničného kmene. Zjednodušeně lze procesy probíhající při kvašení zapsat dle rovnice:



Důležitým regulačním mechanismem ovlivňujícím metabolismus kvasnic je Crabtreeho efekt. Tento efekt popisuje chování kvasnic v aerobním prostředí s vysokou koncentrací sacharidů, kdy namísto tvorby biomasy aerobním mechanismem probíhá alkoholové kvašení. I přes nízké využití aerobního metabolismu dochází k nárůstu biomasy. Zvýšená koncentrace kyslíku v mladině je však stále potřeba jako živina k zabezpečení vedlejších metabolických drah u syntézy sterolů a nenasycených mastných kyselin. [9]

Pivovarské kvasnice dokážou zkvašovat téměř veškeré cukry vyskytující se v mladině, kromě vyšších polysacharidů a dextrínů. Jako první je zkvašována sacharóza, fruktóza a glukosa jsou zkvašovány přibližně společně. Po kompletní spotřebě glukosy je teprve zkvašována maltosa, nejvíce se vyskytující cukr v mladině. Jako poslední je zkvašována maltotriosa. Společně s cukry jsou disimilovány i dusíkaté sloučeniny. Nízkomolekulární dusíkaté látky, hlavně aminokyseliny, jsou využívány kvasinkami pro stavbu nových tkání. [10] Vysokomolekulární dusíkaté látky a určitý podíl nízkomolekulárních dusíkatých látek jsou během hlavního kvašení vyloučeny z roztoku a jsou vynášeny na povrch mladiny, kde tvoří součást deky nebo sedimentují na dně společně s kvasinkami.

2.1.4.4 *Dokvašování piva*

Po hlavním kvašení je mladé pivo dokvašováno v ležáckém sklepě při teplotě 1 – 3 °C. Ležácké tanky jsou ležaté válcovité nádoby zpravidla vyrobené z oceli. Během pozvolného dokvašování piva dochází také k vyčištění a nasycení piva CO₂. Čištění při dokvašování piva je velmi důležité, neboť ovlivňuje průběh filtrace, chuť a pěnivost piva a koloidní stabilitu. Dokvašování u výčepních piv trvá 21 dní a u ležáků 70 dní při použití klasické technologie. [8]

2.1.5 *Míchané nápoje na bázi piva*

Míchané nápoje na bázi piva se těší vzrůstající oblibě v posledních několika letech nejen v ČR, ale i ve světě. Základem těchto nápojů je vždy pivo, které se míchá s ovocnými šťávami, limonádami nebo jinými aditivami. Takto připravené nápoje většinou mají obsah alkoholu 2,5 obj. %. První míchaný nápoj na bázi piva typu Radler byl připraven roku 1922 v podniku Kugler-Alm na jihu Mnichova. Nápoj byl připraven smícháním ležáku s limonádou v poměru 1:1. V ČR jsou podle prováděcí vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. míchané nápoje na bázi piva definovány jako nápoje vyrobené smícháním piva s nealkoholickým nápojem nebo s nápojovým koncentrátem pro přípravu nealkoholických nápojů a sodovou vodou.

Základními složkami pro přípravu míchaných nápojů jsou pivo, voda, limonády nebo ovocné koncentráty a aditiva. Obsah piva v připraveném nápoji se pohybuje od 50 do 70 obj. %. [10] Mezi používaná aditiva se řadí:

- sladidla
- kyseliny
- antioxidanty

- ochucovadla
- barviva
- konzervanty
- antioxidanty

Voda používaná k přípravě míchaných nápojů musí splňovat požadavky na pitnou vodu a měla by obsahovat co nejméně rozpuštěného kyslíku, aby se zabránilo rychlejšímu stárnutí výsledného produktu a změně chuťového profilu kvůli reakci kyslíku s ostatními aditivami, hlavně sladidly a ochucovadly.

Sladidla se využívají k docílení požadované chuti výsledného nápoje. Přírodní sladidla (sacharóza, glukosový sirup, kukuřičný sirup) zhoršují biologickou stabilitu výrobku, protože v takto připraveném nápoji je zvýšen obsah zkvasitelného cukru. Takovýto roztok je ideálním médiem v případě mikrobiálního napadení. Umělá sladidla naopak nezhoršují biologickou stabilitu, ale mohou mít negativní vliv na výslednou chuť. Při použití nevhodného poměru jednotlivých sladidel může mít výsledný nápoj nahořklou nebo kovovou příchuť. Jedna z výhod použití umělých sladidel je nižší energetický obsah výsledného nápoje než při použití přírodních sladidel. [10]

Přidávání organických kyselin je důležité zejména k docílení vyváženého poměru mezi sladkou a kyselou chutí. Přídavek kyselin také snižuje hodnotu pH výsledného nápoje, je proto důležité při míchání jednotlivých aditiv zabezpečit, aby pokles pH nebyl příliš prudký. V případě příliš prudkého poklesu pH může dojít ke změně chuti, případně k vysrážení bílkovin. [10]

Antioxidanty se přidávají hlavně kvůli zachování barvy míchaného nápoje. Nejčastěji přidávané antioxidanty jsou kyselina askorbová a tokoferol. Koncentrace kyseliny askorbové během skladování klesá kvůli reakci s kyslíkem v balení. [10]

2.1.5.1 Technologické aspekty výroby míchaných nápojů na bázi piva

Homogenizace nealkoholické složky s pivem je velmi důležitá pro dosažení kvalitního produktu. Roztoky nápojových koncentrátů při smíchání s pivem způsobují fyzikálně-chemické změny piva, dochází zejména k tvorbě zákalu. Tvorbu zákalu lze omezit smícháním koncentráту s vodou a do takto zředěného koncentráту přidávat pivo. Dostatečným promícháváním lze zamezit vzniku gradientu pH a tím vzniku zákalu v důsledku vysrážení vysokomolekulárních komplexů. [10]

2.1.6 Trvanlivost piva

V porovnání s většinou ostatních alkoholických nápojů je pivo výjimečné ve své relativně krátké trvanlivosti. Po skončení dokvašování v ležáckém sklepě by se pivo bez dalších úprav po krátké době zkazilo. V dnešní době pivovar musí garantovat po celou dobu záruky trvanlivost piva ve všech směrech, tj. trvanlivost biologickou (mikrobiologickou), koloidní a chuťovou. [5]

2.1.6.1 Biologická stabilita

Biologická stabilita je velmi závislá na obsahu kontaminujících bakterií, kvasinek a hub v pivu. Po skončení chmelovaru je uvařená mladina sterilní. Jakmile je však mladina ochlazená, může dojít k rychlému pomnožení škodlivých mikroorganismů. Pivo obsahuje kontaminující mikroorganismy, které se při vyšších teplotách mohou rychle rozmnožit a produkty těchto mikroorganismů jsou pak původcem vážných chuťových změn. V Evropě jsou ž za 90 % všech případů za kontaminace piva zodpovědné bakterie druhu *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* a *Megasphaera*. Mezi ostatní druhy kontaminujících bakterií patří *Enterobacteriaceae*, *Zymomonas*. [11] Pro zabránění kontaminace bakteriemi mléčného kvašení je snaha co nejvíce snižovat obsah rozpuštěného kyslíku v balení. Takto vniká anaerobní prostředí, které je v případě sekundární kontaminace anaerobními bakteriemi se zvýšenou tolerancí k alkoholu ideálním substrátem pro růst. [12] Důležité je tedy dodržovat zásady aseptické práce při stáčení piv do obalů. Biologické stability lze dosáhnout pasterací

piva, stočením piva za horka nebo studenou sterilizací a aseptickým stáčením do transportního obalu. [5] Každý způsob tepelného ošetření piva je spojen s rizikem následných chuťových změn. [13]

2.1.6.2 Koloidní stabilita

Koloidní stabilita je důležitá pro zabránění vysrážení koloidních látek a tvorbě sedliny a zákalu. Ve filtrovaném pivu zůstanou rozpuštěny organické sloučeniny, polypeptidy, polyfenoly, neškrobové polysacharidy a hořké látky chmele, které podléhají změnám a vzájemně spolu reagují. Jejich vzájemnou reakcí vznikají zákaly. Dělí se na chladové zákaly a trvalé zákaly. Až na výjimky, zákazníci preferují čiré pivo bez zákalu. Na vzniku koloidního zákalu se podílí velké množství různých reakcí, nejvýznamnější jsou polymerizační reakce mezi polyfenoly a specifickými proteiny. [14] Poměr obsahu flavonoidů a proteinů je nejdůležitějším ukazatelem koloidní stability. Z polyfenolů se na tvorbě zákalu nejvíce podílejí polyfenoly sladu. [5]

2.1.6.3 Chladový zákal

Chladový zákal se z piva vylučuje při jeho ochlazení na 0 °C. Při opětovném zvýšení teploty na 20 °C se zákal rozpustí. Kvašení, a hlavně závěr dokvašování při vyšších teplotách, oxidace piva vzdušným kyslíkem, přítomnost iontů těžkých kovů a světlo podporují vznik chladových zákalů. [5]

2.1.6.4 Trvalý zákal

Trvalý zákal je v podstatě druhou fází chladového zákalu. S postupujícím časem dochází ke stálému zvětšování koloidních částic, které se z piva nenávratně vyloučí. [5] Doba, za kterou se od stočení vyloučí z piva nevratný zákal, je při posuzování koloidní stability piva velice důležitá. [10]

2.1.6.5 Chuťová stabilita

K nežádoucím chuťovým změnám může dojít postupem času i u piv, která jsou biologicky a koloidně stabilní. Tyto změny se mohou projevit jak ve velmi krátkém čase, tak i u piv která jsou dobře chuťově stabilizována až po mnoha měsících. Na procesu chuťových změn piva se nejvíce podílejí oxidační reakce. [5] Chuťová stabilita je z dlouhodobého hlediska nejvíce ovlivňována obsahem kyslíku v balení. Oxidací alkoholů vznikají karbonylové sloučeniny, nejvíce aldehydy, které se na chuťových změnách piva podílejí nejvýrazněji. K dosažení dlouhodobé chuťové stability je potřeba už při výrobě piva zamezit dlouhodobému styku rmutu a mladiny při chmelovaru s kyslíkem. Vysoká koncentrace rozpuštěného kyslíku ve rmutu a mladině snižuje koncentraci reduktorů. Vysoká koncentrace železa a mědi také negativně ovlivňuje chuťovou stabilitu piva. [13]

2.2 Antioxidanty

V míchaných nápojích na bázi piva se vyskytují antioxidanty, které pochází z ovocných šťáv a koncentrátů a dále ze surovin používaných k výrobě piva. Antioxidanty jsou přidávány také uměle z technologických důvodů, nejčastěji k prodloužení trvanlivosti. Antioxidanty jsou sloučeniny nebo systémy, které zamezují autooxidačním procesům inhibicí vznikajících radikálů nebo zamezují propagaci volných radikálů jedním z následujících procesů:

- vychytáváním sloučenin způsobujících oxidaci,
- chelatací kovových iontů tak že jsou neschopné tvořit reaktivní sloučeniny nebo rozkládat lipidové peroxidy,
- zabránění vzniku peroxidů odstraňováním $\cdot\text{O}_2^-$,
- inhibicí autooxidativní řetězové reakce,
- redukcí lokální koncentrace volného kyslíku

Nejefektivnější jsou antioxidanty, které narušují autooxidativní řetězové reakce. Ve své struktuře nejčastěji obsahují aromatickou nebo fenolickou funkční skupinu, která odevzdává vodík vzniklým volným radikálům, a samy se stávají radikálem. Tyto meziprodukty jsou poté stabilizovány rezonanční

delokalizací elektronu v aromatickém kruhu. Dále mnoho fenolických sloučenin je odolných vůči ataku volným kyslíkem ze sterických důvodů. Dalším účinným mechanismem k zabránění oxidačních reakcí je chelatace přechodných kovů které se mohou ve vzorku vyskytovat. Účinnost antioxidantů je závislá na aktivační energii, rychlostní konstantě, oxidačně-redukčním potenciálu systému, na termolabilitě a rozpustnosti daného antioxidantu. [15]

2.2.1 Antioxidanty vyskytující se v pivu

Antioxidanty v pivu lze rozdělit dle jejich původu na antioxidanty sladu a antioxidanty chmele. V nealkoholické složce používané k výrobě míchaných nápojů může být obsažen významný podíl antioxidantů, pokud je použita kvalitní ovocná šťáva nebo koncentrát.

2.2.1.1 Antioxidanty ječmene

Mezi jejich nejdůležitější chemické vlastnosti patří jejich antioxidační aktivita a schopnost reagovat s proteiny za tvorby vysokomolekulárních komplexů. [6]. Tvorba polyfenol-bílkovinných komplexů negativně ovlivňuje koloidní stabilitu piva, zatímco redukční schopnost a schopnost vychytávání volných radikálů působí pozitivně na senzoryckou stabilitu piva i na lidské zdraví. Polyfenoly se vykytují v potravě jako přirozené antioxidanty a mohou snižovat pravděpodobnost výskytu některých civilizačních chorob konzumentů. V této souvislosti se uplatňují především antiaterosklerotické, antikarcinogenní, případně fytoestrogenní účinky některých polyfenolových látek. [5]

2.2.1.2 Chmelové silice

Chmelové silice jsou směsí několika set organických látek převážně terpenického charakteru. Rozlišují se frakce, uhlovodíková, kyslíkatá a frakce sirných sloučenin. Uhlovodíková frakce chmelových silic je v čerstvém chmelu obsažena ze 70-80 %. Obsahuje alifatické uhlovodíky, monoterpeny a seskviterpeny. Nejdůležitější složkou silic jsou monoterpeny a seskviterpeny. Kyslíkatá frakce tvoří asi 30 % celkového obsahu silic a vzniká během zrání, zpracování a skladování chmele. Je složena ze směsi terpenových, seskviterpenových, alifatických a aromatických alkoholů, aldehydů, ketonů epoxidů, kyselin a esterů. Frakce sirných sloučenin tvoří 0,1 % chmelových silic. [8]

2.2.1.3 Polyfenoly chmele

Polyfenolové látky chmele a chmelových výrobků zahrnují bohatou směs s převažujícím podílem flavinových glykosidů, anthokyanogenů, katechinů a volných fenolových kyselin. Jsou to vesměs reaktivní, ve vodných roztocích dobře rozpustné látky, snadno podléhající oxidačně-redukčním přeměnám a vykazující vysokou reaktivitu vůči bílkovinám. V pivovarském procesu se polyfenoly významně podílejí na reakcích vzniků nerozpustných tříslo-bílkovinných komplexů při tvorbě lomu a vylučování hořkých kalů a dále při řadě oxidačně redukčních reakcí uplatňujících se při vytváření barvy a koloidní stability piva. Předpokládá se, že ovlivňují charakter hořkosti a v posledních letech se zdůrazňují jejich pozitivní účinky jako přirozených antioxidantů. V pivovarském procesu se uplatňují spolu s polyfenolovými látkami sladu, které mají obdobné složení, ale rozdílné poměry jednotlivých skupin polyfenolických složek. [5]

2.3 Spektroskopické metody

Spektroskopické metody se zabývají studiem interakce látek se zářením. Ze změřených frekvencí absorbovaného nebo emitovaného záření poskytuje spektroskopie důležité informace o energetických hladinách studovaných látek. Teoretická interpretace těchto energetických hladin, která je založená na zákonech kvantové mechaniky, dovoluje z naměřených dat získat informace o struktuře studovaných látek. Podle druhu energetických přechodů lze rozdělit spektroskopické metody na vibrační a rotační spektroskopie, elektronová spektrometrie a magnetické rezonanční metody. [16]

U vibrační a rotační spektroskopie dochází k přechodům mezi různými rotačními a vibračními stavy molekul. Tyto přechody jsou pozorovatelné v mikrovlnné a infračervené oblasti elektromagnetického záření. Mezi tyto metody se řadí IR spektroskopie. [17]

Přechody mezi různými elektronovými stavy molekul u elektronové spektrometrie vedou k absorpci nebo emisi záření v infračervené, viditelné a ultrafialové oblasti elektromagnetického záření. Elektronové přechody jsou zpravidla doprovázeny přechody mezi různými vibračními a rotačními stavy molekul. Velký počet různých vibračních a rotačních přechodů v rámci daného elektronového přechodu způsobuje, že jsou elektronová spektra zpravidla složena z velkého počtu čar, které v důsledku svého rozšíření vytvářejí jeden široký tzv. elektronový pás. K elektronové spektrometrii se řadí UV-VIS spektroskopie. [16]

Magnetické metody, mezi které se řadí i nukleární magnetická rezonance a elektronová paramagnetická rezonance, jsou založeny na vzájemné interakci jaderného nebo elektronového momentu hybnosti s vnějším magnetickým polem. [16]

2.3.1 UV-VIS spektroskopie

Tyto techniky jsou založeny na sledování přechodů mezi různými elektronovými stavy molekul při absorpci elektromagnetického záření zředěnými roztoky molekul. V UV-VIS oblasti spektra (200–800 nm) souvisí absorpce záření s přechodem valenčního elektronu mezi dvěma i více energetickými hladinami v molekule. Absorpci záření lze pozorovat ve všech skupenstvích.

2.3.1.1 Základní vztahy

Všechny absorpční metody v oboru optických spekter jsou založeny na měření propustnosti. Záření dopadající na vzorek může být absorbováno, odraženo nebo rozptýleno. Pokud vzorek absorbuje dané záření, dochází k poklesu intenzity záření. Propustnost (transmitance) T je definována poměrem toku záření soustavou propuštěného Φ k toku vstupnímu Φ_0 :

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (4)$$

Absorptance je podíl absorbovaného záření:

$$\alpha = \frac{\Phi_0 - \Phi}{\Phi_0} = 1 - T \quad (5)$$

Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance vztahem:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = -\log T \quad (6)$$

Hodnoty propustnosti a absorptance se často uvádějí v procentech.

Bouguerův-Lambertův-Beerův zákon matematicky popisuje závislost koncentrace absorbující látky na tloušťce absorbující vrstvy a hodnotě absorbance při určité vlnové délce podle vzorce:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (7)$$

kde ε_λ je molární absorpční koeficient

Lambert-Beerův zákon je mezní zákon, který platí jen pro monochromatické záření a zředěné roztoky, v nichž absorbující částice nepodléhají žádným interakcím. [18]

2.3.1.2 Teoretický princip UV-VIS spektroskopie

Za běžných podmínek jsou molekuly v základní elektronové i vibrační hladině. Při pohlcení fotonu se celková energie molekuly zvyšuje a molekula přechází do excitovaného stavu. Přechod z nižší do vyšší elektronové hladiny může probíhat do různých vibračních a rotačních podhladin molekuly, počet energeticky blízkých možných elektronových přechodů je u molekul velký. Tyto blízké přechody

nejde běžně rozlišit jako jednotlivé čáry a výsledné absorpční spektrum molekul splývá v plynulé pásy, které se objevují při určité vlnové délce, typické pro sledovanou molekulu. Rozdíl energie mezi excitovaným E_1 a základním E_2 stavem musí být roven přijatému kvantu záření podle rovnice:

$$h \cdot \nu = E_1 - E_0 \quad (8)$$

Absorpce záření je spojena se změnou momentu elektrického dipólu molekuly a proto dojde ke změně rozložení náboje molekuly v excitovaném stavu oproti základnímu stavu. Molekula setrvává v excitovaném stavu velmi krátkou dobu (řádově 10^{-9} s) a poté přechází různými nezářivými deexcitačními mechanismy do základního stavu, čímž se udržuje rovnováha mezi molekulami v základním a excitovaném stavu. [19] Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Tvar pásu je více či méně symetrický s maximem při určité vlnové délce λ_{\max} . Absorpční spektra složitých molekul mají obvykle více absorpčních pásů, které se často překrývají a vytvářejí křivky s nevýraznými maximy. Polohu pásu určují energie orbitalů, mezi kterými dochází k přechodu elektronu při excitaci. V organických molekulách jsou vazby tvořeny hybridními orbitály. Tyto molekulové orbitály vznikají interakcemi atomových orbitalů s a p. Organické molekuly poskytují následující typy přechodů elektronů mezi orbitály [18]:

- Přechody $\sigma \rightarrow \sigma^*$
- Přechody $n \rightarrow \sigma^*$
- Přechody $\pi \rightarrow \pi^*$
- Přechody $n \rightarrow \pi^*$
- Přechody $\pi \rightarrow \sigma^*$

Rozlišují se tři typy přechodů molekuly do excitovaného stavu:

- Přechody dovolené
- Přechody spinově zakázané
- Přechody symetricky zakázané

2.3.1.3 Využití UV-VIS spektroskopie k detekci volných radikálů

UV-VIS spektroskopické metody je možné využívat k detekci volných radikálů. Tyto metody ale mohou měřit pouze radikály, které vykazují absorpci záření v UV-VIS oblasti. Jednou z využívaných metod k určení antioxidační kapacity roztoku vzorku je detekce odbarvování roztoku DPPH v závislosti na snižující se koncentraci DPPH při terminaci volných radikálů vzorkem. [20] UV-VIS spektrometrie lze využít ke sledování obsahu polyfenolů v pivu. V důsledku tepelného namáhání vzorku dochází k oxidaci polyfenolů na taniny, které s bílkovinami tvoří nerozpustné sloučeniny. Pokles absorbance vzorku je spojen s klesajícím obsah polyfenolů a s nárůstem volných radikálů. Polyfenoly obsažené v pivu jsou ale relativně stabilní a jejich obsah nekoreluje dostatečně citlivě s nárůstem volných radikálů ve vzorku a tím i se zhoršením organoleptických vlastností piva. Použití UV-VIS k detekci narůstající koncentrace radikálů vázaných na PBN není možné. [21]

2.3.2 IR Spektrometrie

IR spektrometrie je založena na interakci elektromagnetického záření s měřeným vzorkem. V IR spektrometrii se běžně místo vlnové délky užívá vlnocet. Energie IR záření nestačí na změny elektronových stavů a způsobuje pouze změnu rotačního a vibračního stavu molekuly. Tato změna se může uskutečnit pouze přechodem mezi dvěma stavy charakterizovanými různými vibračními či rotačními čísly. [22]

Tabulka 1: Charakteristika jednotlivých IR oblastí [18]

IR oblast	Vlnová délka [μm]	Vlnočet [cm^{-1}]
Blízká	0,78 – 2,5	12800 – 4000
Střední	2,5 – 50	4000 – 200
Vzdálená	50 - 1000	200 - 10

Za normálních podmínek se většina molekul nachází v základním vibračním stavu ($\nu = 0$). Nejčtenější jsou přechody do vibračního stavu charakterizovaného kvantovým číslem $\nu=1$. Spektra získaná IR spektrometrií jsou vibračně-rotační a získávají se sledováním závislosti transmitance nebo absorbance na vlnočet absorbovaného záření. Pásky ve spektru odpovídají různým typům vibračních přechodů. Rozlišují se vibrace dvou základních typů:

- Valenční
- Deformační

U valenčních vibrací dochází k vibraci atomů podél vazby, kterou jsou spojeny. Při vibraci se mění vzdálenost jader, ale valenční úhel zůstává zachován. Naopak u deformačních vibrací dochází ke změně valenčního úhlu, ale vzdálenost jader zůstává konstantní. Deformační vibrace se označují podle vlastního charakteru vibrace na kývavé, krouživé a nůžkové vibrace. Základní podmínkou interakce IR záření s molekulou je změna dipólového momentu během vibrace. U homonukleárních molekul, které mají nulový dipólový moment, k absorpci IR záření nedochází. Změna dipólového momentu během vibrace souvisí s intenzitou absorpce záření. [18,23]

2.3.2.1 **Využití IR spektroskopie k detekci volných radikálů**

IR spektrometrie se používá nejčastěji k detekci radikálů při nízkých teplotách nebo naopak v plynném skupenství. Použití IR spektrometrie k detekci volných radikálů je obtížné kvůli nízké počáteční koncentraci radikálů a také molekuly vody v kapalném stavu způsobují rušení spektra. Z důvodů potřeby pevného nebo plynného vzorku není možné použít IR spektroskopii k měření nárůstu koncentrace volných radikálů při tepelně urychleném stárnutí piva. [24]

2.3.3 **EPR spektroskopie**

Elektronová paramagnetická rezonance patří do skupiny magnetických rezonančních metod. Metodu lze využít pouze ke studiu systémů s paramagnetickou povahou. Tato metoda poskytuje velmi cenné informace o struktuře a vlastnostech látek, které obsahují nepárový elektron. Mezi látky obsahující nespárovaný elektron se řadí volné radikály, široká řada koordinačních molekul obsahujících přechodové prvky, které mají neúplně obsazené d-orbitaly. EPR spektroskopii lze použít při studiu radikálových meziproductů chemických reakcí.

2.3.3.1 **Základní princip EPR**

Elektron je elementární částice nesoucí záporný náboj, která má spinový moment hybnosti (spin) s . Tento spinový moment je kvantovaný a pro jeho absolutní hodnotu platí

$$|s| = \hbar \sqrt{s(s+1)} \quad (9)$$

kde s je spinové kvantové číslo, které má pro elektron hodnotu $s = 1/2$.

V magnetickém poli může zaujmout jen určité diskrétní orientace. Projekcí nepárového elektronu do vnějšího magnetického pole dojde k rozštěpení původně degenerované energetické hladiny na dvě energetické hladiny s odlišnou energií. Tento jev se označuje jako Zeemanovo štěpení a vzniklé energetické hladiny se nazývají Zeemanovy. Touto projekcí se získá hodnota tzv. magnetického spinového čísla M_s . Počet možných orientací spinu v magnetickém poli lze vyjádřit rovnicí

$$M_s = 2s + 1 \quad (10)$$

V případě elektronu se jedná o dvě možné orientace ($M_s = \pm 1/2$). Energetický stav elektronu s hodnotou $M_s = 1/2$ se označuje jako stav α , stav s hodnotou $M_s = -1/2$ se označuje β .

Pokud je magnetické pole orientováno ve směru osy z, potom složka indukce magnetického pole je

$$\mu_z = \gamma_e \cdot h \cdot M_s = -g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \quad (11)$$

Kde γ_e je gyromagnetický poměr elektronu;

h je $\frac{h}{2\pi}$, $h = 6,62608 \cdot 10^{-34}$ J·s;

M_s je magnetické spinové číslo;

g_e je g-faktor volného elektronu ($g_e = 2,00231930486$);

β_e je Bohrov magneton $\beta_e = \frac{e \cdot h}{-2 \cdot m_e} = 9,2740154 \cdot 10^{-24}$ J·T⁻¹

Pro energii elektronu v magnetickém poli při zohlednění předchozích úvah platí:

$$E = -\mu_z B = g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \cdot B \quad (12)$$

Z rovnice (12) je možné po dosažení přípustných hodnot pro $M_s = \pm 1/2$ získat vztah popisující vzdálenost obou Zeemanových hladin.

$$\Delta E = h \cdot \nu = -\mu_z B = g_e \cdot \beta_e \cdot B_r \quad (13)$$

kde B_r představuje indukci statického magnetického pole;
 ν je frekvence zdroje záření

Tato rovnice je zároveň rovnicí rezonanční podmínky v EPR spektroskopii. B_r představuje indukci statického magnetického pole, ν je frekvence zdroje záření, při které je splněna rezonanční podmínka a je možné pozorovat přechod elektronu mezi oběma energetickými hladinami.

Splnit rezonanční podmínku v EPR lze dvěma způsoby. Prvním způsobem je měření při konstantní frekvenci ν_r , kdy je plynule měněna hodnota indukce magnetického pole B až do dosažení hodnoty splňující rezonanční podmínku. Druhým způsobem měření využívaným v pulzní EPR spektrometrii, kdy se mění frekvence záření při konstantní hodnotě magnetického pole. Běžné spektrometry používají hodnotu indukce magnetického pole kolem $B_0 = 0,34$ T. Pro splnění rezonanční podmínky je

proto potřebná frekvence elektromagnetického záření $\nu = \frac{g_e \beta B_0}{h} \approx 9,5$ GHz, což odpovídá vlnové

délce přibližně 3 cm (tzv. X-pásmo). Někdy se také používá elektromagnetické záření o frekvenci přibližně 20 GHz (tzv. K-pásmo), které vyžaduje po splnění rezonanční podmínky přibližně 0,72 T.

V závislosti na frekvenci použité pro měření v EPR spektrometru je možné EPR spektrometrii rozdělit na několik pásem. Každé pásmo umožňuje získat specifické informace o struktuře vzorku, pro lepší identifikaci je často využívána kombinace více pásem. [17,25]

Tabulka 2: Přehled pásem a frekvencí EPR spektrometrů [26]

<i>Pásmo</i>	<i>Frekvence [GHz]</i>
L	1
S	3
X	9-10
K	24
Q	34
W	94

2.3.3.2 *g-faktor*

Ve vzorku může kromě vnějšího magnetického pole (\mathbf{B}_{ext}) existovat i lokální magnetické pole ($\mathbf{B}_{\text{local}}$). Vektorovým součtem lokálního magnetického pole a vnějšího magnetického pole se získá tzv. celkové efektivní magnetické pole (\mathbf{B}_{eff}).

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_{\text{ext}} + \mathbf{B}_{\text{local}} \quad (14)$$

Lokální magnetické pole může být indukováno vnějším magnetickým polem nebo může být permanentní, které není závislé na vnějším magnetickém poli. Pro lokální magnetické pole indukované vnějším magnetickým polem platí:

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = (1 - \sigma)\mathbf{B} = \frac{g}{g_e}\mathbf{B} \quad (15)$$

kde σ je konstanta analogická k tzv. konstantě stínění jádra používané u NMR, g je tzv. efektivní Zeemanův g -faktor

Hodnota g pro elektron bez interakce s okolními částicemi je $g_e = 2,0023$. [17] Odchylka g od g_e závisí na schopnosti vnějšího magnetického pole indukovat v radikálu nebo komplexu lokální magnetické pole. Mnoho volných radikálů a přechodných kovů má hodnotu g velmi blízkou hodnotě g_e . Naproti tomu mnohé systémy vykazují od této teoretické hodnoty značné odchylky a ve výjimečných případech vykazují i záporné hodnoty g . Studium g -faktoru lze získat některé informace o elektronové struktuře studovaného radikálu nebo komplexu. [27] U anizotropních systémů je potřeba uvažovat o závislosti hodnoty g -faktoru na orientaci látky v magnetickém poli. Hodnoty g se v těchto případech udávají v maticovém tvaru. Systémy s izotropními vlastnostmi, mezi které patří i roztoky s nízkou viskozitou, mají nezávislou hodnotu g -faktoru na orientaci vzorku v magnetickém poli, proto platí:

$$g_x = g_y = g_z \quad (16)$$

a udávaná hodnota g představuje v těchto systémech tzv. efektivní g -faktor ze všech možných orientací látky v magnetickém poli. V izotropních systémech je g -faktor zároveň identický se středem spektra. [25]

2.3.3.3 *Hyperjemná struktura*

Hyperjemná struktura je důležitou vlastností EPR spekter. Jedná se o rozštěpení jednotlivých rezonančních čar na složky. Zdrojem hyperjemné struktury je magnetická interakce mezi elektronem a magnetickým dipólovým momentem jader v radikále nebo komplexu. K této interakci přispívají dipól-dipólová interakce a Fermiho kontaktní interakce.

Pro dipól-dipólovou interakci je charakteristické, že je anizotropní, tzn. její velikost a znaménko závisí na orientaci radikálu vzhledem k vnějšímu poli. V případě volného pohybu radikálu je dipól-dipólová interakce nulová, proto se pozoruje pouze u radikálů zachycených v tuhých látkách. Tato interakce se pozoruje u látek, které mají elektrony v p -orbitalu.

U Fermiho kontaktní interakce je elektron v s -orbitalu sféricky rozložen okolo jádra a má proto nulovou dipól-dipólovou interakci s jádrem. Kontaktní interakce je izotropní, tzn. nezávisí na orientaci radikálu. Projevuje se i v případě rychle a neuspořádaně se pohybujících molekul za předpokladu že alespoň část spinové hustoty má s -charakter.

Hyperjemná struktura EPR spekter je důsledkem hyperjemného štěpení. Proton je zdrojem magnetického pole a v závislosti na orientaci jaderného spinu se výsledné pole sčítá nebo odčítá od vnějšího pole. Celkové lokální pole poté je

$$\mathbf{B}_{\text{local}} = \mathbf{B}_r + \alpha \cdot m_I \quad (17)$$

kde α je konstanta hyperjemné interakce,
 m_I je magnetické jaderné kvantové číslo,
 \mathbf{B}_r je indukce magnetického pole, při které je splněna rezonanční podmínka.

Obecně jádro se spinem I štěpí spektrum na $2I+1$ hyperjemných čar stejné intenzity. [17] V přítomnosti n chemicky ekvivalentních jader se spinem I způsobí štěpení všech čar v EPR spektru $2 \cdot n \cdot I + 1$ rezonančních čar. Velikost konstanty a závisí na rozložení elektronové hustoty v blízkosti interagujících jader. Počet rezonančních čar v EPR spektru spolu s hodnotami štěpných konstant a poloha spektra, charakterizovaná hodnotou indukce magnetického pole B , resp. hodnota g -faktoru jsou důležitými charakteristikami, které umožňují spolehlivou identifikaci radikálu v systému. [17] Koncentrace radikálů přítomných ve vzorku se počítá z plochy EPR spektra. Pokud se nemění šířka spektrální čáry, je intenzita EPR signálu úměrná koncentraci radikálů v systému. [25]

2.3.3.4 *Spinové lapače*

Spinovými lapači se reaktivní kyslíkaté a organické radikály s krátkou dobou životnosti transformují na nitroxylové radikály. Spinové lapače jsou většinou aromatické organické sloučeniny na bázi pyroloxiidů a nitronů. Z původně diamagnetických sloučenin se stávají paramagnetické sloučeniny, které lze analyzovat pomocí EPR spektroskopie.

Nitronové spinové lapače reagují s volnými radikály prostřednictvím atomu uhlíku, který se nachází v poloze α vzhledem k atomu dusíku. Výsledný tvar EPR spektra a velikost štěpných konstant u těchto spinových lapačů jsou závislé na velikosti překryvu štěpných konstant nitroxylového dusíku a β vodíku. Hodnota štěpné konstanty β vodíku v aduktu je ovlivněna zejména velikostí molekuly zachyceného radikálu. Na hodnotu štěpné konstanty spinových aduktů má vliv i polarita použitého rozpouštědla. Čím je rozpouštědlo polárnější, tím je vyšší spinová hustota na dusíku a zároveň se spinovou hustotou se zvyšuje hodnota štěpné konstanty dusíku.

Jedním z nitronových lapačů je α -fenyl- N -tercbutyl-nitron (PBN). Má lipofilní charakter, proto se při použití ve vodném prostředí používá roztok PBN rozpuštěného v etanolu. [25]

2.3.3.5 *Charakterizace stability piva pomocí EPR*

Koncentrace radikálu v pivu při stárnutí za normálních podmínek je velmi nízká a experimentálně těžce detekovatelná. EPR je vhodná pro stanovení stability piva, protože dokáže detekovat i velmi nízké koncentrace volných radikálů ve vodném prostředí. Pro měření se stárnutí piva a tím i tvorba radikálů urychluje zvýšením teploty vzorku. Pro detekci vznikajících radikálů je do vzorku přidán spinový lapač PBN, který se při zachycení přemění na adukt. Při charakterizaci stability piva se vychází z předpokladu, že iniciátorem stárnutí je kyslík a z něj vzniklé radikály $\cdot R$. Tyto reaktivní radikály iniciují oxidační reakce, během kterých se tvoří nežádoucí produkty stárnutí. Pivo v závislosti na kvalitě má vlastní antioxidační kapacitu, která je schopna terminovat reaktivní radikály. Po vyčerpání antioxidační kapacity dochází k náhlému nárůstu volných radikálů. Tyto volné radikály tvoří spolu s PBN adukt. Pomocí časové závislosti změny intenzity spektra aduktu při zvýšené teplotě lze charakterizovat stabilitu piva. [28]

3 CÍL PRÁCE

V teoretické části práce je uvedeno, že problematika studia stability nápojů pomocí EPR, zejména piva typu ležák, je poměrně dobře rozpracována. Problému sledování stability míchaných nápojů, např. piva typu Radler, však nebyla věnována žádoucí pozornost.

S ohledem na uvedené skutečnosti si tato práce klade za cíl:

- Zpracování teoretického přehledu k dané problematice.
- Charakterizace termooxidační stability u míchaných nápojů na bázi piva s ohledem na technologické podmínky jejich výroby.
- Vyhodnocení získaných experimentálních charakteristik s ohledem na stabilitu a trvanlivost studovaných vzorků.
- Korelace výsledků s existujícím stavem poznatků v dané problematice.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V rámci experimentální části byly proměřeny vzorky míchaných nápojů na bázi piva typu Radler a byla sledována doba, za jakou dojde k prudkému nárůstu volných radikálů z v důsledku narušení vnitřní antioxidační rovnováhy. Výsledky pro piva Radler byly porovnány s výsledky pro neaditivované, klasické vzorky piva typu ležák od stejných výrobců s porovnatelnou stupňovitostí, a pokud to bylo možné, s porovnatelným datem výroby.

4.1 Vzorky a použité chemikálie

Všechny vzorky míchaných nápojů na bázi piva byly komerční výrobky českých pivovarů balených ve skleněné láhvi nebo plechovém obalu. Jako referenční vzorky byly použity vzorky piva typu ležák od stejných výrobců s pokud možno porovnatelným datem výroby (komerční vzorky piv bez aditivace).

V experimentech byl použit spinový lapač α -phenyl-N-t-butyl-nitron (krystalický PBN), komerční produkt firmy Sigma Aldrich (pobočka Bratislava). Etanol (96%, v/v, potravinářské čistoty), denaturovaný etanol a aceton byly komerční produkty firmy Lambda Life (pobočka Bratislava). Na propláchnutí měřící cely byla použita deionizovaná voda (Rodem 6).

4.2 Základní charakterizace vzorků

Tabulka 3: Obsah alkoholu, minimální trvanlivost a číslo šarže použitých vzorků

Vzorek	Obsah alkoholu [% obj.]	Minimální trvanlivost	Číslo šarže
Staropramen světlý (reference)	4,0	18.06.2013	13:35 315
Staropramen cool lemon	2,0	21.08.2013	M0023
Staropramen cool grep	2,0	25.08.2013	M0122
Zlatopramen 11° (reference)	4,9	04.2013	L23D1G0149
Zlatopramen citron	2,0	04.2013	L2294203A1922
Zlatopramen pomeranč a zázvor	2,0	09.2013	L3073203A1453

4.2.1 Složení použitých vzorků

Výrobce udávané složení bylo opsáno z etikety, jednotlivé složky jsou seřazeny podle klesající koncentrace.

4.2.1.1 *Staropramen světlý (reference)*

Voda, ječný slad, ječmen, maltózový sirup, chmelové produkty, izomerizovaný chmelový extrakt

4.2.1.2 *Staropramen cool lemon*

Pivo výčepní světlé 50 % (Voda, ječný slad, ječmen, maltózový sirup, chmelové produkty)

Rekonstituovaná ovocná složka 50 % (voda, citronová šťáva z koncentrátu, fruktózový sirup, konc. pomerančový a citronový extrakt, pomerančová šťáva z koncentrátu, přírodní aroma, sladidlo: steviol-glykosidy (extrakt ze stevie), stabilizátory: pektin, karubin, antioxidant: kyselina askorbová)

4.2.1.3 Staropramen cool grep

Pivo výčepní světlé 50 % (Voda, ječný slad, ječmen, maltózový sirup, chmelové produkty)

Rekonstituovaná ovocná složka 50 % (voda, fruktózový sirup, citronová, grapefruitová a pomerančová šťáva z koncentrátu, kyselina citronová, regulátory kyselosti: citrát draselný, mléčnan vápenatý, uhličitán hořečnatý, přírodní aroma, antioxidant: kyselina askorbová, sladidlo: steviol-glykosidy, (extrakt ze stevie), stabilizátory: karubin, pektin, barvivo: karmíny)

4.2.1.4 Zlatopramen 11* (reference)

Pitná voda, ječný slad, upravený chmel, chmelové produkty

4.2.1.5 Zlatopramen citron

Pivo (Pitná voda, ječný slad, upravený chmel, chmelové produkty)

Nápojový koncentrát (pitná voda, fruktóza, citronový koncentrát, pomerančový koncentrát, regulátor kyselosti kyselina citronová, stabilizátory: arabská guma, glycerylsteroly dřevěných pryskyřic, karubin, přírodní aroma, antioxidant: kyselina askorbová, přírodní extrakt s vysokým obsahem tokoferolů, askorbylpalmitát, extrakt z lemongrass

4.2.1.6 Zlatopramen pomeranč a zázvor

Pivo (Pitná voda, ječný slad, upravený chmel, chmelové produkty)

Nápojový koncentrát (pitná voda, fruktóza, pomerančový koncentrát, pomerančový extrakt, zázvorový koncentrát, citronový koncentrát, regulátor kyselosti: kyselina citronová, citrát sodný, stabilizátory: arabská guma, karubin, přírodní aroma, antioxidant: kyselina askorbová, barvivo: beta-karoten)

4.3 Příprava roztoků a vzorku na měření

Roztok spinového lapače PBN byl připraven rozpuštěním 150 mg krystalického PBN v 2 ml 96 % etanolu (v/v). Vzorek 20 ml příslušného piva byl nejprve probubláván dusíkem po dobu jedné minuty, aby se ze vzorku odstranil rozpuštěný CO₂. Následně byl ke vzorku přidán roztok PBN a po důkladném promíchání byl takto získaný roztok vložen do termostatu vytemperovaného na teplotu 60±1 °C. Při této teplotě byl vzorek udržován po dobu 120 minut, a v 10 minutových intervalech byl ze vzorku odebrán 1 ml roztoku, který byl poté pomocí injekční stříkačky umístěn do speciální křemenné kyvety uzpůsobené na měření v poloprůtočném režimu, která byla po celou dobu měření fixována v dutině EPR spektrometru. Okamžitě po umístění vzorku do kyvety začalo měření EPR spektra podle parametrů uvedených níže.

Všechny roztoky byly připravovány jako čerstvé, bezprostředně před prvním měřením příslušného vzorku. Z důvodů reprodukovatelnosti měření, byly z každého vzorku piva stejnou procedurou realizovaná dvě opakovaná měření, zpravidla bezprostředně po sobě ve stejný den. V případě rozdílů v integrální intenzitě EPR spektra mezi dvěma měřeními přesahujícímu 5 % bylo z příslušné vzorky vykonané ještě další kontrolní měření.

4.4 Použité přístroje

EPR spektra byla zaznamenána na EPR spektrometru e-scan firmy Bruker s příslušenstvím v EPR laboratoři Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě. Část porovnávacích měření byla nezávisle na v práci prezentovaných pokusech realizována na EPR spektrometru Magnetech v laboratoři Fakulty chemické VUT Brno, kde jsme zároveň rozšířili možnosti měření pomocí ploché křemenné kyvety.

Měření na EPR spektrometru e-scan bylo realizováno pomocí ploché křemenné kyvety s vnitřním objemem 350 µl, uzpůsobené tak, aby v ní bylo možné realizovat měření v poloprůtočném režimu

(nový vzorek byl nastříknut do kyvety pomocí injekční stříkačky v objemu, který zaručuje dokonalé propláchnutí měřící soustavy novým vzorkem). Měření bylo realizováno s těmito typickými parametry, které se po celou sérii měření neměnily:

- Střed magnetického pole – central field – CF= 349,5 mT
- Šířka spektrálního okna – Sweep width – SW= 8 mT
- Zesílení/citlivost – Receiver Gain – G= $3,99 \times 10^3$
- Modulační amplituda – Modulation – 0,294 mT
- Výkon/zeslabení mikrovlnného zdroje – MW attenuation/Attenuation = 6mW/10dB
- Délka 1 scanu – Sweep time = 5,24 s
- Počet scanů/spektrum – Number of scans, NS=40
- Čas měření jednoho spektra ~ 4 min
- Časový rozdíl mezi spektry ~ 10 min
- Počet spekter/vzorku ~ 12

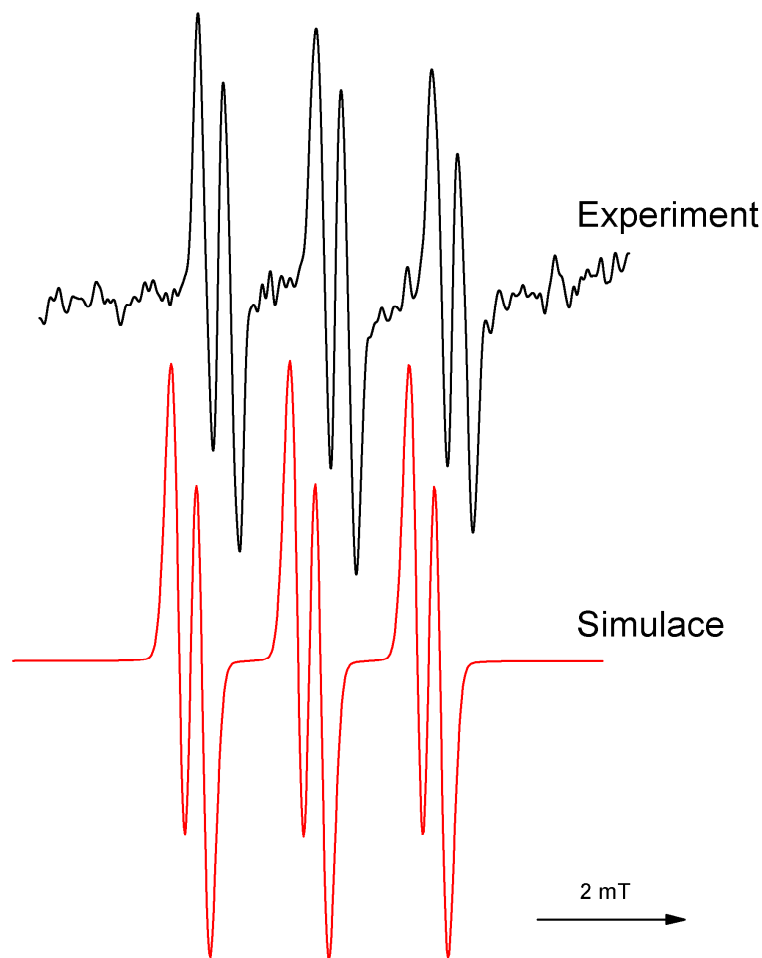
4.5 Zpracování naměřených EPR spekter

Zpracování celé série naměřených spekter pro všechny analyzované vzorky bylo realizováno vždy stejným postupem, aby byla zajištěná objektivita získaných údajů.

Naměřené spektra byly zaznamenány pomocí programu WinAcquisition (Bruker) a následně zpracovány programem WinEPR (Bruker) který umožňuje realizovat vyhlazení, korekci základní čáry jako i integraci naměřených spekter dle zvolených parametrů. Simulace naměřených spekter spinových aduktů byla uskutečněna pomocí programu WinSimFonia (Bruker). Grafické zpracování bylo realizováno v programu MicroCalc Origin.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

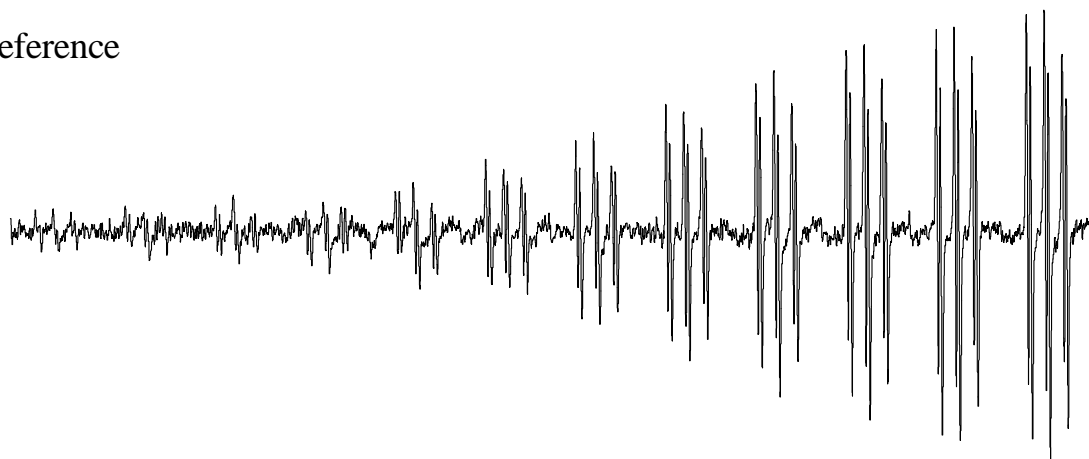
V důsledku termicky urychleného stárnutí dochází k postupné oxidaci vzorku piva a v důsledku toho v reakčním systému probíhají různé konkurenční reakce, zejména mezi radikály vzniklými v důsledku termooxidace a antioxidanty přirozeně přítomnými v pivě a/nebo jeho nealkoholické složce (u piv typu Radler) a rovněž mezi radikály a spinovým lapačem PBN přítomným v systému. Vyloučeny nejsou ani různé terminační reakce mezi jednotlivými typy radikálů, které během termicky urychleného stárnutí vzorku vznikají.



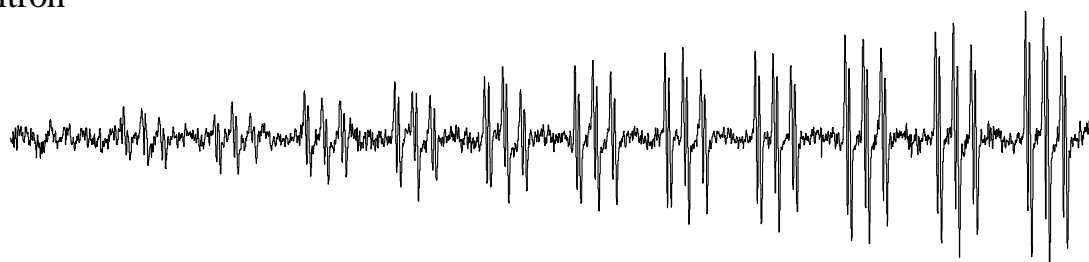
Obrázek 1 Experimentálně naměřené EPR spektrum PBN-spinového aduktu a jeho simulace. Experimentální spektrum bylo změřeno za podmínek popsanych v experimentální části. Parametry simulace: $a(N)=1.44$ mT, $a(H)=0.268$ mT, $g=2.0054$.

Zajímalo nás, jaký typ radikálových sloučenin se v systému tvoří. Analýza naměřeného typického EPR spektra pomocí simulačního programu WinSimFonia (obr. 1) ukázala, že obdobně jako u předchozích pozorování, popsanych v pracích např. Brezové et al., nebo Staška et al. [1,2], i u piv typu Radler v spektru dominují adukty odpovídající tvorbě uhlíkem-centrovaných radikálů s hodnotami štěpících konstant $a(N)=1.44$ mT, $a(H)=0.268$ mT, $g=2.0054$ což je v dobré shodě s hodnotami uvedenými v publikovaných pracích a také hodnotami uvedenými v databázi spinových lapačů. [1,2,29]

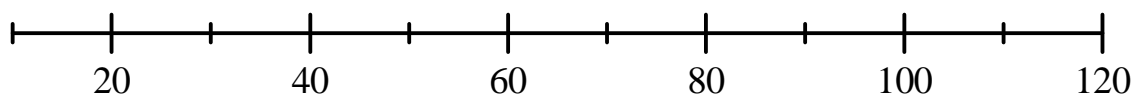
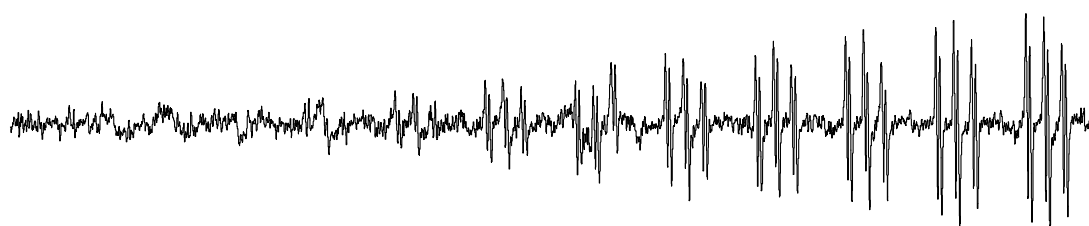
Reference



Citron



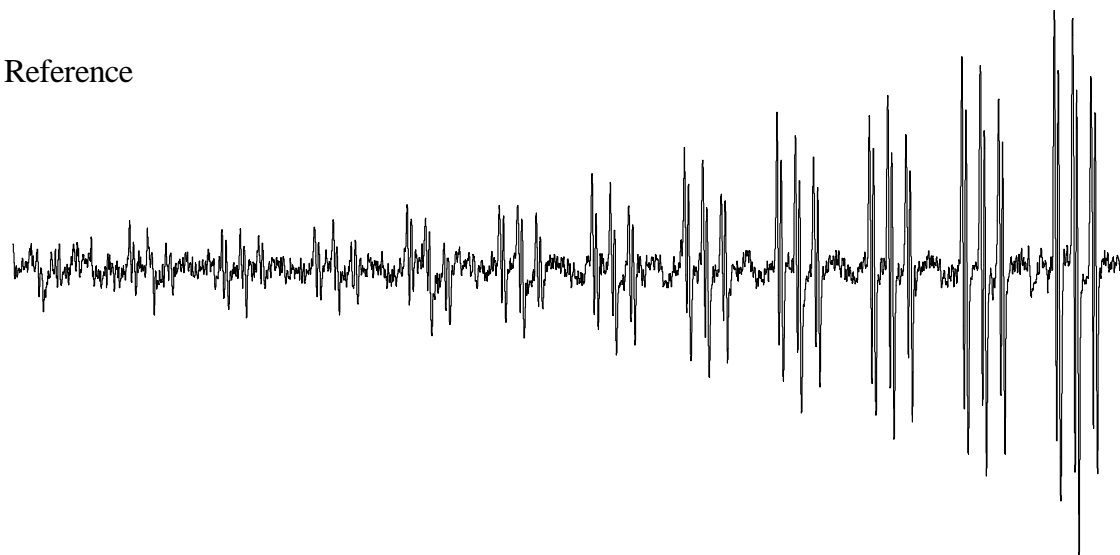
Pomeranč + zázvor



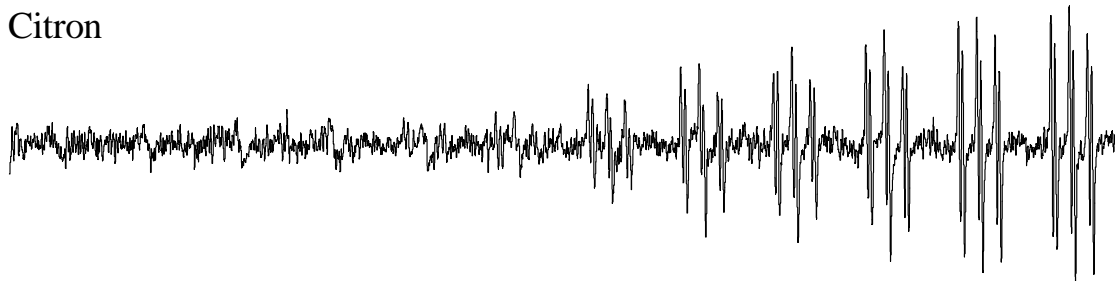
Čas namáhání, min

Obrázek 2 Závislost intenzity EPR spekter na čase termického namáhání při teplotě 60 °C pro vzorky od pivovaru Zlatopramen. Spektra byla měřena za podmínek popsanych v experimentální části.

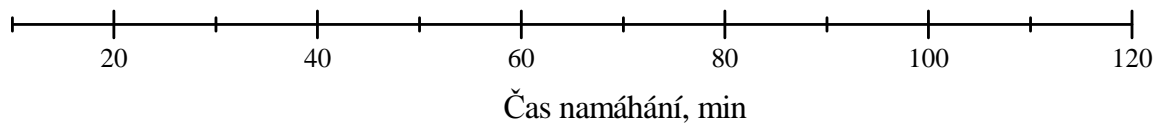
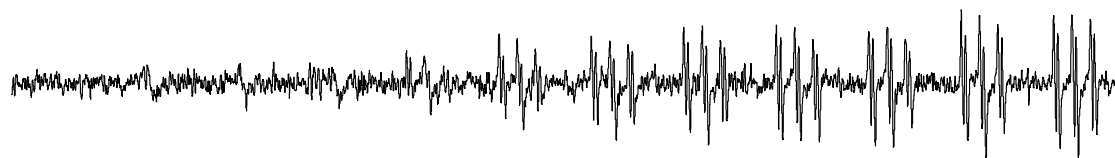
Reference



Citron



Grep



Obrázek 3 Závislost intenzity EPR spekter na čase termického namáhání při teplotě 60 °C pro vzorky od pivovaru Staropramen. Spektra byla měřena za podmínek popsanych v experimentální části.

Na obr. 2 a obr. 3 jsou znázorněny typické závislosti intenzity EPR spekter spinových aduktů naměřené v daných experimentálních podmínkách pro jednotlivé vzorky piva typu Radler, nebo komerčně dostupného klasického piva typu ležák, který byl použit jako referenční vzorek.

Z porovnání spekter je zřejmý očekávaný trend postupného nárůstu intenzity EPR spekter v závislosti od času trvání termického namáhání příslušné vzorky piva, jako důsledek nárůstu tvorby radikálových sloučenin, resp. tomu odpovídajícího nárůstu koncentrace spinových aduktů.

Na první pohled je zřejmá vyšší koncentrace spinových aduktů v obou referenčních vzorcích, ve srovnání s jim příslušným vzorkům piva typu Radler. Domníváme se, že tato skutečnost souvisí s vlivem nealkoholické složky, přidané do piva při výrobě piva Radler. Antioxidanty přítomné v nealkoholické složce piva typu Radler snižují celkovou koncentraci radikálů vznikajících během termicky urychleného stárnutí tím, že je přednostně terminují a tím znemožňují tvorbu spinových aduktů s PBN.

Za účelem zjištění odolnosti piva vůči termickému namáhání byla z naměřených časových závislostí intenzity EPR spekter určena délka indukční periody. Tento parametr byl určen z integrovaného EPR spektra, resp. spekter způsobem, který je názorně zobrazen na obr. 4. Jak je uvedeno v experimentální části práce, u každého vzorku piva bylo měření opakováno minimálně dvakrát, přičemž následně pro každou sérii EPR spekter byla určena délka indukční periody a průměrná délka indukční periody pro příslušný vzorek piva. Hodnoty indukčních period, jejich průměrné hodnoty a směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tab. 4.

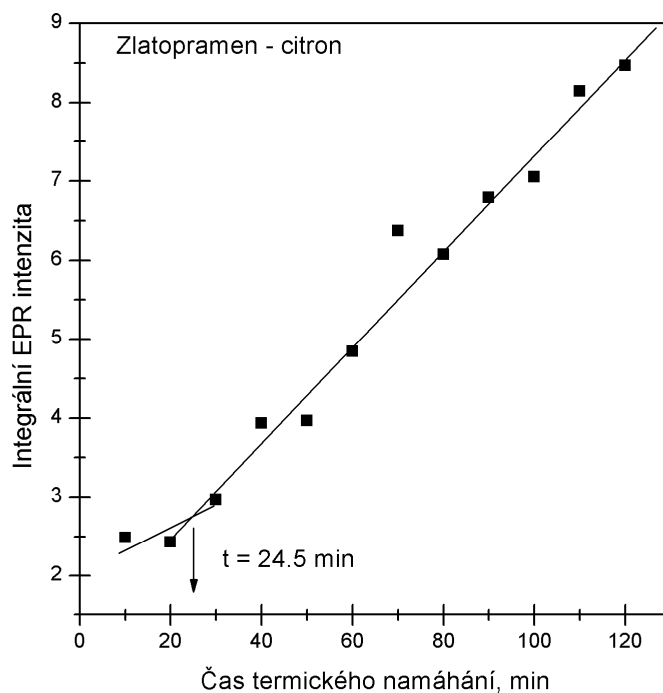
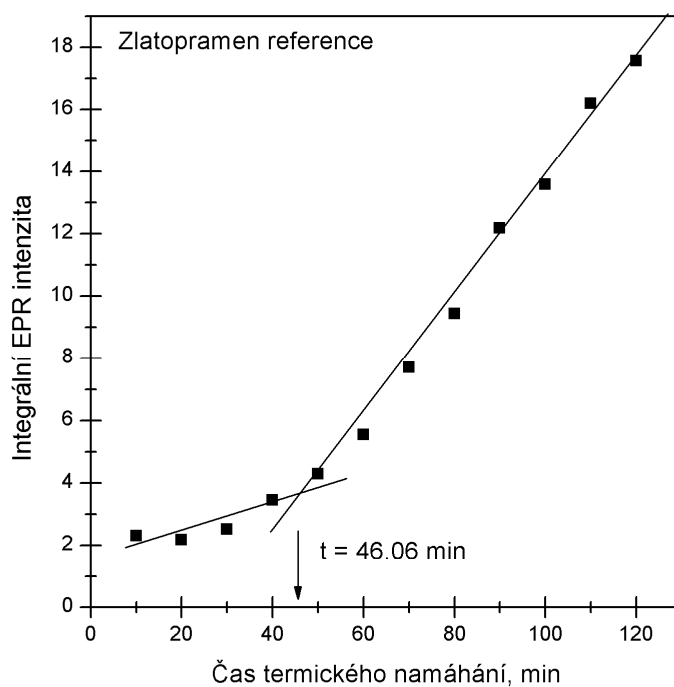
Tabulka 4: Časy indukční periody u jednotlivých vzorků, průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=2$)

Označení vzorku	Vzorek	t_1 [min]	t_2 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	Směrodatná odchylka
S_{ref}	Staropramen světlý	48,1	46,6	47,4	1,1
S_{lem}	Staropramen cool lemon	50,9	46,9	48,9	2,8
S_{gr}	Staropramen cool grep	27,8	30,4	29,1	1,8
Z_{ref}	Zlatopramen 11°	46,1	45,7	45,9	0,3
Z_{pz}	Zlatopramen pomeranč a zázvor	42	36,6	39,3	3,8
Z_{cit}	Zlatopramen citron	24,5	22,7	23,6	1,3

Jak je uvedeno v předchozích částech práce, časy indukčních period určují čas termického namáhání, kdy došlo k prudkému nárůstu koncentrace volných radikálů z důvodu narušení/spotřebování vnitřní antioxidační rovnováhy. Tento parametr je možné výhodně využít jako charakteristiku trvanlivosti/stability nebo i kvality piva. [1,3]

Z hodnot průměrné délky indukčních period uvedených v Tab. 4 vyplývá, že u vzorků od pivovaru Staropramen měl nejvyšší stabilitu vzorek piva Staropramen cool lemon, porovnatelnou se stabilitou referenčního vzorku a vzorek Staropramen grep vykazoval nejnižší průměrnou stabilitu. U vzorků od pivovaru Zlatopramen nejvyšší stabilitu vykazoval referenční vzorek, nesledován pivem Zlatopramen pomeranč a zázvor a pivem Zlatopramen Citron, jehož délka indukční periody je přibližně jen 50% ve srovnání s referenčním vzorkem.

Získané výsledky naznačují, že míchaní hotových nápojů – včetně piva – s jinými složkami nebo aditivami může mít častokrát negativní vliv na výslednou trvanlivost takto vzniklého produktu, bez ohledu na to, že se v důsledku smíchání piva a nealkoholické složky zvyšuje antioxidační potenciál (prokázán nižší tvorbou radikálových sloučenin u piv typu Radler ve srovnání s odpovídajícím referenčním vzorkem). Obdobný výsledek byl také pozorován u experimentů, kde se do hotového piva přidávaly antioxidanty na bázi kyseliny askorbové, nebo tokoferolu. [1,3]



Obrázek 4 Závislost integrální EPR intenzity na době tepelného namáhání vzorků piva při teplotě 60 °C ilustrující průběh tvorby spinových aduktů a způsob určení délky indukční periody, tj. času vyčerpání vnitřní antioxidační kapacity vzorku piva v důsledku oxidačních procesů doprovázejících jeho termicky urychlené stárnutí

Obdobný jev byl také potvrzen v jiných experimentech EPR pracoviště Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě, kdy se pivo míchalo v různých poměrech s extrakty léčivých rostlin v etanolu. I v tomto případě, buďto se neprokázal žádný vliv přídatku extraktu na výslednou stabilitu piva, nebo bylo pozorováno mírné zhoršení stability výsledného nápoje. [30]

U absolutního porovnání délky indukčních period je však potřeba vzít v úvahu minimálně parametr čas od výroby do okamžiku měření, resp. čas zůstatkové trvanlivosti příslušného vzorku piva, který lze vyjádřit jako časový rozdíl mezi časem (dnem) měření a datem nejpozdější spotřeby vzorku uvedené na obalu výrobcem. Částečně je možné takovou korelaci udělat i v našem případě, vezmeme-li v úvahu údaje deklarované výrobcí, uvedené v Tab. 3. Z takového porovnání ale opětovně jednoznačně vychází, že přídatek nealkoholické složky má významný vliv na stabilitu míchaného nápoje typu Radler. Vezmeme-li v úvahu porovnatelné datum minimální trvanlivosti u referenční vzorky Zlatopramen a Radler Zlatopramen pomeranč – zázvor, a jejich průměrné hodnoty indukčních period které se po zohlednění směrodatné odchylky liší jen minimálně v prospěch referenční vzorky, a naopak, oba vzorky Radler Staropramen, které i navzdory porovnatelné zůstatkové trvanlivosti vykazují naprosto odlišné hodnoty indukční periody, je efekt přídatku nealkoholické složky nesporný.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že jakýkoliv technologický zásah do složení nápoje, i když se tím zlepšují některé, pro konzumenta důležité parametry, např. chuť, vůně nebo barva, se nemusí pozitivně projevit na technologicky významném parametru, jakým je celková stabilita nebo trvanlivost takto upraveného výrobku.

6 ZÁVĚR

V teoretické části práce jsou shrnuty základní parametry piva a míchaných nápojů na bázi piva typu Radler, jakož i postupy hodnocení jeho kvality, zejména z pohledu trvanlivosti nebo stability. Na základě provedených EPR experimentů byly porovnány stability u jednotlivých referenčních vzorků piv a vzorků míchaných nápojů na bázi piva typu Radler. Ze zjištěných hodnot indukčních period jako i celkového chování vzorků v podmínkách termicky urychlené oxidace lze konstatovat následující:

- a) Koncentrace volných radikálů u míchaných nápojů na bázi piva byla v průběhu měření nižší než u referenčních vzorků klasických piv stejných producentů
- b) Vliv přídavku nealkoholické složky do piva během výroby piva Radler je nejednoznačný, a zpravidla se projeví zkrácením stability takto připraveného nápoje
- c) Stabilita piv typu Radler je závislá také od druhu použité nealkoholické složky

Ucelená studie stability piv typu Radler si vyžaduje provést další experimenty, ve kterých se bude periodicky sledovat změna stability piva Radler během jeho skladování za výrobcem definovaných podmínek od okamžiku jeho výroby až do skončení jeho doby trvanlivosti. Také je vhodné zmapovat širší sortiment míchaných nápojů s nízkým obsahem alkoholu typu Radler, dostupný na českém, popřípadě i slovenském nebo jiném zahraničním trhu. Uvedené aspekty však nemohli být s ohledem na omezený časový prostor a rozsah předložené práce zohledněny už během experimentů prezentovaných v této práci a budou předmětem dalšího zkoumání pracovišť Fakulty chemické VUT Brno a EPR pracoviště Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě.

- [1] BREZOVÁ, Vlasta, POLOVKA, Martin, STAŠKO, Andrej. The influence of additives on beer stability investigated by EPR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. roč. 58, č. 6, s. 1279-1291. ISSN 13861425. DOI: 10.1016/S1386-1425(01)00717-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138614250100717X>
- [2] STAŠKO, Andrej, BREZOVÁ, Vlasta, BISKUPIČ, Stanislav, ŠMOGROVIČOVÁ, Daniela, SELECKÝ, Radoslav. Stability comparison of lager with dark and non-alcoholic beers using EPR spin trapping technique. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 58, pp. 35-44, 2005.
- [3] POLOVKA, Martin. Radikálové mezziprodukty v procese starnutia piva. Diplomová práce, CHTF STU, Bratislava, 2001.
- [4] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 246 s. ISBN 80-708-0239-1
- [5] KOSAR, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902-6586-3
- [6] DVOŘÁKOVÁ, Markéta., DOSTÁLEK, Pavel., HULÍN, Petr. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl*. 2006, roč. 52, č. 4, 111 -114
- [7] SCHÖNBERGER, C., KOSTELECKY, T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011, roč. 117, č. 3, s. 259-267. ISSN 00469750. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- [8] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7
- [9] BOULTON, Chris, QUAIN, David. *Brewing Yeast and Fermentation*. 1. vyd. UK: Blackwell Scienc, 2001. ISBN 9780470999400
- [10] EBLINGER, Hrsg. Hans M. *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. 1. Aufl. Weinheim, Bergstr: WILEY-VCH, 2009. ISBN 978-352-7316-748
- [11] SUZUKI, Koji. 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011, roč. 117, č. 2, s. 131-155. ISSN 00469750. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>
- [12] VRIESEKOOOP, Frank, KRAHL, Moritz, HUCKER, Barry, MENZ, Garry. 125 th Anniversary Review: Bacteria in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012, roč. 118, č. 4, s. 335-345. ISSN 00469750. DOI: 10.1002/jib.49. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.49>
- [13] STEWART, Graham. The Chemistry of Beer Instability. *Journal of Chemical Education*. 2004, roč. 81, č. 7, s. 963-. ISSN 0021-9584. DOI: 10.1021/ed081p963. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed081p963>
- [14] BAMFORTH, Charles. 125th Anniversary Review: The Non-Biological Instability of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011, roč. 117, č. 4, s. 488-497. ISSN 00469750. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00496.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00496.x>
- [15] DECKER, Eric. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Volume 2 - Management in Different Industry Sectors*. S.l.: Woodhead Publishing, 2010. ISBN
- [16] PELIKÁN, Peter. *Fyzikální chemie: struktura hmoty*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 238 s. ISBN 80-214-1583-5
- [17] ATKINS, Peter William. *Fyzikálna chémia. 2b časť*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 1999, 321 s. ISBN 80-227-1238-8
- [18] ČŮTA, František, HEJTMÁNEK, Miloš, KARLÍK, Milan, KSANDR, Zbyněk, KUČERA, Zdeněk, POLEJ, Bohumil, VOLKA, Karel. *Instrumentální analýza*. Praha: SNTL, 1986

- [19] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2
- [20] SANNA, Daniele, DELOGU, Giovanna, MULAS, Maurizio, SCHIRRA, Mario, FADDA, Angela. Determination of Free Radical Scavenging Activity of Plant Extracts Through DPPH Assay: An EPR and UV/Vis Study. *Food Analytical Methods*. 2012, roč. 5, č. 4, s. 759-766. ISSN 1936-9751. DOI: 10.1007/s12161-011-9306-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9306-1>
- [21] OÑATE-JAÉN, A., BELLIDO-MILLA, D., HERNÁNDEZ-ARTIGA, P. Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food Chemistry*. 2006, roč. 97, č. 2, s. 361-369. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605003638>
- [22] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 1998, 199 s. ISBN 80-214-1300-X
- [23] STUART, Barbara. *Modern infrared spectroscopy*. Chichester: John Wiley, 1996, 180 s. ISBN 04-719-5917-0
- [24] COOPER, Paul, MOORE, Marla, HUDSON, Reggie. Infrared Detection of HO₂ and HO₃ Radicals in Water Ice. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2006, roč. 110, č. 26, s. 7985-7988. ISSN 1089-5639. DOI: 10.1021/jp062765k. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp062765k>
- [25] POLOVKA, Martin. *EPR spektroskopie*. Dostupné z: <http://www.chtf.stuba.sk/~polovka/epr.pdf>
- [26] Bruker Almanac 2001
- [27] WEIL, John, BOLTON, James. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2007, 664 s. ISBN 978-0-471-75496-1.
- [28] STAŠKO, Andrej, LIPTÁKOVÁ, Mária, MALÍK, Fedor, MIŠÍK, Vladimír. Stabilita piva charakterizovaná pomocou lapačov radikálov. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha ve spolupř. se Sahn, s. r. o, 1999, roč. 42, č. 12. ISSN 0023-5830.
- [29] Spin Trap database. National Institute Of Environmental Health Sciences. [online]. [cit. 2013-05-08]. Dostupné z: http://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm/spintrap/st_details/RefId/75
- [30] POLOVKA, Martin, TOBOLKOVÁ, Blanka. Vplyv aditív na termooxidačnú stabilitu piva. *Výskumná správa v rámci projektu Sessler*. Nepochikované. VUP Bratislava 2009, 20 str

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
PBN	α -phenyl-N-t-butyl-nitron spinový lapač
DPPH	1,1-difenylnitron spinový lapač
USJ	Ukazatel sladovnické jakosti
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast (spektroskopie)
IR	Infračervená oblast (spektroskopie)