

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. HANA BUCHTELOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie



**Monitoring biologicky aktivních látek ve vybraných
druzích piva**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Hana Buchtelová

Konzultant:

prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Brno 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Hana Buchtelová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Obor: Jakost a zdravotní nezávadnost potravin
Konzultant: Prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.
Název tématu: **Monitoring biologicky aktivních látek ve vybraných druzích piva**
Rozsah práce: 60-80

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše na téma technologického zpracování piva a jeho význam pro konzumenta z hlediska obsahových látek. Popis metod vybraných pro studium antioxidantů a proteinů ve vzorcích piva. (Listopad 2015 – Prosinec 2015)
2. Optimalizace metod pro analýzu antioxidantů, a metod pro analýzu proteinů. (Prosinec 2015 – Leden 2016)
3. Provedení hmotnostně spektrometrického a spektrofotometrického stanovení antioxidantů – zejména fenolů a flavonoidů. (Leden 2016 – Březen 2016)
4. Provedení hmotnostně spektrometrického a spektrofotometrického stanovení proteinů. (Únor 2016 – Březen 2016)
5. Vyhodnocení a grafické zpracování výsledků. (Březen 2016)
6. Srovnání dosažených výsledků s odbornou literaturou a sepsání diplomové práce. (Březen 2016 – Duben 2016)

Seznam odborné literatury:

1. XU, Z. – HOWARD, L. R. Analysis of antioxidant-rich phytochemicals. Chichester, West Sussex, U.K. 2012. ISBN 9781118229293, 9780813823911. URL: http://web2.mendelu.cz/cp_944_navody/Navody/e/Navod%20na%20ebrary-stahovani%20knih.pdf.
2. SMIRNOFF, N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. 1. vyd. Oxford :: Blackwell, 2005. 302 s. ISBN 978-1-4051-2529-1.
3. JORDÁN, V. – HEMZALOVÁ, M. *Antioxidanty. Zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. 1. vyd. Brno: Jota, 2001. 153 s. ISBN 80-7217-156-9.
4. KALAČ, P. *Funkční potraviny : kroky ke zdraví*. České Budějovice: DONA, 2003. 130 s. ISBN 80-7322-029-6.
5. KUANG, H. *Phytochemicals : occurrence in nature, health effects and antioxidant properties*. New York. 2013. ISBN 9781624173554, 9781624173547. URL: [http://web2.mendelu.cz/cp_944_navody/web/eBooks%20%20MyEBSCOhost%20\(CZ\)%20-%20KOMPLETNI%20MANUAL.PDF](http://web2.mendelu.cz/cp_944_navody/web/eBooks%20%20MyEBSCOhost%20(CZ)%20-%20KOMPLETNI%20MANUAL.PDF).
6. STRATIL, P. *A B C zdravé výživy – Díl 1*. 1. vyd. Brno: Stratil, 1993. 345 s. ISBN 80-900029-8-6.
7. STRATIL, P. *A B C zdravé výživy – Díl 2*. 1. vyd. Brno: Stratil, 1993. 580 s. ISBN 80-900029-8-6.
8. STRATIL, P. – KLEJDUS, B. – KUBAŇ, V. Determination of Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity in Fruits and Cereals. *Talanta*. 2007. sv. 71, č. 4, s. 1741–1751. ISSN 0039-9140.
9. STRATIL, P. – KLEJDUS, B. – KUBAŇ, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity in Vegetables – Comparison of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. sv. 54, č. 3, s. 607–616. ISSN 0021-8561.
10. NOVÁK VEČERNÍČEK, J. *Dějiny piva : od zrození až po konec středověku*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2009. 143 s. ISBN 978-80-251-2019-4.
11. HORNSEY, I. *A History of Beer and Brewing*. Cambridge: RSC, 2003. 758 s.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

Bc. Hana Buchtelová
Autorka práce


doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
Vedoucí ústavu




RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.
Vedoucí práce


doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Monitoring biologicky aktivních látek ve vybraných druzích piva, vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací. Jsem si vědoma, že se na mojí práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona. Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně2016

Experimentální část této diplomové práce byla realizována na
výzkumné infrastruktuře vybudované v rámci projektu

CZ.1.05/2.1.00/03.0072

**Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů
(SIX)**

operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Ondřeji Zítkovi, Ph.D. a svému konzultantovi prof. RNDr. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D, za odborné vedení, trpělivost při konzultacích a za pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Doc. MVDr. Vladimíru Pažoutovi CSc, Mgr Zbyňku Hegerovi Ph.D a Ing. et Ing. Petru Michálkovi za jejich cenné rady, připomínky a podporu v průběhu mé diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu při studiu.

ABSTRAKT

Diplomová práce ve své teoretické části stručně popisuje postup výroby piva filtrovaného, nefiltrovaného a nealkoholického, včetně charakteristiky základních surovin. Dále jsou popsány nejdůležitější biologicky aktivní obsahové látky, prospěšné lidskému zdraví. Tyto složky do piva přicházejí v rámci technologického zpracování ze sladu a chmele. Jejich zastoupení je ovlivněno nejenom odrůdou chmele ale také stanovištěm, vnějšími podmínkami v průběhu vegetace a technologickým postupem výroby. Studované složky mají vliv na chemicko-fyzikální vlastnosti piva, jako je formování pěny, jeho stárnutí, oxidace a také jeho organoleptické vlastnosti. Mají také pozitivní vliv na zdraví konzumenta díky antioxidantům, antikarcinogenním a antimikrobiálním účinkům. Praktická část této práce se zabývá stanovením vybraných biologicky aktivních látek, stanovení rozdílu jejich obsahu v pivu filtrovaném, nefiltrovaném a nealkoholickém. Kvalitativní a kvantitativní obsah těchto látek byl studován pomocí vospělých analytických metod.

Klíčová slova: Pivo, proteiny, antioxidanty, fenoly, flavonoidy

ABSTRACT

Theoretical part of diploma thesis briefly describes the production of filtered, unfiltered and non-alcoholic beer, including the characteristics of raw materials. Further, the most important biologically active substances, beneficial to human health, are described. These ingredients come within the technological processing from malt and hops. Their representation is influenced not only by the variety of hops but also its habitat, external conditions during the vegetation and technological process of production. Studied constituents affect the chemico-physical characteristics of beer, such as the formation of the foam, its aging, oxidation, and also the organoleptic properties. They also have a positive impact on consumer health through antioxidant, anticarcinogenic and antimicrobial effects. The practical part deals with the determination of selected biologically active substances, determining the difference between their content in filtered, unfiltered and non-alcoholic beer. Qualitative and quantitative content of these compounds was studied using advanced analytical methods.

Keywords: Beer, proteins, antioxidants, phenols, flavonoids

OBSAH

1. ÚVOD	3
2. CÍL PRÁCE	4
3. LITERÁRNÍ ČÁST	5
3.1 Pivo a jeho význam pro konzumenta	5
3.2 Postup při výrobě piva	6
3.2.1 Sladařství	6
3.2.1.1 Výroba sladu	7
3.2.1.2 Chmel	9
3.2.2 Pivovarnictví	10
3.3 Výroba nefiltrovaného piva	12
3.4 Výroba nealkoholického piva	13
3.5 Biologicky aktivní látky v pivu	14
3.6 vybrané Metody stanovení aktivních látek piva	23
3.6.1 Plynová chromatografie	23
3.6.2 kapalinová chromatografie	23
3.6.3 Kapilární elektroforéza	24
3.6.4 Chromatografie na tenké vrstvě	24
3.6.5 Hmotnostní spektrometrie	24
3.2 Separace proteinů	26
3.7 Legislativa související s pivem	28
4. Materiál a metodika	29
4.1 Charakteristika vzorků	29
4.2 Zpracování vzorků pro analýzy	31
4.3 Použité metody	32
5. Výsledky a diskuze	42
6. Závěr	65
7. Použitá literatura	66
8. Seznam obrázků	69
9. Seznam tabulek	71

10. Seznam zkratek	71
--------------------------	----

1 ÚVOD

Již od dávných časů se lidé snažili připravit mnoho nápojů a pochutin tak, aby jim to bylo ku prospěchu, jak už k uhašení žízně, tak pro blahodárné či léčebné účinky. A tak v období Sumerů lidstvo dalo vznik zlatavému moku jménem pivo. U nás se začalo pivo vyrábět mnohem později. První dochované zmínky pochází z dob krále Vratislava II. (1061-1092). V této době však mělo pivo význam především jako pokrm, protože nesloužilo jen jako nápoj, ale připravovaly se z něj polévky, kaše a omáčky [1].

Mnoho odborníků z oblasti výživy vyzdvihuje blahodárné účinky piva jak na zdraví, tak krásu a je bezesporu potřebné, aby tyto účinky a hlavně složení piva bylo prozkoumáno.

Jednou z nejdůležitějších vlastností piva je jeho antioxidační schopnost, která je dána obsahem polyfenolů – flavonoidních látek a volných fenolových kyselin, jež dokáží likvidovat volné radikály a zabráňují tak jejich škodlivému působení v organismu. Těmto látkám se nejen přisuzuje schopnost ochrany organismu, ale spousta z nich má i účinky antimikrobiální a antitrombotické. Z nutričního hlediska je dobrým zdrojem energie díky obsaženým sacharidům, a mezi pozitivní stránky se řadí i dobrá stravitelnost bílkovin [2].

Na celém světě existuje přes patnáct tisíc různých značek pív. Každá země, se pyšním výrobou piva z různých surovin dle různých tradičních receptur a postupů, například v Japonsku a Číně se pivo připravuje z loupané rýže. Ovšem klasické pivo plzeňského typu nebude mít nikdy ve světě konkurenci [3].

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit obsah charakteristických biologicky aktivních látek obsažených v pivech filtrovaných, nefiltrovaných a nealkoholických porovnat je vzájemně mezi sebou a zjistit zda existují rozdíly mezi pivem vyrobeným v malém či velkém pivovaru. Pro zjištění biologicky aktivních látek bylo použito vyspělých analytických metod, které jsou popsány v kapitole 4.3. Pro analýzu bylo vybráno celkem 11 vzorku piva, z toho 2 vzorky filtrovaného a 2 vzorky nefiltrovaného piva od velkých výrobců, dále pak jeden vzorek filtrovaného a 3 vzorky nefiltrovaného od výrobců z malých pivovarů a 3 vzorky nealkoholického piva vyráběna ve velkých pivovarech.

3 LITERÁRNÍ ČÁST

3.1 Pivo a jeho význam pro konzumenta

Pro člověka je z fyziologického hlediska důležité udržet rovnováhu mezi příjmem a výdejem tekutin. Přitom doplňovat tekutiny, bychom měli dříve, než pocítíme žízeň. To zda přijímáme dostatek tekutin, zjistíme dle barvy moči. Pokud je moč velmi tmavá, je to známkou nedostatečného zásobení tekutinami. Doporučené množství tekutin se pohybuje mezi 2-3 litry tekutin za den, v závislosti na tom zda se pohybujeme v horku, při těžké práci či sportu. Záleží ale také na skladbě jídelníčku. Je obecně známo, že příjem tekutin by měl být rozdělen do celého dne a základem dobrého pitného režimu by měly být nekalorické nápoje, nejlépe voda. V poslední době se vyskytla řada studií, které dokládají preventivní vliv mírného požívání alkoholu (ekvivalent zhruba 1,5-2 dl vína u žen a 3-4 dl u mužů) na vznik srdečně-cévních chorob [1].

Pivo bývá vyzdvihováno pro svůj obsah vitaminů skupiny B. Méně už je zdůrazňováno, že vitaminy obsahuje pivo nefiltrované, nebo ještě spíše pivovarské kvasnice, nikoli běžně lahvové nebo točené. V pivě se nacházejí látky, které zvyšují chuť k jídlu, proto je pití piva nevhodné u lidí se sklonem k nadváze. Energetická hodnota piva se pohybuje mezi 134-215 kJ/100 ml [1].

Pivo se řadí mezi slabě alkoholický nápoj, který je vyroben z chmele vody a obilného sladu. Díky těmto složkám je vhodné jako rehydratační, izotonický a iontově vyvážený nápoj s řadou vitaminů, řadících se hlavně do skupiny B. Vitamíny a minerální látky se v pivu vyskytují převážně díky přítomnosti pivovarských kvasnic. Kromě vitaminů, minerálních látek a alkoholu pivo také obsahuje nezanedbatelné množství bílkovin a sacharidů [2] [3].

Piva můžeme rozdělit na první pohled na světlá, která jsou vyráběna ze světlých sladů, dále pak polotmavá ze sladů tmavých a karamelových, tmavá vyráběna ze sladů tmavých, karamelových a barevných a dále piva řezaná, kde se jedná o směs světlých a tmavých piv ze stejné skupiny. Dále můžeme piva rozdělit na lehká (do 7 % hm. extraktu původní mladiny), výčepní (8 – 10 % hm. extraktu původní mladiny), ležáky (11 – 12 % hm. extraktu původní mladiny), speciální (13 a více % hm. extraktu původní mladiny) a portery (18 a více % hm. extraktu původní mladiny) [4] [5].

Ze zdravotního hlediska je mírná konzumace piva zdraví prospěšná. Díky močopudným vlastnostem a zvýšenému vylučování žluči totiž přispívá ke snížení vzniku močových a žlučových kamenů. Pivo je také dobré jako prevence proti vzniku ledvinových kamenů, protože objemem přijatých a vylučovaných tekutin zabraňuje usazování vápenatých solí v ledvinách. Dále zvyšuje hladinu HDL a snižuje hladinu LDL které způsobují aterosklerózu a usazují se krevním řečišti [6].

3.2 Postup při výrobě piva

K výrobě piva používáme jako základní vstupní suroviny slad, chmel a vodu.

3.2.1 Sladařství

Toto odvětví se zabývá výrobou sladu, který představuje hlavní surovinu pro pivovarnický průmysl. Mezi hlavní produkty sladařství patří světlé, tmavé a speciální slady. Surovinami pro výrobu sladu je sladovnický ječmen, voda, - případně náhražky sladu. Teoreticky lze sladovat více druhů obilí, prakticky se ale využívá pouze sladovnický ječmen, popřípadě pšenice v případě pšeničného sladu pro výrobu pšeničného piva. Na našem území se pro výrobu sladu pěstují hlavně odrůdy jarního, dvouřadého, níciho ječmene (*Hordeum distichum var. nutans*), které patří k nejkvalitnějším na světě [7] [3] [8].

Ve sladařském průmyslu se využívá celé ječné zrnko (obilka), které se skládá z obalových vrstev (pluch, plušek), endospermu a zárodku (klíčku, embrya), ze kterého v průběhu klíčení vycházejí podněty k aktivaci enzymů v celém zrnku. Endosperm zaujímá největší část obilky a je hlavním zdrojem zásobních sacharidů, bílkovin a dalších složek, které jsou nutné k vytvoření charakteristických vlastností sladu. Ječmen není schopen hned po sklizni klíčit, je nutné, aby nejprve fyziologicky dozrál. Toto stádium (dormance ječmene) trvá několik týdnů a během této doby dochází k oxidačním procesům v zrnku, k odbourávání přítomných inhibitorů klíčení a zároveň k aktivaci stimulatorů pro růst. Odrůdy ječmene, pěstované v našich oblastech, mají posklizňovou dobu dozrávání okolo 5 týdnů. V porovnání s déle zrajícími druhy mají naše odrůdy více enzymů a poskytují kvalitnější slady.

Další důležitou surovinou ve sladařském a pivovarnickém průmyslu je voda, která také přímo ovlivňuje kvalitu piva. K nejdůležitějším látkám ve vodě z hlediska pivovarnictví patří vápenaté a hořečnaté soli, které vytvářejí tvrdost vody, která je důležitým kritériem při posuzování její kvality. Z technologického hlediska je důležité, že některé ionty svými reakcemi s fosforečnany snižují pH, čímž zvyšují kyselost rmutu, sladiny a mladiny a tím působí pozitivně na činnost enzymů. Hydrogenuhlíčitanové a uhličitánové ionty působí opačně a tak zvyšují pH, což má negativní vliv na varný proces [7].

3.2.1.1 Výroba sladu

Výrobu sladu lze rozdělit do pěti výrobních fází:

1. Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene

Při příjmu ječmene dochází k základním rozborům, jako jsou stanovení obsahu vody, bílkovin, zlomků a podílu zrna I. a II. třídy. Po této fázi dochází k přečištění, které probíhá ve dvou stupních. V první fázi dochází k odstranění hrubých nečistot za pomoci vibrujících sít aspirátoru, dochází k odstranění půlek ječných zrn, kulatých zrn a různých plev. V druhé fázi se ječmen třídí na zrna I. třídy (zrna větší jak 2,5 mm) a II. třídy (velikost zrn v rozsahu 2,2 – 2,5 mm) [4]. Vyčištěný a vytříděný ječmen se skladuje ve starších sladovnách či půdách nebo v modernějších silech, která jsou vybavena pneumatickou dopravou, provzdušňovacím zařízením, případně zaplyňovacím zařízením [7].

2. Máčení ječmene

Hlavním cílem máčení je zvýšit obsah vody v ječném zrně z 12-15 % na 42-48 %, Dosažení tohoto obsahu vody je nutné pro správné fungování enzymových pochodů, které zajišťují správný průběh sladařského klíčení. K máčení se používají železobetonové nebo ocelové náduvníky, které mají většinou válcovitý tvar s kónickým dnem, aby mohlo docházet k samočinnému vyprazdňování. První voda, která se využívá k máčení, obsahuje desinfekční

prostředky. Tato voda se rychle znečišťuje, a proto se musí i brzy vyměnit. Nejčastějším způsobem máčení je se vzdušnými přestávkami, kdy se ječmen napustí tenkým proudem do nádavníku který je naplněn vodou. Po napuštění se odstraní splavky a do spodní části se připouští čistá voda tak aby se ječmen propíral, přičemž přebytečná voda odtéká přepadem. Voda se mění 1–3 krát za den a mezi každým napuštěním se dělá vzdušná přestávka, aby se zrno dobře provzdušnilo [7].

3. Klíčení namočeného ječmene

Při klíčení dochází k aktivaci enzymu a dosažení požadovaného stupně rozluštění při současném omezení ztrát vegetací. Využívá se umělého modelování podmínek přirozeného klíčení vhodnou teplotou, vláhou a přístupem kyslíku. Klíčení ječmene klasickým způsobem se provádí na humnech což jsou velké prostorné místnosti s hladkým povrchem a větráním. Konečným produktem klíčení je tzv. zelený slad, který má charakteristické vlastnosti pro každý druh sladu [7].

4. Hvozďení zeleného sladu

Proces hvozďení je charakteristický snižováním obsahu vody ve sladu pod 4 %. V této fázi se zastavují životní a lušticí pochody v zrně, částečně se redukuje enzymová aktivita a tvoří se barevné a aromatické látky, charakteristické pro každý druh piva. Proces hvozďení se provádí na hvozdech a lze je rozdělit do 3 částí. V první fázi se snižuje obsah vody na 20 % a teplota se pohybuje okolo 40°C. Tato fáze se nazývá růstová, protože zrno je stále schopno růstu. Enzymatická fáze se vyznačuje teplotou okolo 60°C a vlhkostí pod 20 %. Vegetační pochody jsou v této fázi zastaveny, ale enzymatické stále pokračují. Poslední fáze je chemická, probíhající při teplotách nad 60°C a s vlhkostí pod 10 %. V zrně dochází k tvorbě sensoricky aktivních látek [9].

5. Odkličování a skladování sladu

Slad se po odhvozdění sklápí do košů a je dopravován k odkličovačce, kde je zbaven kořínků tzv. sladového květu, který je využíván jako krmivo nebo ve fermentačních technologiích. Takto upravený slad je dopraven do sil kde se nechá 6 týdnů odležet [9].

3.2.1.2 Chmel

Pěstování chmele má v České republice tisíciletou tradici, v 16. století začalo známkování chmele, které obsahuje označování a ověřování místního původu. V 18. století byla vydána Marií Terezií první státní legislativa upravující tuto oblast, zaměřující se hlavně na padělání chmele. Žatecký chmel je jemný poloraný aromatický chmel pěstovaný v Žatecké chmelařské oblasti a je díky svým výjimečným vlastnostem využíván pivovary po celém světě. Pro Žatecký chmel je charakteristické jemné chmelové aroma, jemné věténko, nízký obsah myrcenu a vyrovnaný obsah alfa a beta kyselin. Pro skladbu chmelových pryskyřic je příznačný poměrně nízký obsah alfa hořkých kyselin v rozmezí 2,5-5,5 %. Obsah beta hořkých kyselin je vyšší než obsah alfa hořkých kyselin a jejich vzájemný poměr se pohybuje v hodnotách mezi 0,60-0,80. Obsah myrcenu je v rozmezí 25 - 40 %. Dalším znakem, který je pro žatecký chmel charakteristický, je přítomnost množství beta-farnesenu (14-20 %), který je u jiných chmelů obsažen jen malém množství. Celkový charakter vůně Žateckého chmele je dán vzájemným poměrem všech jednotlivých složek chmelových silic[10] [11].

Chmel, jenž je představován chmelovými hlávkami samičích rostlin chmele evropského (*Humulus lupulus var. europaeus*) je jednou ze tří základních surovin piva. Pivu dodává hořkost, charakteristické aroma a další technologicky důležité vlastnosti. Chmelové hlávky se nejprve mechanicky sčesou a pak následuje jejich sušení za nízkých teplot a lisování do balotů a žoků. Chmelové hlávky se skládají ze stopky, věténka, pravých a krycích listenů a při oplození obsahují i semeno. Na vnitřní straně listenů se v době zrání vylučují pryskyřičná zrnka lupulinu, která obsahují chmelové pryskyřice a silice. Z pivovarského hlediska můžeme odrůdy chmele rozdělit na:

- Jemné aromatické - tyto odrůdy jsou vhodné především pro přímé chmelení, do této skupiny patří odrůda Žatecký poloraný červeňák. Obsah hořkých kyselin se zde pohybuje v rozmezí 2,5–4,0 % [10].

- Aromatické – obsah hořkých kyselin je zde 4–7 %; do této skupiny patří chmele odrůda Sládek a Harmonie. Jejich aroma je označováno jako dobré [10].
- Hořké–obsah kyselin se pohybuje v rozmezí 7 – 10 %, z českých odrůd zde patří sem Bor, Premiant a Rubín. Tyto odrůdy mají hrubé aroma [10].
- Vysokoobsažné-obsah kyselin je zde mezi 12 – 17 %, odrůda se odlišuje výraznou ostrou vůní a odlišným aroma, které je jako u předchozí skupiny označováno jako hrubé. Tato odrůda je používána převážně k výrobě chmelových extraktů, z českých chmelů je to odrůda Agnus [10].

3.2.2 Pivovarnictví

V České republice má pivovarnictví dlouholetou tradici ve výrobě tradičních českých ležáků plzeňského typu. Od začátku devadesátých let, kdy došlo k výrazné modernizaci českého pivovarnictví, dochází k rozvoji velkých pivovarských společností, k zániku menších pivovarů a otevření několika desítek minipivovarů.

3.2.2.1 Výroba piva

Výrobu piva lze rozdělit na tři výrobní úseky:

1. Výroba mladiny ze sladu, chmele a vody, popř. za použití náhražek,
2. Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva pivovarskými kvasnicemi,
3. Závěrečné úpravy a stáčení zralého piva do transportních nádob či obalů.

Důležitou roli ve výrobě piva hraje voda, protože ovlivňuje jak charakter piva, tak jeho jakost. Voda musí být pitná, tj. hygienicky nezávadná. Velký důraz je kladen na to, aby voda nebyla příliš tvrdá, neobsahovala příliš Fe, CaSO₄ a Na₂SO₄. Tyto látky by se ve vodě neměly vyskytovat, protože způsobují tvrdou chuť piva. Naproti tomu nízký obsah NaCl působí pozitivně na dokreslení chuti, hlavně tmavých piv [12].

Další surovinou pro výrobu piva je chmel (*Humulus lupulus*). Kromě toho, že dodává pivu lehce hořkou chuť a charakteristické aroma, ovlivňuje také technologické vlastnosti jako pěnivost, čirost, je využíváno jeho schopnosti srážet vysokomolekulární látky mladiny a má i baktericidní účinky [12] [4].

1. Výroba mladiny

Proces výroby mladiny lze rozdělit na tyto technologické úseky: šrotování sladu (sladových náhražek), vystírání sladového šrotu do vody, rmutování, scezování sladiny a vyslazování sladového mláta, chmelovar a závěrečné úpravy mladiny. Nejprve je nutné ze sladu nebo sladových náhražek převést obsažené látky, což je především škrob, do roztoku, aby jej bylo možné pomocí enzymů převést ve směs nízkomolekulárních látek, které jsou dále za pomoci kvasinek zkvašeny na etanol a oxid uhličitý. Štěpení škrobu na cukry probíhá ve třech fázích – bobtnání a mazovatění, kdy škrob přechází v hustou a viskózní kapalinu. V další fázi dochází účinkem α -amylázy ke ztekucení škrobu a vzniká amyloextrin. V poslední fázi dochází ke zcukření škrobu za pomoci komplexu enzymů. Kromě štěpení škrobu dochází i ke štěpení vysokomolekulárních bílkovin, které jsou důležité pro pěnivost a plnost chuti a štěpné produkty těchto procesů jsou také důležité při kvašení. Zařízení pro výrobu mladiny se nacházejí ve varně a tradičně se tomuto místu říká „srdce“ pivovaru; v této místnosti se nacházejí varní nádoby s příslušenstvím [12].

2. Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva

Úkolem hlavního kvašení je přeměna sacharidů na alkohol a CO₂. Proces kvašení probíhá v tradičních pivovarech většinou v otevřených kvasných kádích pivovarskými kvasinkami. Nutným krokem k dosažení žádané kvality piva a zajištění dobrého průběhu výroby je výběr vhodného kmene kvasinek. V dnešní době se používají dva základní druhy:

- Kvasinky svrchního kvašení (*Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*), tyto kvasinky jsou používány při výrobě svrchně kvašených piv typu „ale“, „porter“ a „stout“.
- Kvasinky spodního kvašení (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *carlsbergensis*) využívaná pro piva plzeňského typu, po ukončení doby kvašení usedají na dno nádrže.

Dokvašování a zrání mladého piva probíhá v ležáckém sklepe, kde pivo v uzavřených ležáckých tancích za nízkých teplot pomalu dokvašuje, číří se, zraje a sytí

se pod tlakem vznikajícího oxidu uhličitého. Doba dokvašování, závisí na typu piva. Mladá piva se nechávají zrát 20 dní, ležáky až 90 dnů a speciály ještě déle. V současné době se v moderních provozech používají cylindricko-kónické tanky [12] [13].

3. Závěrečné úpravy piva

Vyzrálé pivo musí ještě před expedicí projít pasterací a filtrací, kvůli požadované biologické stabilitě.

- Filtrace piva se nejčastěji provádí na křemelinových a deskových celulózových filtrech. Membránové filtry jsou také velmi rozšířeným způsobem filtrace.
- Pasterace se používá pro zvýšení biologické stability piva. Nejčastěji se využívá pasterace v lahvích či plechovkách v ponorných a tunelových pastérech při teplotě 62 °C, méně používaná je pasterace mžiková v průtokových pastérech při vyšší teplotě. Zaváděním membránové filtrace s vyloučením tepla se zabraňuje nepříznivému vlivu teploty na jeho sensorické vlastnosti.
- Stabilizace piva se používá u piva, kdy je nutná delší trvanlivost. Principem je odstranění prekurzorů zákalu piva, především vysokomolekulárních dusíkatých složek, polyfenolů, kovových iontů a rozpuštěného kyslíku. Používají se hlavně adsorpční a antioxidační stabilizátory.
- Stáčení piva je konečná fáze výroby. U nás se pivo stáčí do cisteren, sudů, lahví nebo plechovek. Stroje pro stáčení jsou konstruovány tak, aby nedocházelo ke ztrátám oxidu uhličitého a tím neutrpěla kvalita piva [7].

3.3 Výroba nefiltrovaného piva

Pivo patří mezi tradiční nápoje a mnoho pivovaru se chlubí tradičními postupy nicméně i zde se prosadila modernizace technologií. Jednou z nejzásadnějších úprav byla filtrace. Nefiltrované pivo při výrobě neprošlo filtrací; v případě filtrovaného piva je většina kvasinek zachycena na filtru, ale protože nefiltrované pivo přes filtry

neprochází, konečný produkt obsahuje zbytek kvasinek a různé mikročástice, které jsou pro tento druh piva charakteristické. Na rozdíl od kvasnicového piva, které také neprochází filtrací, není obohacováno o další kvasinky nebo rozkvašenou mladinu. Vzhledově je podobné kvasnicovému pivu, pro které je také typický lehký zákal. Ten však může být vytvořen také uměle pomocí přidání jablečného extraktu, který vytváří dojem kvasinkového zákalu. Protože pivo je nefiltrované a nepasterované, je určeno k rychlé spotřebě [14].

Dle vyhlášky 335/1997 Sb. je nefiltrované pivo, takové pivo u kterého nebyla provedena filtrace, a dle přílohy doplňující tuto vyhlášku by měl být vzhled tohoto piva slabě zakalený až zakalený.

3.4 Výroba nealkoholického piva

Dle legislativy, platné v Evropské unii a v České Republice, se mezi nealkoholické pivo řadí výrobek s obsahem alkoholu do 0,5 objemových procent. Do nízkoalkoholických piv se řadí takové pivo, které má obsah alkoholu v rozmezí 0,6-1,2 % [15] [16].

Základní způsoby výroby nealkoholického piva

V dnešní době dominují při výrobě piva tyto způsoby výroby nealkoholického piva.

- a) Odstranění etanolu z piva vyrobeného tradičním způsobem
- b) Přerušením nebo omezením kvašení
- c) Použitím mutantních, nebo jinak upravených kmenů pivovarských kvasnic

K odstranění alkoholu z piva, vyrobeného tradičním způsobem, se používá řada postupů, jako jsou destilace etanolu, reverzní osmóza, odpar etanolu, dialýza piva, extrakce piva fluidním oxidem uhličitým, sprejové sušení piva, difuze nebo frakční krystalizace či lyofilizace.

Jedna z nejpoužívanějších technik je difuze přes membránu. Tato technika je vhodná, protože nedochází k termické zátěži produktu, ale z ekologického hlediska je výhodnější vakuová destilace. Při odstranění etanolu odparem se používají teploty nepřesahující 30 - 45 °C, díky nízkým teplotám nedochází ke změně barvy a chuti piva.

Další metodou výroby nealkoholického piva je limitovaná fermentace. Jedná se o modifikaci fermentačního procesu, kdy dochází k nízké produkci etanolu díky potlačení metabolismu kvasinek.

Geneticky manipulovat s kvasinkami je u v České republice zatím v počátcích a používání takto vytvořených druhů v potravinářství se neslučuje s českou legislativou. Mutageneze je jediným způsobem, jak zasáhnout kvasinkám druhu *Saccharomyces cerevisiae* do genomu. Tyto mutace jsou buď indukované, nebo vyvolané prostředím. Kmeny, které mají mutace v genech pro enzymy z cyklu trikarboxylových kyselin, mají schopnost produkovat snížené množství etanolu na úkor tvorby kyselin [15] [16] [15].

3.5 Biologicky aktivní látky v pivu

- **Antioxidační látky**

V každém organismu vzniká určité množství volných radikálů, reaktivních forem kyslíku nebo dusíku. V případě, že jsou tyto látky v malém množství, tak organismu neškodí. Pokud se ale jejich množství zvýší a nastane nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty, dochází k oxidačnímu stresu. Tento stav může zapříčinit aterosklerotické změny, dochází k poškození dýchacího systému, zraku, jaterního parenchymu, ale i při vzniku mnoha dalších onemocnění. Proti volným radikálům působí antioxidanty, respektive antioxidační systém organismu. Díky němu se může bránit zvýšené tvorbě volných radikálů, může je zachytávat a odstraňovat, má však také schopnosti opravovat části DNA, které byly volnými radikály poškozeny. Aby tento systém co nejdokonaleji fungoval, je zapotřebí přijímat co největší množství protektivních faktorů [17].

Mezi antioxidanty patří látky, které zpomalují nebo úplně potlačují nežádoucí oxidační děje. V pivu jsou nejvíce zastoupené polyfenolové sloučeniny, což jsou látky fenolové povahy s vysokou antioxidační aktivitou. Polyfenoly se podílí na chemicko-fyzikální stabilitě piva, na formování pěny a také ovlivňují jeho sensorické vlastnosti a trvanlivost. Mnoho přirozených antioxidantů patří mezi vitamíny, příkladem je například kyselina askorbová, vitamín B₂ a B₁₂ nebo prekurzory vitamínu A. Některé látky ovlivňují pozitivně zdraví člověka, protože mají protikarcinogenní, protimikrobiální, protitrombózní a další účinky [15] [18] [19].

- **Polyfenoly**

V pivu se tyto látky vyskytují především díky chmelu a chmelovým výrobkům, které jich obsahují značné množství. Uvádí se, že obsah těchto látek se pohybuje mezi 20–30 %. Zbytek polyfenolických látek pochází ze sladu.

Polyfenoly ovlivňují zejména chemicko-fyzikální stabilitu piva, formování pěny, oxidaci piva a odolnost proti stárnutí [15]. Dále tyto látky ovlivňují sensorické vlastnosti piva jako je chuť, vůně a barva. Řadí se mezi přirozené antioxidanty, z nichž se v pivech vyskytují fenolické kyseliny zahrnující ortho- i para- deriváty kyseliny benzoové (např. kyselina salicylová, kyselina gentisová, kyselina *p*-hydroxybenzoová) a deriváty kyseliny skořicové (např. kyselina *p*-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina sinapová); v pivu se také nachází kyselina chlorogenová a její deriváty, dále chinony a ubichinony ale hlavně flavonoidy (deriváty heterocyklického flavanu, zahrnující v molekule dvě benzoová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem [20]).

Dle stupně oxidace můžeme flavonoidy rozdělit do sedmi skupin a to na katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. Mezi sloučeniny, které mají spojené kruhy A a B alifatickým C₃ řetězcem nebo řetězcem, který je součástí furanového cyklu patří aurony, chalkony a dihydrochalkony. Isoflavonoidy jsou sloučeniny s kruhem B spojeným s pyranovým kruhem C v poloze C-3, pokud je tato vazba posunuta na polohu C-4 jedná se o neoflavonoidy. V pivovarnictví jsou nejvíce významné:

- chalkony: xanthohumol, xanthogalenol, 3'-geranylchalkonaringenin
- flavonony: isoxanthohumol, naringenin, eriodiktyol
- flavonoly: morin, kvercetin, kaemferol
- proanthokyanogeny: delphinidin, pelargonidin, kyanidin
- jednoduché monomery flavanolu: katechin a epikatechin.

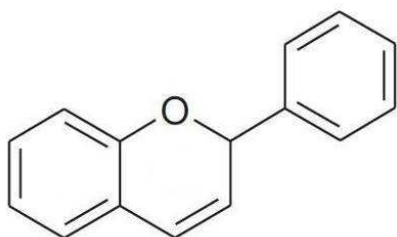
Výskyt těchto sloučenin a jejich chování v pivu je ovlivněn mnoha faktory, jako je původ a skladba surovin, technologické zpracování v jednotlivých stupních výrobního procesu [2].

fenolické sloučeniny	mg/l
polyfenoly celkově	172
antokyanogeny	46
katechin	5-55
epikatechin	9-24
rutin	1-6
quercetin	5-125
quercetrin	1
kys. chlorogenová	2-20
kys. para-kumarová	1-7
kys. ferulová	2-21
kys. sinapová	1-20
kampferol	5-20
myricetrin	1
kys. gallová	5-29
kys. para-hydroxybenzoová	5-20

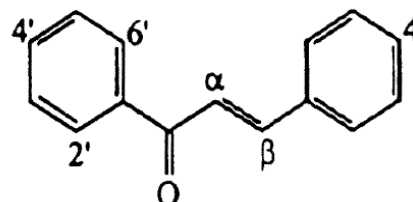
Tabulka č. 1 Obsahy jednotlivých polyfenolických látek v pivu plzeňského typu

Velký počet flavonoidů bývá ještě glykosilován a to navázáním glukosy, rhamnosy galaktosy, arabinosy, xylosy, glukuronové kyseliny atd. V průběhu pivovarských technologií, a to zejména v průběhu chmelovaru, kvašení, filtrace a stabilizace koloidních vlastností piva dochází k velkému počtu chemických přeměn, a to především k reakcím hydrolytickým, isomeračním, kondenzačním až polymeračním a oxidoredukčním. Hydrolytické reakce vedou především ke štěpení glykosidů, tím vznikají aglykony a odpovídající sacharidické složky; tyto látky se z hlediska kvality hotového piva neuplatňují. Mezi izomerační reakce patří přeměna xanthohumolu na isoxanthohumol během chmelovaru. Kondenzační až polymerační reakce se uplatňují převážně při tvorbě vysokomolekulárních celků s vysokou srážecí aktivitou proti bílkovinám extraktu piva. Takto dochází k tvoření polyfenol-bílkovinných komplexů. S oxidačně redukčními procesy úzce souvisí senzorická stabilita piva po naplnění piva do obalů, kde polyfenolické složky hrají nemalou roli. Volné radikály vznikají vlivem působení světla, tepla, kovových iontů, mechanického pohybu a mnoha dalších faktorů. Volné radikály způsobují autooxidaci polynenasycených lipidických složek extraktu piva, tím dochází k tvorbě těkavých karbonylových sloučenin, které působí nepříznivě na chuťové vlastnosti piva. Polyfenoly a flavonoidy jsou nejúčinnější přirozené antioxidanty, vyskytující se v pivu, eliminující tyto děje.

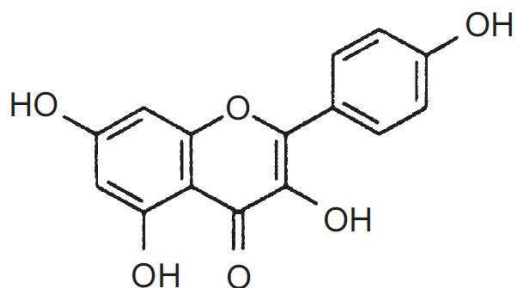
Antioxidační účinky lze přidělit polyfenolům několika způsoby. Řada z nich, jako třeba flavonoidy inhibují enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantonoxidasu, proteinkinasu C). K dalším enzymům, podílejícím se na tvorbě volných radikálů patří cyklooxygenasa, lipoxygenasa, mikrosomální monooxygenasy se podílejí na tvorbě volných radikálů. Další skupinou, podílející se na antioxidačních účincích jsou ty, které tvoří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů jsou přítomny při tvorbě reaktivních kyslíkových forem. Mnoho polyfenolů je snadno oxidovatelná a to díky nízkému redoxnímu potenciálu. Díky této vlastnosti jsou polyfenoly schopné redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky (např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový). Při reakcích jsou donorem vodíku a samy jsou přeměněny na málo reaktivní fenoxyllový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury. Hlavním významem těchto reakcí je to, že jsou volné radikály eliminovány dříve, než zreagují s buněčnými komponentami [15] [21].



Obrázek č. 1 Flavan [15]



Obrázek č. 2 Chalkon[15]



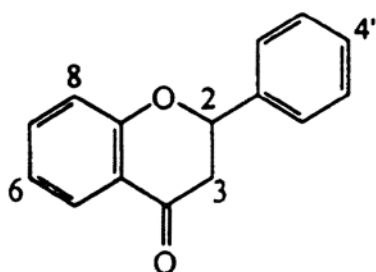
Obrázek č. 3 Flavonol [15]



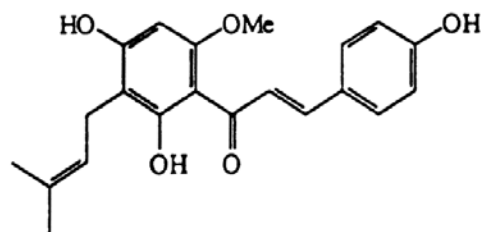
Obrázek č. 4 Kvercetin[15]



Obrázek č. 5 Kyselina p-hydroxybenzoová a kyselina skořicová[21]



Obrázek č. 6 Flavanon[21]



Obrázek č. 7 Xantohumol[21]

- **Proteiny**

Bílkoviny jsou pro výživu člověka nutné a nenahraditelné, díky nim je možná výstavba a obnova tkání, tvorba bílkovin s biologickou funkcí (enzymy nebo bílkoviny krevní plazmy a další) Pokud organismus nemá jinou možnost, kde získat energii, může ji využít i z bílkovin, ale tato cesta je velmi neefektivní. Skladba a množství aminokyselin, které si tělo nedokáže samo vytvořit (esenciální aminokyseliny), jsou kritériem, podle něhož se posuzuje kvalita bílkovinných zdrojů [1].

Mezi charakteristické znaky každého piva patří bohatá hustá a dlouhotrvající pěna. Bílkoviny, respektive bílkoviny s hydrofobním charakterem, se řadí k faktorům, které pozitivně ovlivňují tvorbu a stabilitu pěny piva. Na druhou stranu proteiny, obsažené v pivu, mohou způsobovat jeho zákal. Další technologická vlastnost bílkovin spočívá v plnosti chuti. Nejvíce bílkovin (až 85 %) pochází ze sladu, zbývající bílkoviny pochází z pivovarských kvasnic [22]. Celkem je v pivu obsaženo 3-5 g/l čistých bílkovin. Obsah volných aminokyselin se pohybuje okolo 300 – 500 mg/l; je zde zastoupena téměř celá řada esenciálních aminokyselin Bílkoviny, které jsou významné

z hlediska pěnivosti piva, mají hydrofobní strukturu, díky ní je usnadněn přechod bílkovin do pěny a umožněno mezifázové rozhraní orientací bílkovin do bubliny plynu. Dle rostoucí hydrofobicity a specifické hmotnosti lze bílkoviny rozdělit do dvou skupin: HMW (high molecular weight) a LMW (low molecular weight). Do HMW patří ty bílkoviny, které mají molekulovou hmotnost v rozsahu 35 až 50 kDa. Do skupiny LMW patří bílkoviny s rozsahem 5 až 15 kDa. [23].

- Protein Z - jedná se o ječnou albuminovou bílkovinu o molekulové hmotnosti 40 kDa a v pivu zastává 10 – 20 % všech nedialyzovatelných bílkovin a je přibližně z jedné třetiny glykosilován.
- Lipid Transfer Protein 1(LPT1) – jedná se o polypeptid, který má vlastnosti intracelulárního přenašeče lipidů. Jeho molekulová hmotnost je 9660 Da a patří mezi albuminové bílkoviny se schopností inhibovat sladové cysteinové endoproteázy.
- Lipid Binding Proteins (LBP) – tyto proteiny mají hmotnost přibližně 13 kDa, jsou vázané na buněčné membrány a extrahovatelné detergenty; jejich společnou vlastností je inhibice destabilizačních vlivů lipidů.
- Hordeiny – jedná se o hlavní zásobní bílkoviny ječmene, složené z polymorfní směsi několika složek, oddělitelných např. elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Základní skupiny jsou značeny *B*, *C*, *D* a γ a představují vysokomolekulární (> 51 kDa), středněmolekulární (29 -51 kDa) a nízkomolekulární (< 29 kDa) látky. Tyto látky jsou zodpovědné za vznik koloidních zákalů piva.

Mála skupina bílkovin vyrobeného piva má větší molekulovou hmotnost než 50 kDa; tyto bílkoviny pravděpodobně pochází z použitých kvasnic. Jejich společnou vlastností je stabilita v průběhu sladařského procesu a odolnost vůči vysokým teplotám, extrémním hodnotám pH a k proteolýze. Bílkoviny v průběhu procesu výroby jsou štěpeny různě, v závislosti na struktuře, konfiguraci a obsahu nebílkovinných částí dané bílkoviny. Některé bílkoviny, které jsou součástí pivovarských surovin, do piva vůbec nepřechází; toto je způsobeno odolností vůči enzymům a jejich nerozpustností ve vodě [22] [23].

- **Sacharidy**

Minimální denní příjem sacharidů je 50 g, horní hranicí je 500 g, většina lidí má příjem sacharidů v rozmezí 100-300 g za den, v případě nedostatku dochází k odbourávání tukových zásob, čehož využívají některé redukční diety. Pokud je příjem sacharidů příliš nízký může dojít až k úbytku svalové hmoty, překyselení organismu a negativnímu ovlivnění psychiky. Pokud je ale příjem sacharidů vysoký, dochází k hromadění energie do tukových zásob. Vysokosacharidová strava vede po čase k poruše glukózové tolerance, případně až ke vzniku cukrovky.

Obsah sacharidů v pivu se pohybuje okolo 28 g/l a tím představuje hlavní energetickou složku piva. Mezi nejdůležitější složky patří dextriny, protože společně s alkoholem zvyšují disperzi piva v zažívacím traktu a to umožňuje rychlou a účinnou látkovou výměnu. V menším množství pivo obsahuje monosacharidy a oligosacharidy a nejvíce jsou zastoupeny zkvasitelné cukry maltosa a maltotriosa a nezkrasitelné pentosy. Gumovité látky, které zastupují hlavně pentozany a β -glukany, mají vliv na zvyšování viskozity piva [4]. Obsah jednotlivých sacharidů piva je uveden v tabulce č. 2.

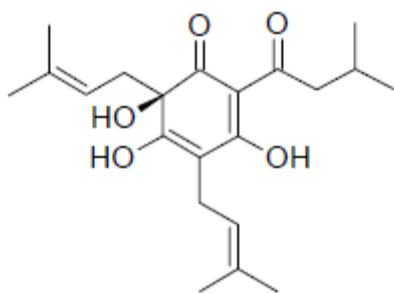
sacharidy piva	c [g/l]
glukosa	0.1-0.5
fruktosa	0.1-0.2
sacharosa	0-0.1
maltosa	0.5-5
maltotriosa	1-3
isomaltotriosa	0.4-1
dextriny	20-30
β -glukany	150-400
pentosany	0.2-0.5

Tabulka č. 2 Obsahy jednotlivých sacharidických látek v pivu

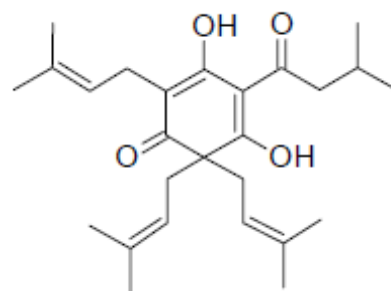
Primárním zdrojem sacharidů piva je ječmen a chmel. V ječmeni je nejvíce zastoupen škrob s obsahem 58 – 65 %, dále pentozany 7 – 11 %, galaktoxytan 2 – 2,5 %, a v minimálním množství je to maltosa, rafinosa, invertovaný cukr a sacharosa. Ve chmelu je obsaženo 3,5 % glukosy a fruktosy a malé množství pentozanů. Bylo také prokázáno 12 – 14 % pektinů, které přechází v podobném množství i do piva [22].

- **Hořké chmelové látky**

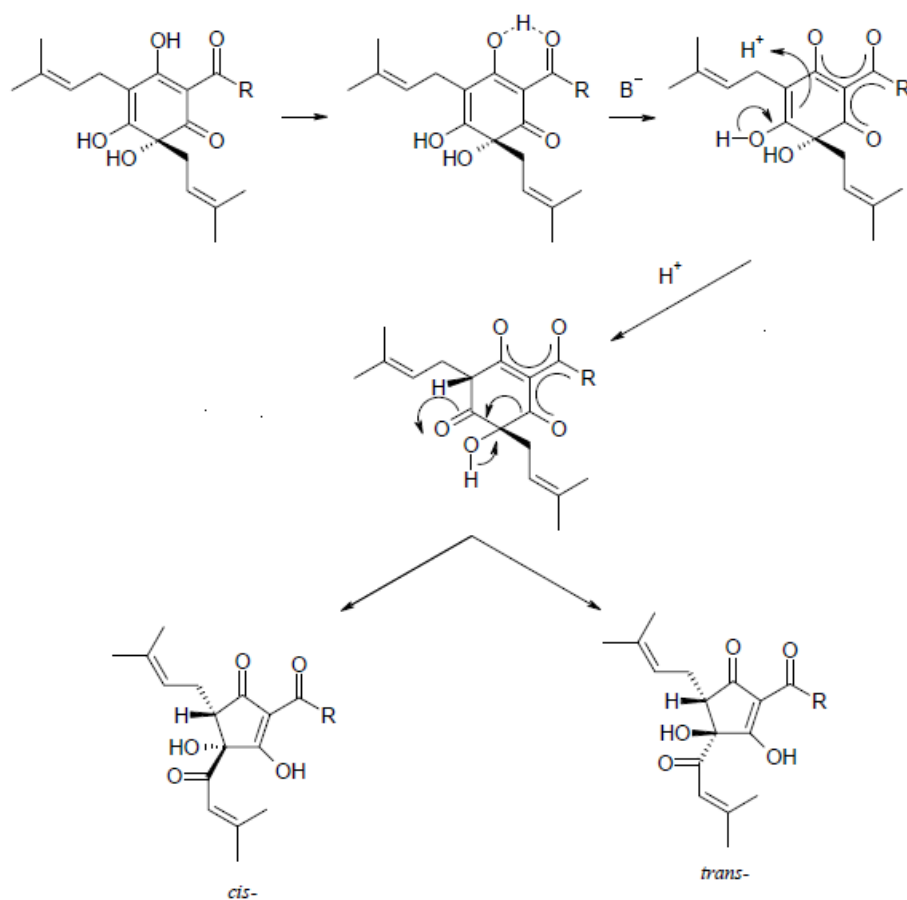
Pivo je jediným nápojem, který obsahuje hořké chmelové látky. Tyto látky se vyskytují v množství až 40 mg/l a zahrnují velmi si podobné organické sloučeniny, které snadno podléhají oxidaci a mnoha dalším chemickým přeměnám. Hořkost piva je způsobena přítomností hořkých kyselin, pocházejících z chmele. Jedná se o deriváty 1,3,5-benzotriolu (floroglucinolu), mající jako substituenty aromatického jádra karboxylovou kyselinu a 2 až 3 prenylované postranní řetězce. Nejvýznamnější a nejvíce účinnou skupinou je skupina α -hořkých kyselin (homology humulonu), skládající se převážně z humulonu, kohumulonu a adhumulonu. Struktury jednotlivých homologů se liší pouze strukturou postranního acylového řetězce; α -hořké kyseliny se v průběhu zahřívání mladiny přeměňují na iso- α -kyseliny, které zodpovídají až za 70 % hořké chuti piva. Tato isomerace způsobuje až čtyřicetinásobné zvýšení rozpustnosti isomerovaných hořkých kyselin a tím i zvýšení organoleptické hořkosti. Výsledkem reakce jsou dva geometrické isomery od každé iso- α -kyseliny a ani tyto látky však nejsou konečnými produkty zahřívání. V průběhu chmelovaru vznikají další, zatím nepopsané sloučeniny[12] [4,24] [2].



Obrázek č. 8 Humulon[12]



Obrázek č. 9 Lupulon[24]



Obrázek č. 10 Mechanismus isomerace humulonu [12]

Méně účinné jsou β -hořké kyseliny (homology lupulonu) kam patří lupulon, kolupulon, adlupulon tvořící nespecifické měkké pryskyřice (humulinony, luputritiony) a tvrdé pryskyřice (humulinové a hulupinové kyseliny). Podobně jako u humulonu probíhá isomerace i u lupulonů; tyto látky ale vykazují mnohem menší intenzitu hořké chuti. Jejich význam spočívá spíše v bakteriostatických vlastnostech.

Chmelové α -hořké kyseliny jsou jen málo rozpustné ve vodě, a tedy i v pivu. Za varu v slabě kyselém vodném prostředí z větší části izomerují za vzniku *cis-* a *trans-* α -hořkých kyselin. Tyto látky jsou rozpustnější a vykazují silnou organoleptickou hořkost. Podobná reakce přeměny β -hořkých kyselin se uskutečňuje jen v nepatrné míře, a proto k hořkosti přispívají mnohem menší mírou. V závislosti na obsahu hořkých látek vznikají díky tomu v pivu různé chuťové odstíny. Ta piva, která obsahují vyšší obsah β -hořkých kyselin, se vyznačují jemnější a méně drsnou hořkostí, než piva

obsahující převážně jen iso- α -hořké kyseliny. Intenzitu hořkosti ovlivňuje i podíl kohumulonu v α -hořkých kyselinách. Vysoký obsah kohumulonu má přímou souvislost s nízkým obsahem β -kyselin. Piva, vyrobená z chmelů s nízkým obsahem kohumulonu, mají mírnější a příjemnější hořkost než piva s vysokým obsahem kohumulonu. Kromě toho, že se hořké chmelové látky podílí na senzoričké hořkosti, jsou důležité i pro vznik a stabilitu pивní pěny. Na spotřebitele mohou mít sedativní až narkotický a bakteriostatický účinek a podporu sekrece žluči, jenž příznivě ovlivňuje trávicí proces, včetně zvýšení chuti k jídlu [12] [2] [25] [26].

3.6 VYBRANÉ METODY STANOVENÍ AKTIVNÍCH LÁTEK PIVA

3.6.1 Plynová chromatografie

Pro analýzu flavonoidů byla chromatografie využívána od začátku šedesátých let 20. století. Deriváty flavonoidů byly separovány na koloně naplněné SE-30 silikonovým polymerem, poté následovala tepelněvodivostní detekce. Frakce byly odebírány pro IR a UV-VIS spektroskopii. Dnes už není plynová chromatografie tak hojně využívána k analýze polyfenolů, ale její význam v poslední době začíná znova narůstat díky rozvoji vysokoteplotní chromatografie a zavedení vylepšených derivatizačních procedur. Při derivatizaci flavonoidů často dochází ke vzniku trimethylsilyletherových derivátů. Methylace flavonoidů s více než jednou hydroxylovou skupinou může napomoci vzniku několika derivátům, které komplikují kvantifikaci. Současné využití plynové chromatografie v analýze je zaměřeno na jejich antioxidační aktivitu, metabolismus a taxonomii. Flavonoidy jsou dnes nejčastěji detekovány hmotnostním spektrometrem s elektronovou ionizací v režimu výběrového monitorování iontů. Molekulární ion $[M+H]^+$ a fragmenty vzniklé odštěpením methylových nebo karbonylových skupin, popř. vzniklé retro Diels-Alderovou reakcí umožňují jejich detekci [27] [28] [29].

3.6.2 kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) patří mezi metody, které využívají dělení analytu mezi dvě fáze. Mobilní fází je kapalina a stacionární fází jsou různě velké částičky, nebo to může být tenká vrstva kapaliny nanosená na tuhých částicích, případně tenký povrch kapaliny nanosený na vnitřní stěně kapiláry [28] [30]. O tom, jak

bude vzorek separován, rozhoduje interakce se stacionární fází a použitá mobilní fáze. Tato metoda patří mezi nejvíce využívané metody pro stanovení až 80 % sloučenin hlavně organického původu. Můžeme ji využít pro analýzu vysokomolekulárních a biochemicky významných látek, zejména ve farmaceutickém průmyslu, biochemii, v průmyslu potravinářském, krmivářském, ve zpracování plastických hmot i dřeva a v neposlední řadě i ke kontrole čistoty životního prostředí [25] [31] [29].

3.6.3 Kapilární elektroforéza

Separace metodou kapilární elektroforézou je založena na odlišnosti elektroforetických mobilit iontů v elektroforetickém médiu uvnitř malé kapiláry. Většina studií využívajících kapilární elektroforézu pro analýzu flavonoidů se vztahuje k výzkumu přírodních produktů jako analýzu rostlin, zeleniny, bylin a rostlinných a zeleninových produktů. Hlavní typy kapilární elektroforézy jsou kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická elektroforéza s typickým fosfátovým a borátovým pufrům. Na kapilární elektroforézu obvykle navazují UV-VIS, fluorescenční, ED a MS detektory [27].

3.6.4 Chromatografie na tenké vrstvě

V dnešní době stále hraje chromatografie na tenké vrstvě v analýze flavonoidů významnou roli. Tato metoda je vhodná pro rychlé rozdělení rostlinných a léčivých extraktů před detailní analýzou instrumentálními technikami. Jako stacionární fáze je nejčastěji využíván SiO_2 . Spektrofotometrická detekce probíhá v rozmezí vlnových délek 350-365 nm nebo 250-260 nm [27] [28].

3.6.5 Hmotnostní spektrometrie

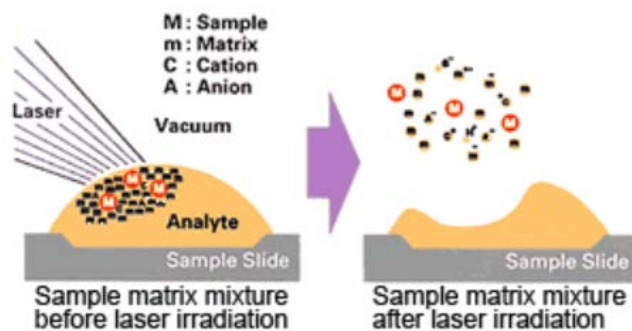
U zrodu hmotnostní spektrometrie stál v roce 1913 J. J. Thomson, který zacílil proud částic ionizovaného neonu přes magnetické a elektrické pole a umístěním fotografické desky v proudu iontů neonu změřil jejich odchylku. Na světelné desce pozoroval dvě světelné stopy a navrhl pro ně dvě různé odchylky parabol. Tak došel k závěru, že neonový plyn byl složen z atomů s různým nukleonovým číslem (^{20}Ne a ^{22}Ne) [32]. F. W. Aston sestrojil první moderní hmotnostní spektrometr o několik let později. Byl založen na separaci iontů v silném magnetickém poli permanentního

magnetu, tzv. magnetického selektoru. V roce 1922 získal Nobelovu cenu za chemii, když identifikoval 212 z 287 přirozeně se vyskytujících izotopů [33].

Hmotnostní spektrometrie patří mezi fyzikálně chemické metody, která využívá ve své analýze poměrů hmotnosti a náboje ionizovaných molekul. Využívá se pro určení hmotnosti částic nebo pro stanovení elementárního složení vzorku. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami, převážně s plynovou a kapalinovou chromatografií, umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složitější matrici. Hmotnostní spektrometr má zde roli jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [34].

MALDI-TOF

MALDI je zkratka pro "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization." Vzorek pro analýzu na MALDI je promíchán ve stejném množství matrice. Matrice absorbuje ultrafialové světlo (dusíková laserová světla, vlnová délka 337 nm) a převádí jej na tepelnou energii. Malá část matrice (až do 100 nm od horního vnějšího povrchu analytu ve schématu) se rychle ohřeje (několik nano sekund) a odpařuje, spolu se vzorkem.



Obrázek č. 10 Princip MALDI-TOF[35]

Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Na krystaly matrice se vzorkem působí laserové záření, způsobující desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku předáním H^+ od molekul

matrice [36]. Poté je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní štěrbinu průletového analyzátoru, čímž dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polaritě napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátoru. V závislosti na době letu molekul analyzátozem k detektoru se vypočítá poměr m/z [33] [35].

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF se nejčastěji využívá pro identifikaci proteinů a peptidů a analýzu dalších biomolekul. Díky měkké ionizaci, širokému rozsahu měřitelných hmotností a rychlému záznamu spekter se tato metoda uplatňuje výzkumu molekulárních profilů různých látek [37].

3.2 Separace proteinů

Kromě chromatografických technik jsou pro analýzu proteinů využívány elektroforetické metody, hmotnostní spektrometrie, imunochemické metody nebo nukleární magnetická rezonance či rentgenová krystalografie.

Elektromigrační (elektroforetické) metody

Elektroforéza představuje orientovaný pohyb elektricky nabitých částic v roztoku pomocí stejnosměrného elektrického pole. Uspořádání elektroforézy může být v trubičkách nebo v tenké vrstvě, přičemž úspěch separace látek ze směsi lze předpokládat jen tehdy, budou-li mít separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti [38].

PAGE a SDS-PAGE elektroforéza

PAGE využívá jako nosič polyakrylamidový gel (PAGE = polyacrylamide-gel electrophoresis), který je pro separaci proteinů nejběžnější. Provádí se ve speciálních aparaturách, kdy se gel, společně se vzorkem, umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud. Putující molekuly bílkovin ovlivňuje hustota polymerizovaného gelu vytvořeného polymerací monomeru akrylamidu, zesíťovacím činidlem, které se zabudovává do lineárního řetězce polymeru, a iniciačním činidlem persíranem amonným. Jako katalyzátor reakce se používá N,N' -tetramethylendiamin. Čím je větší hustota polymerizovaného gelu, tím jsou molekuly více zadržované v gelu a postupují pomaleji. Elektroforézu ovlivňuje také pH přítomného pufru, ten zajišťuje

vodivé prostředí. Přítomnost dodecylsulfátu sodného (SDS) také ovlivňuje to, jak se molekuly budou chovat. Uděluje totiž proteinům uniformní záporný náboj a jejich pohyblivost je pak dána velikostí molekuly. Bílkoviny mají schopnosti vázat SDS v množství asi 1,4 g SDS na gram bílkovin. Metoda je intenzivně využívána na stanovení relativní molekulové hmotnosti neznámých bílkovin.

Po skončení elektroforézy se provádí detekce – nejčastěji pomocí barviv s vysokou afinitou k molekulám bílkovin – jako je Amidočern 10B, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ponceau S nebo stříbrem, které je až 100krát citlivější [39].

2D elektroforéza

Dvojměrná neboli 2D elektroforéza je pro stanovení proteinových vzorků velmi využívána. Jedná se o kombinaci dvou izoelektroforetických dělení, kdy se nejdříve vzorek rozdělí za pomoci izoelektrické fokusace na základě izoelektrických bodů. V kolmém směru se poté provede elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a v přítomnosti SDS se jednotlivé bílkoviny rozdělí na základě jejich molekulové hmotnosti. Tímto způsobem je možno analyzovat velmi komplexní směsi obsahující desítky bílkovin. Díky této mimořádné dělicí schopnosti patří dvojměrná elektroforéza k základním a hojně používaným technikám umožňujících identifikaci rozmanitých biopolymerů [40].

Mikročipová elektroforéza

Rostoucí zájem o miniaturizaci procesů v posledních letech vedl k zavedení elektroforetických technik na mikročipech. Mikrofluidní zařízení se používá na manipulaci s nepatrnými množstvími tekutin popř. s nepatrným množstvím biologických jednotek přes separační rozvětvený mikrokanálek, který umožňuje integraci různých chemických a biochemických procesů v rychlém a automatickém jednolitém mikroproudovém systému. Tato technika je stále se vyvíjející metodou, která dovoluje propojení více separačních technik dohromady. Nejvíce se používá pro analýzu biomakromolekul a to především nukleových kyselin, bílkovin a sacharidů [41].

3.7 LEGISLATIVA SOUVISEJÍCÍ S PIVEM

Legislativa související s pivem je dána:

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí.

Zákon č. 110/1997 Sb. Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů

Vyhláška č. 113/2005 Sb. Vyhláška o způsobu označování potravin a tabákových výrobků

České pivovary mohou po splnění níže uvedených předpisů používat u svých výrobků označení Chráněné zeměpisné označení (CHZO) „České pivo“

Nařízení Rady (ES) č. 510/2006

Nařízení Komise (ES) č. 1014/2008

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Charakteristika vzorků

Pro analýzu bylo vybráno celkem 11 vzorků piva, z toho 2 vzorky filtrovaného a 2 vzorky nefiltrovaného piva od velkých výrobců, dále pak jeden vzorek filtrovaného a 3 vzorky nefiltrovaného od výrobců z malých pivovarů a 3 vzorky nealkoholického piva vyráběné ve velkých pivovarech [42] [43] [44] [35] [45] [46] [47].

Vzorek č. 1.

Jedná se o vzorek nefiltrovaného piva pocházející z velkovýroby, které zahrnuje použití pšeničného sladu, speciálně vybraných chmelů a špetku koriandru. Toto pivo má 5,0 % obj. alkoholu, jeho hořkost je 18 BU.

Vzorek č. 2.

Vzorek č. 2. je spodně kvašený ležák uvařený z 2 druhů sladů a 5 druhů chmele, včetně žateckého, který je srdcem tohoto piva. Tento ležák je středně až silně prokvašený s obsahem alkoholu 5 % a hořkostí 27 BU. Toto pivo je vyráběno ve velkém pivovaru.

Vzorek č. 3.

Toto pivo se před stáčením nefiltruje a tak nepřichází o kvasinky, které dodávají tomuto pivu nezaměnitelný vzhled, mírně kvasničnou chuť a vůni. Jedná se o pivo vyráběno ve velkém pivovaru, vyznačuje se zlatožlutou až zlatohnědou barvou s harmonickou chmelovou hořkostí a velmi dobrou pěnivostí. Má dobrý říz, plnost a obsah alkoholu 4 %.

Vzorek č. 4.

Jedná se o typické české pivo pocházející z velkého pivovaru, které je charakteristické vyváženou chutí a vynikající pěnivostí. Po napití zanechává pocit příjemné, pozvolna se ztrácející hořkosti bez drsného a svíravého nádechu. Toto pivo je filtrované a má objem alkoholu 4 %.

Vzorek č. 5.

Světlý nefiltrovaný spodně kvašený ležák českého typu 12°, 5 % alkoholu. Tento malý pivovar pro svou výrobu používá vlastní vodu z artézské studně, vlastní ječný slad a kvalitní žatecký chmel. Především světlá piva pivovaru se vyznačují celkovou intenzitou vůně, silným řízem a plností.

Vzorek č. 6.

Světlé, spodně kvašené, filtrované výčepní pivo typu bitter - extrachmelené 10° a 3,8 % alkoholu. Tento malý pivovar pro svou výrobu používá vlastní vodu z artézské studně, vlastní ječný slad a kvalitní žatecký chmel. Především světlá piva pivovaru se vyznačují celkovou intenzitou vůně, silným řízem a plností.

Vzorek č. 7.

Tento vzorek pochází z malého pivovaru, kde vaří spodně kvašená piva plzeňského typu. Tento světlý ležák má obsah alkoholu 4,8 % je nefiltrovaný a bez pasterace.

Vzorek č. 8.

Pivo vyrobené v menším pivovaru se vyznačuje výraznější hořkostí, plnější chutí a ostrým řízem. Výroba vychází z nejlepších pivovarských surovin humnový slad, český žatecký chmel, voda z hloubkového vrtu u Slemena a osvědčeného kmene pivovarských kvasinek. Delší doba ležení a zrání piva v ležáckých tancích, dodává nápoji potřebné harmonizující složky. Obsah alkoholu je vyšší jak cca 5,2%, Díky tomu že se pivo nefiltruje, dostává nezaměnitelný charakter jak vůně tak barvě.

Vzorek č. 9.

Základem pro výrobu tohoto nealkoholického piva jsou suroviny prvotřídní kvality, používání klasických pivovarských surovin, tedy vody, chmele a ječmene. Voda je získávána z okolních Beskyd – z přehradní nádrže Morávka. Ječmen je zpracováván přímo v pivovaru ve vlastní sladovně, kde se vyrábí výhradně světlý slad plzeňského typu. Chmel přichází do pivovaru ve dvou formách. Tzv. chmelové pelety pochází především z Žatecka a Ústecka. Jedná se o sušený, rozemletý a slisovaný chmel, který dodává pivu tradiční aroma. Výluh z chmele, tzv. chmelový extrakt, zase pivo

obohacuje o hořké kyseliny a vonné látky. Nejdůležitější článek výrobního postupu představují speciální kvasinky, které se od klasických liší tím, že produkují jen velmi malé množství alkoholu. I když je tedy délka kvasného procesu přibližně stejná jako při vaření normálního piva, alkoholu se při něm uvolní mnohem méně. Touto cestou vznikne nápoj, který obsahuje minimum alkoholu, ale díky délce kvašení se zároveň může chlubit všemi vlastnostmi tradičního českého piva – plností chuti, řízem, příjemnou hořkostí. Toto pivo má obsah alkoholu 0,49 %.

Vzorek č. 10.

Vzorek č. 10. je nealkoholické pivo, jehož chuť je tak blízko pivu alkoholickému, že jej od něj téměř nerozeznáte. Díky tradičnímu výrobnímu postupu si kromě původní příjemně hořké chuti piva zachovává i výraznou sladovou vůni a bohatou pěnu. Toto pivo má obsah alkoholu 0,5 % a je pasterováno.

Vzorek č. 11.

Toto pivo je světlé nealkoholické s jemně hořkou chutí a výrazným řízem, jeho obsah alkoholu nepřesahuje 0,49 % a hořkost se pohybuje okolo 25 BU.

číslo vzorku	typ	obsah alkoholu (%)
1	nefiltrovaný	5.0
2	ležák	5.0
3	nefiltrovaný	4.0
4	světlé výčepní	4.0
5	nefiltrovaný	5.0
6	filtrovaný	4.0
7	nefiltrovaný	4.8
8	nefiltrovaný	5.0
9	nealko	0.5
10	nealko	0.5
11	nealko	0.5

Tabubka č. 3 Přehled použitých vzorků piva

4.2 Zpracování vzorků pro analýzy

Vzorky piva pro všechny analýzy byly před vlastním měřením sonifikovány za účelem odstranění oxidu uhličitého. Dále bylo pivo ředěno nebo koncentrováno dle

požadavků určité metody. Pro analýzu na BS 200 byly použity vzorky jak plného piva tak 1x ředěného v ACS vodě. Při identifikaci proteinů na SDS-PAGE gelu byly vzorky 2x koncentrovány odpařením. Pro analýzu proteinů pomocí MALDI TOF byly vzorky nejprve precipitovány, dále byl pro stanovení použity vzorky z SDS-PAGE gelu. Pro analýzu flavonoidu a fenolů na LC/MS byly vzorky pouze sonifikovány ale dále nijak neředěny.

4.3 Použité metody

1. Automatická spektrofotometrická analýza

Automatická spektrofotometrická analýza byla provedena pomocí přístroje BS-200 Chemistry Analyzer, který se skládá z automatického spektrofotometru, který je složený z kyvetového prostoru, reagenčního prostoru s karuselem pro reagenty a přípravu vzorků (temperovaný na 4 ± 1 °C) a optického detektoru. Jako zdroj světla slouží halogeno-wolframová žárovka. Pomocí robotického ramene s dávkovací jehlou je zabezpečen přenos vzorků a reagentů. Automatickým míchadlem dochází k míchání vzorků a činidla o objemu 2-45 μ l. Kontaminace je minimalizována díky proplachování dávkovací jehly a míchadla proudem Milli-Q vody. Pro detekci bylo možné využít vlnových délek: 340, 405, 450, 510, 546, 578, 630, 670 nm. Zařízení je kontrolováno pomocí softwaru BS 200 [48] [21].

Stanovení celkových proteinů

- **Stanovení celkových proteinů pomocí Biuretové metody**

Stanovení celkových proteinů pomocí této metody je podrobně popsáno v publikaci Strickla.R, Freeman et al. 1961. Principem je reakce peptidové vazby s $\text{Cu}^{(II)}$ v alkalickém prostředí za tvorby modrofialového zbarvení.

Do kyvety bylo napipetováno 150 μ l biuretova činidla (100mM vinan sodno-draselný, 100mM NaOH, 15mM KI, 6mM CuSO_4) a následně byly napipetovány 3 μ l vzorku. Po 5 min inkubace při 37 °C byla změřena absorbance při vlnové délce

$\lambda = 546 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagensie a hodnoty absorbance po 5 minutové inkubaci se vzorkem [49].

Stanovení antioxidační aktivity

Výsledek antioxidační aktivity byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové. Nápoj měl takový antioxidační potenciál jako násobek koncentrace kyseliny gallové.

- **Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH[•] testu**

Principem tohoto testu je schopnost stabilního volného radikálu DPPH[•] (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) reagovat s donory vodíku. DPPH[•] vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukcí antioxidantem (AH) nebo radikálem (R[•]) roztok odbarví dle následující reakce $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$, $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{R}^{\bullet} \rightarrow \text{DPPH-R}$.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagensie R1 (0.190 mM 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl- DPPH[•], 50% DMSO (dimethylsulfoxid), 10mM acetátový pufr, pH 4), následně bylo přidáno 15 μl měřeného vzorku. DPPH[•] vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Absorbance byla měřena 5 minut při $\lambda = 510 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance před přidáním vzorků (2. minuta měření) a hodnoty absorbance po 7 minutách [50].

- **Stanovení obsahu celkových fenolů s použitím Folin-Ciocalteho činidla**

Jedná se o spektrofotometrickou metodu, která se využívá pro celkové stanovení antioxidační aktivity. Princip spočívá v oxidaci fenolických látek v alkalickém prostředí, kdy ze žluté fosfowolframové heteropolykyseliny vzniká modrý komplex, jehož maximální absorpce je závislá na kvantitativním a kvalitativním složení fenolických směsí. Folin-Ciocalteho činidlo obsahuje sloučeniny, které jsou schopny reagovat s fenolickými sloučeninami. Při reakci dochází k redukcí látky na chromogeny, které jsou měřeny při absorpaci v rozmezí vlnových délek 700 – 760 nm. Jako standard slouží kyselina gallová. Výsledná hodnota se přepočítává na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 316 μl reagensie R1 (3,75% Folin-Ciocalteho činidla v destilované vodě), následně bylo přidáno 4 μl měřeného vzorku. Reakce byla odstartována přidáním 80 μl reagensie R2 (10% Na_2CO_3 v destilované vodě). Absorbance byla měřena 10 minut při $\lambda = 670 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance před přidáním vzorků (2. minuta měření) a hodnoty absorbance po 7 minutách. Výsledná absorbance analyzovaného vzorku byla vyjádřena jako GAE·g-1 (Gallic Acid Equivalents), ekvivalentní množství kyseliny gallové na 1 g vzorku [51].

- **Ellmanova spektrofotometrická metoda.**

Pro stanovení sulfhydroxilových skupin (-SH) byla použita Ellmanova metoda. Do kyvety bylo napipetováno 277 μl Ellmanova činidla-R1 kyselina-DTNB (2mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoová)) v 50mM $\text{Na}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$, následně bylo přidáno 10 μl měřeného vzorku. Reakce byla zahájena přidáním 33 μl reagensie R2 (1M Tris, pH 8). Podstatou stanovení je reakce Ellmanova činidla s -SH skupinami stanovované látky za vzniku ekvivalentního množství 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB^{2-}). Směs byla inkubována 5 minut při 37 °C, absorbance byla měřena při $\lambda = 405 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagensie R1 a hodnoty absorbance po 5 minutové inkubaci se vzorkem[52] [51].

2. HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

Analýza vybraných látek ze skupiny fenolů a flavonoidů byla provedena pomocí kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), který byl připojen k trojitému kvadrupólovému hmotnostnímu detektoru s ionizací ESI.

Systém byl sestaven:

- Odplyňovač Agilent Technologies 1200 Series (model G1379B),
- Binární pumpa Agilent Technologies 1200 Series (model G1312B),
- Autosampler Agilent Technologies 1200 Series (model G1367D),
- Termostat na kolonu Agilent Technologies 1200 Series (model G1316B),

- Detektor diodového pole Agilent Technologies 1200 Series (model G1315C),
- Trojitý kvadrupól 6460 Triple Quad LC/MS (model G6460A).

Pro separaci byla použita kolona ZORBAX EC 18 o rozměrech 50 x 3.0 mm s velikostí částic 2.7 µm.

Separace vybraných fenolických sloučenin:

Mobilní fáze byla složena z A: 100% methanolu a B: 0.2% kyseliny octové. Dále byl použit lineární gradient: 0.00 min (85%B), 0.17 min (85%B), 0.50 min (75%B), 1.70 min (70%B), 4.00 min (70%B), 6.00 min (85%B). Průtok mobilní fáze byl 0.6 ml/min a kolona byla termostatována na 45 °C.

Parametry trojitého kvadrupólu: ESI: negativní mód, teplota plynu: 300 °C, průtok plynu: 12 l/min, nebulizer: 45 psi, teplota zaostřovacího plynu: 250 °C, průtok zaostřovacího plynu: 11 l/min, napětí na kapiláře: 3500 V.

Separace vybraných flavonoidních sloučenin:

Mobilní fáze se skládala z A: 100% acetonitril a B: 0.2% octová kyselina. Byl použit lineární gradient: 0.0 min (80%B), 0.3 min (40%B), 1.4 min (0%B), 1.8 min (80%B). Průtok mobilní fáze byl 0.7 ml/min a kolona byla termostatována na 60 °C.

Parametry trojitého kvadrupólu: ESI: negativní mód, teplota plynu: 350 °C, průtok plynu: 12 l/min, nebulizer: 45 psi, teplota zaostřovacího plynu: 300 °C, průtok zaostřovacího plynu: 11 l/min, napětí na kapiláře: 3500 V.

3. SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforetická separace byla prováděna pomocí aparatury Mini Protean Tetra Cell o rozměrech gelu 8,3 x 7,3 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Separáčnı gel byl o koncentraci 12,5 % (m/V)

Složení: Acrylamid/Bis-acrylamid 30% roztok, 1,88M TRIS/HCl, 0,5% SDS, Milli-Q voda, *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamin, peroxosıran amonný

Zaostřovací o koncentraci 5% (m/V)

Složení: Acrylamid/Bis-acrylamid 30% roztok, 0,625M TRIS/HCl, 0,5% SDS, Milli-Q voda, *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamin, peroxosíran amonný

Polymerace separačního i zaostřovacího gelu byla prováděna za pokojové teploty po dobu 45 minut. Vzorčky byly inkubovány při 95 °C, 5 min. v neredukujícím pufru (20% glycerol, 0.1% bromfenolová modř, 50mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6.8) v poměru 2:1. Pro určení molekulové hmotnosti jsme použili protein ladder #7703 from New England Biolabs. Elektroforéza probíhala za podmínek 180 V, 30 minut a 20 ° C v Tris-Glycine running pufru (0.025M Trizma-base, 0.19 mol/L glycin a 3.5 mmol/L SDS, pH 8.3). Následně byl gel obarven Coomassie Brilliant Blue R250, barvení stříbrem a Sypro ruby. Tyto tři metody byly vybrány kvůli rozdílné citlivosti barvení.

Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250

Postup barvení:

1. Gel zahřát s roztokem A (0,05 g Brilliant Blue R, 25 ml isopropanol, 10 ml kyselina octová, 65 ml milli-Q voda) po dobu 1,5 minuty do varu.
2. Nechat 5 minut inkubovat, vylít roztok A a propláchnout vodou.
3. Nalít roztok B (0,005 g Brilliant Blue R, 10 ml isopropanol, 10 ml kyselina octová, 80 ml milli-Q voda), zahřívát do varu cca 1,5 minuty.
4. Propláchnout vodou, a zahřívát v roztoku C (0,002 g Brilliant Blue R, 10 ml isopropanol, 90 ml milli-Q vody).
5. Zahřívát s roztokem D (10 ml kyselina octová, 90 ml milli-Q voda) a nechat 5 minut inkubovat, tento krok opakovat dle potřeby.

Barvení stříbrem

Postup barvení:

1. Inkubace 45 minut v roztoku A (5,7 ml kyselina octová, 32 ml methanol, 0,5 37% formaldehyd), promýt milli-Q vodou.

2. 3x10 minut v roztoku B (250 ml methanol, 250 ml milli-Q voda), po třetí inkubaci v roztoku B promýt milli Q vodou.
3. Inkubace 60 sekund v roztoku C (0,1g thiosíran sodný), a proplachovat milli-Q vodou po dobu 20 sec.
4. Inkubace 20 minut v roztoku D (1 g dusičnan stříbrný, 0,38 ml 37% formaldehyd) a poté rychle propláchnout milli-Q vodou.
5. Inkubace v roztoku E, po dosažení cíleného barvení propláchnout milli-Q vodou a fixovat roztokem F (32 ml methanol, 5,7 ml kyselina octová).

Barvení SYPRO Ruby

Chemikálie: Reagent-grade metanol, Reagent-grade kyselina octová, Trichloroctová kyselina, Milli-Q voda

Postup barvení

	chemikálie	základní protokol	rychlý protokol
Fixace	50% metanol, 7% kyselina octová	100 ml, 30 min.	100 ml, 15 min. 100 ml, 15 min.
Barvení	SYPRO Ruby gel stain	60 ml, 12 hod.	60 ml 30 sec. ohřev 30 sec. odstát 30 sec. ohřev 5 min. odstát 30 sec. ohřev 23 min. odstát
Promývání	10% metanol, 7% kyselina octová	100 ml, 30 min.	100 ml, 30 min

Tabulka. č. 4 Postup barvení SYPRO Ruby

4. MALDI-TOF MS analýza odsolených vzorků pív

Hmotnostní analýza byla provedena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Bruker ultrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Jako matrice byly použity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoové (DHB) o koncentraci 20 mg/ml v 50% acetonitrilu (ACN) a 0,1% kyselině trifluoroctové

(TFA). Mikrovialky s roztoky matric byly při laboratorní teplotě vloženy na 2 minuty do ultrazvukové lázně Bandelin 152 Sonorex Digital 10P (Bandelin electronic GmbH, Německo) nastavené na 50% intenzitu. Na MALDI desku MTP 384 (Bruker) byl vždy nanesen nejprve 1 μ l připraveného vzorku a po uschnutí při laboratorní teplotě a atmosférickém tlaku byl nanesen 1 μ l roztoku matrice. Pro kalibraci přístroje byla na MALDI desku nanesena směs kalibračních peptidů a proteinů (Bruker). Profilová hmotnostní spektra jednotlivých vzorků pív byla měřena v lineárním pozitivním modu v rozsahu 1-100 kDa. Pro peptidové mapování (peptide mass fingerprinting) byly extrakty peptidů po trypsinaci vzorků v gelu analyzovány v reflektornovém pozitivním modu v rozsahu 700-8000 Da. Zprůměrováno bylo vždy 1000 hmotnostních spekter z jedné skvrny. Výkon laseru byl nastaven 5-10 % nad prahovou hodnotu [53].

Odsolení vzorků pív pomocí ZipTip C18 špiček

Před hmotnostní analýzou byly vzorky pív upraveny odsolením a zkoncentrováním pomocí ZipTip C18 špiček (Merck spol. s r.o. – divize Merck Millipore, ČR) podle návodu přiloženého k balení [53].

Trypsinace vzorků pív v gelu

Pro peptidové mapování (PMF) bylo potřeba specificky naštěpit proteiny v gelu z SDS-PAGE. Vybrané proteiny byly vyříznuty skalpelem z gelu a výřezky byly přemístěny do čistých mikrovialek, na každý výřezek připadla jedna mikrovialka. Následně byla provedena trypsinace v gelu podle protokolu Shevchenka a kol. [53]. Trypsinace probíhala 14 h. při 37 °C. Po trypsinaci byly peptidy extrahovány pomocí 0,1% TFA v 50% ACN. Před nanesením na MALDI desku bylo provedeno odsolení pomocí ZipTip C18 špiček.

Peptidové mapování (PMF)

Pro porovnání hmotnostních spekter peptidů po trypsinaci s proteomickými databázemi byl využit MASCOT Server (Matrix Science, MA, USA). Jako srovnávací databáze byla zvolena SwissProt databáze. Byly zadány následující parametry: trypsin

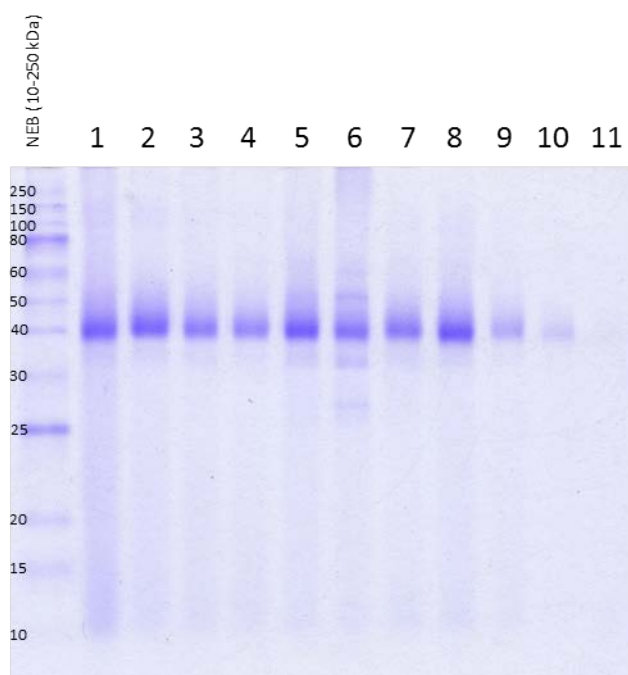
jako použitý peptid, vynechání jednoho štěpného místa trypsinem, oxidace methioninu jako variabilní modifikace, monoizotopické píky, tolerance hmotnosti peptidů $\pm 0,1$ Da a hmotnosti píků byly zadány jako MH^+ . Statisticky významné výsledky identifikace měly score vyšší než 70 [53].

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

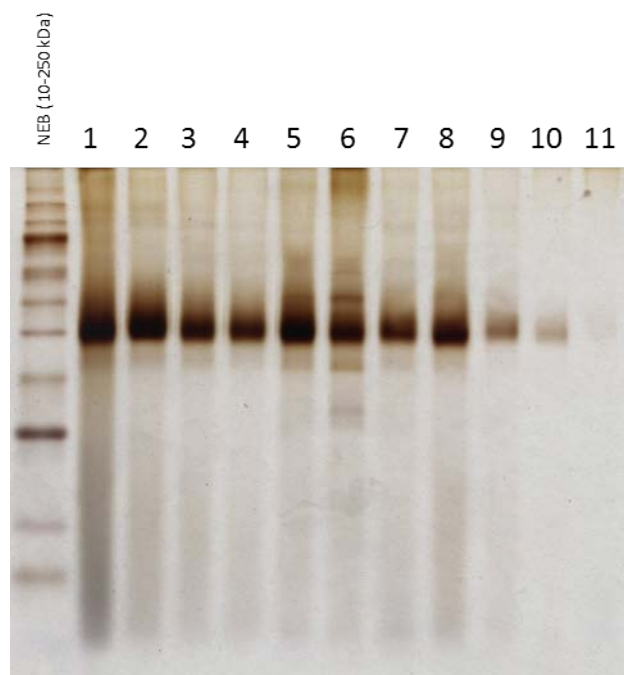
1. Stanovení proteinů piva

Výsledky z SDS-PAGE elektroforézy potvrdily přítomnost typických majoritních proteinů. Zejména Proteinu Z což je albuminová bílkovina s molekulovou hmotností 40 kDa v pivu zastává 10 – 20 % všech nedialyzovatelných bílkovin a je přibližně z jedné třetiny glykosilován. Další významnou bílkovinou je Lipid Transfer Protein 1 (LPT1), polypeptid, jehož molekulová hmotnost je 9660 Da a patří mezi albuminové bílkoviny se schopností inhibovat sladové cysteinové endoproteázy. Lipid Binding Proteins (LBP) jsou proteiny s hmotností přibližně 13 kDa vázané na buněčné membráně. Mezi další významné proteiny patří hordeiny, hlavní zásobní bílkoviny ječmene, složené z polymorfní směsi několika složek, představují vysokomolekulární (> 51 kDa), středněmolekulární (29 -51 kDa) a nízkomolekulární (< 29 kDa) látky. Tyto látky mají negativní vliv na vznik koloidních zákalů piva.

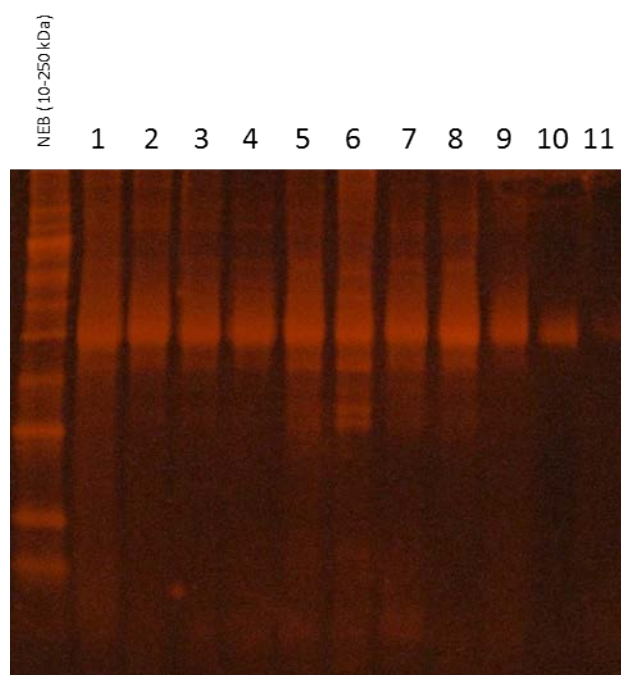
Téměř všechny suroviny použité ve výrobě piva obsahují obrovskou škálu bílkovin, ale pouze minimum přechází přes proces výroby až do finálního produktu. To co nakonec přejde do finálního výrobku piva, tedy záleží na použité technologii a vstupních surovinách, toto je tedy možnost jak využít stanovení proteinů pomocí SDS-PAGE k analýze identifikaci piva ke stanovení jeho jakosti. Z výsledku je patrné že nelze účinně oddělit všechny frakce proteinů a ani detailně analyzovat proteinové složení piva. Proto je nutné použít další techniky. Dále lze z gelů poukázat na rozdíl mezi nealkoholickými pivy (viz. č. 9, 10, 11) kde je na první pohled zřejmé že tato piva obsahují mnohem méně bílkovin než piva alkoholická.



Obrázek č. 11 Barvení Coomassie Blue



Obrázek č. 12 Barvení stříbrem



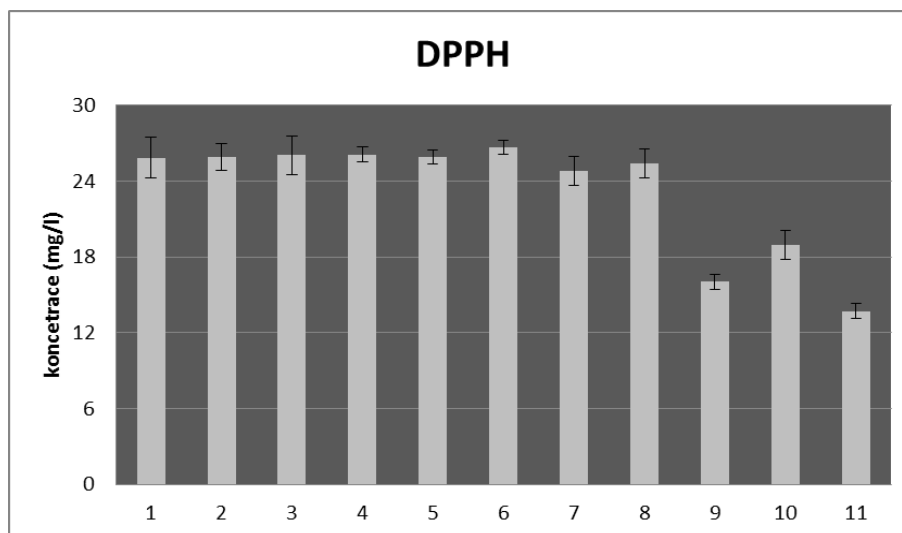
Obrázek č. 13 Barvení SYPRO Ruby

Výsledky z SDS-PAGE elektroforézy potvrdily přítomnost typických majoritních proteinů v porovnání s dostupnou literaturou. Elektroforeticky byla potvrzena daná velikost proteinů.

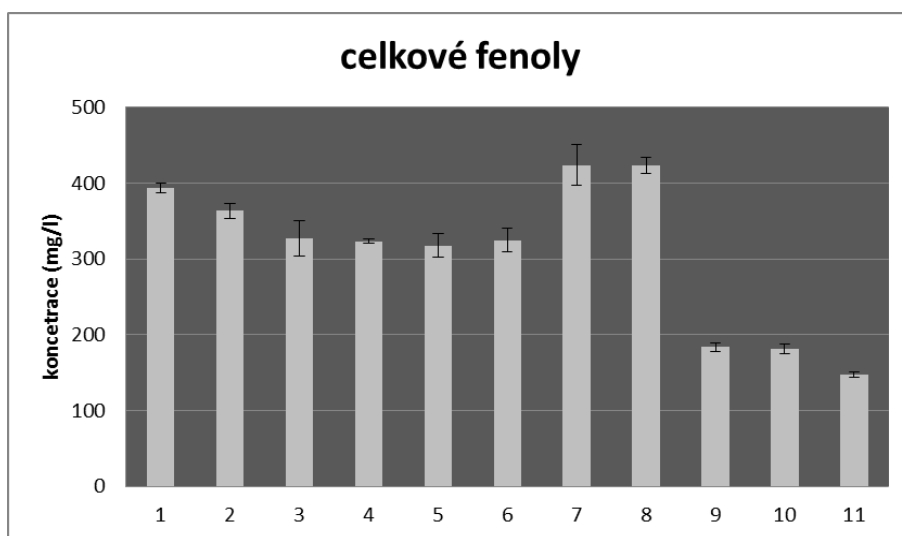
2. Stanovení antioxidační aktivity, celkových thiolů, celkových fenolů a celkových bílkovin.

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno u všech vzorků metodou DPPH*. Jak je z obrázku č. 14 viditelné u vzorků piva 1 - 8 což byla piva filtrovaná a nefiltrovaná byla antioxidační aktivita téměř stejná, pohybovala v rozpětí 24,77 mg/l do 26,65 mg/l. Zatímco u piva nealkoholického, (vzorky 9 – 11) byly hodnoty v rozmezí 13,71 mg/l do 18,97 mg/l což je v porovnání s pivy alkoholickými mnohem nižší. Stanovení obsahu celkových fenolů bylo provedeno reakcí s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Získané výsledky byly nejprve přepočteny na ekvivalentní množství kyseliny gallové a poté na 1 ml v 1 litru piva. Z obrázku číslo 15 je patrné že nejnižší antioxidační aktivitu měla piva nealkoholická (vz. 9 – 11). U vzorků 7 a 8 byla pozorována zvýšená aktivita (423.64 a 423.56 mg/l), jednalo se o piva nefiltrovaná pocházející z menších pivovarů vzorek č. 1 měl také zvýšenou aktivitu jeho hodnota

byla 393.24 mg/l. U vzorků 2 – 6 se hodnoty pohybovaly v rozmezí 363.18 mg/l a 317.39 mg/l.



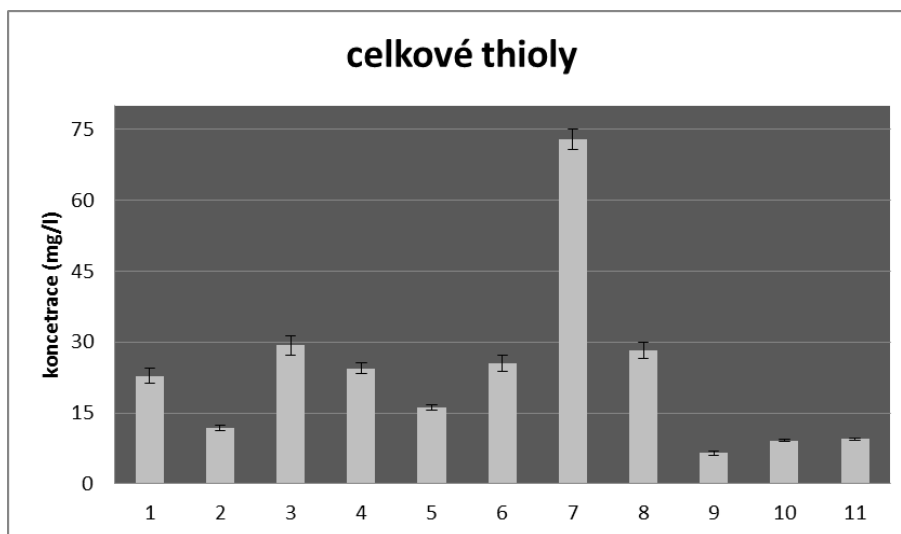
Obrázek č. 14 výsledky stanovení antioxidační kapacity (DPPH)



Obrázek č. 15 Výsledky stanovení celkových fenolů

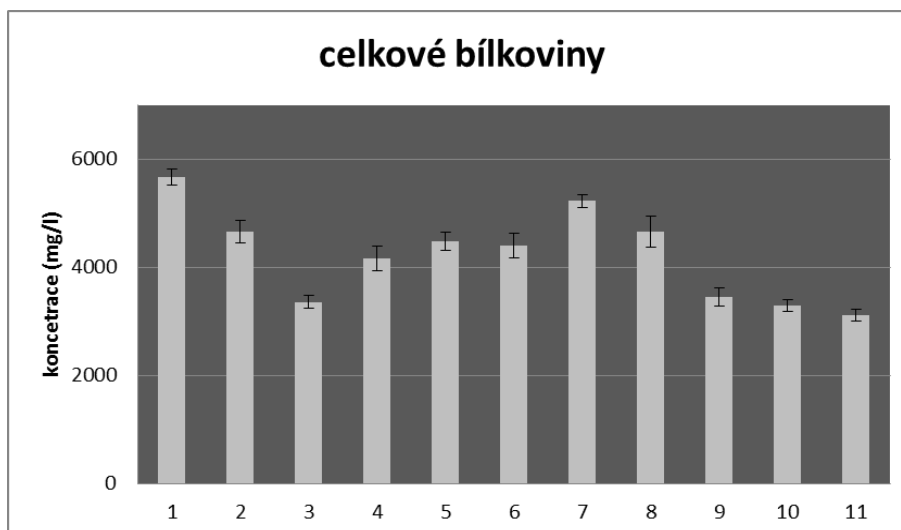
Pro stanovení SH skupin byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Výsledky jsou znázorněny na obrázku č. 16. Vysoká koncentrace thiolů byla stanovena u vzorku č. 7, jednalo se o vzorek nefiltrovaného piva. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u vzorků 9 – 11 (nealkoholická piva), kde se hodnoty pohybovaly v rozmezí

6,52– 9,45 mg/l. Při srovnání vzorků filtrovaných a nefiltrovaných můžeme zde zaznamenat rozdíl hodnot, kdy v případě vzorků 1 a 2, (vzorky pocházely od stejné firmy, ale první bylo nefiltrované), můžeme pozorovat u nefiltrovaného vzorku nárůst koncentrace thiolů. To stejné platí pro vzorky 3 a 4. Opačného trendu bylo dosaženo u vzorků 5 a 6, kde první vzorek byl nefiltrovaný a druhý filtrovaný, zde je koncentrace thiolů vyšší u filtrovaného piva.



Obrázek č. 16 Výsledky stanovení celkových thiolů

Stanovení celkových proteinů bylo provedeno pomocí Biuretovy metody a graficky jsou znázorněny na obr. č. 17. Z grafu vyplývá, že nejméně bílkovin obsahují vz. č. 3 (pivo nefiltrované) a vz. č. 9, 10, 11 (piva nnealkoholická) tato piva se pohybovala v rozmezí 3350 až 3452 mg/l. Tímto byly ověřeny hodnoty na SDS-PAGE elektroforéze. Nejvíce bílkovin obsahoval vz. č. 1 (5660 mg/l) a vz. č. 7 (5222 mg/l), kdy se jednalo o nefiltrovaná piva. Vzorky č. 2, 4, 5, 6 a 8 se pohybovala v rozmezí 4165 mg/l a 4653 mg/l.



Obrázek č. 17 Výsledky stanovení celkových bílkovin

Zjištěné hodnoty antioxidační aktivity získané pomocí metody DPPH se pohybují v rozpětí hodnot 13,71-26,65 mmol/l kdy u piv nealkoholických byla tato hodnota nejnižší. Většina studií, například studie [48], [54] ,udává výsledek antioxidační aktivity stanovené pomocí DPPH* testu a metody FRAP, jako ekvivalent troloxu. V předkládané diplomové práci byla naměřená antioxidační aktivita přepočtena na ekvivalet kyseliny gallové. Naměřené výsledky tedy nelze s dostupnou literaturou srovnávat.

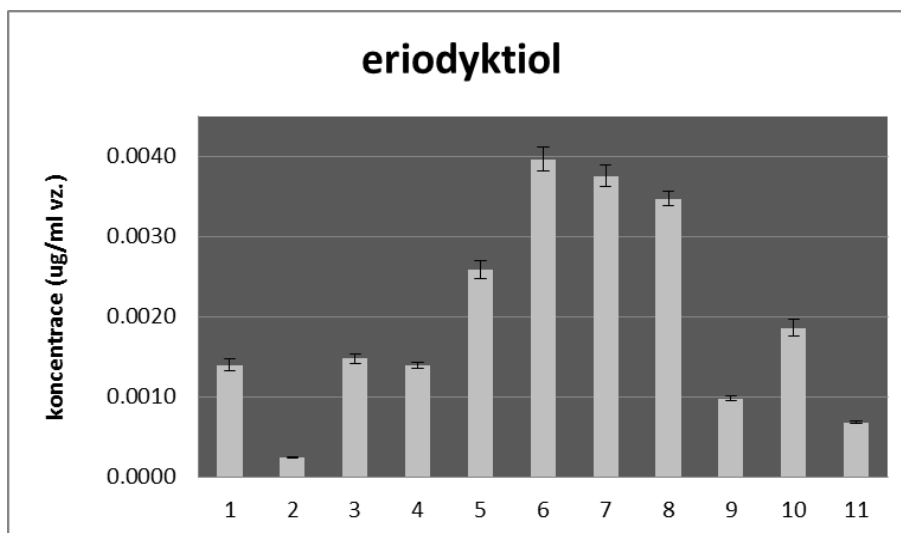
Obsah celkových fenolů v pivech alkoholických (filtrované, nefiltrované) a nealkoholických byl v rozmezí 147,66-423,62 mg/l, kdy u piv nealkoholických byla hodnota mnohem nižší. V diplomové práci [55] kde byla prováděna podobná analýza byly naměřeny podobné hodnoty. Rozdíly v hodnotách mohou být způsobeny rozdílnou přípravou.

V případě obsahu bílkovin v pivu nebyla nalezena žádná studie která by se zabývala stanovením obsahu bílkovin v pivu[23]. Nicméně většina výrobců piva deklaruje obsah bílkovin, dle uvedených hodnot na etiketách výrobky byly námi naměřené hodnoty podobné.

3. Stanovení koncentrace vybraných fenolických a flavonoidních sloučenin

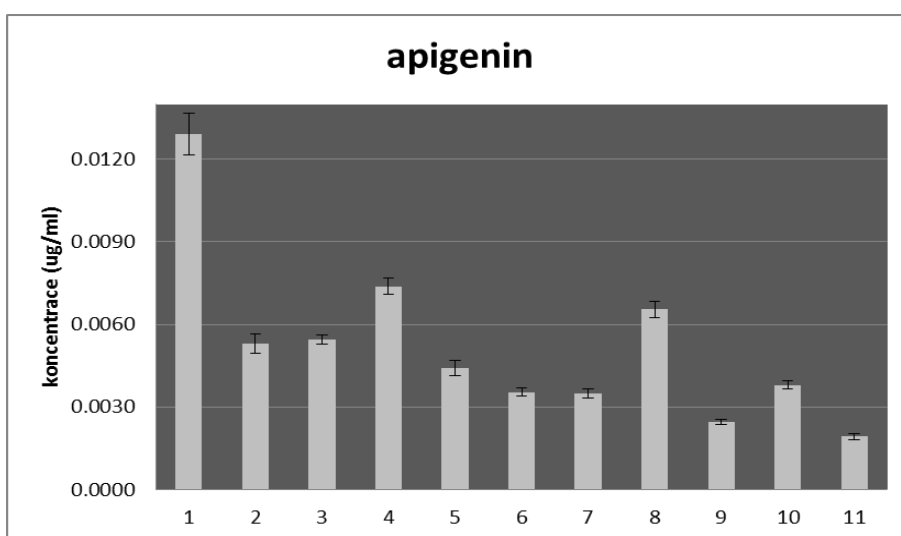
Na obrázku č. 18 je vyobrazena stanovená koncentrace eridiktolu ve vzorcích piva. Z grafu je patrné, že u vzorků č. 5, 6, 7, 8 jsou mnohem vyšší hodnoty než u ostatních

vzorků piva. Tyto piva pocházela z malých pivovaru, a až na vz. č. 6 (filtrovaný). Nejnižší naměřenou koncentraci měl vz. č. 2 což bylo filtrované pivo. Vzorky nealkoholického piva (9, 10, 11) až na vzorek 10 vykazovaly nižší hodnoty v porovnání s alkoholickými pivy.



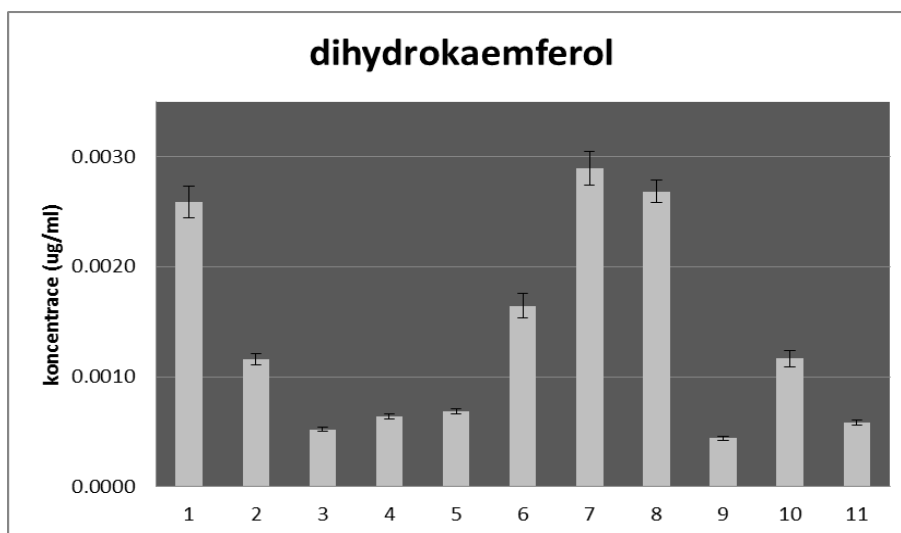
Obrázek č. 18 Výsledky stanovení celkových bílkovin

Graf na obrázku č. 19 ukazuje koncentrace apigeninu. Na první pohled je vidět výrazná koncentrace u vz. č. 1 jedná se o nefiltrované pivo vyrobené ve velkém pivovaru. Nealkoholická piva (9, 10, 11) mají koncentraci tak jako u předchozích látek nižší, ale ne v takovém rozdílu. U ostatních druhů piv byly hodnoty téměř vyrovnané.



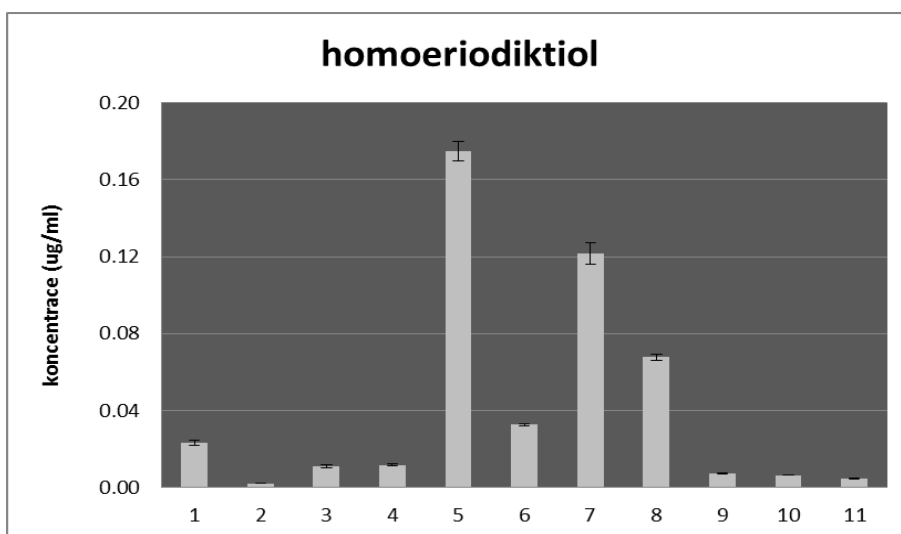
Obrázek č. 19 Výsledky stanovení koncentrace apigeninu

Jednotlivé koncentrace dihydrokaemferolu jsou znázorněny na obrázku č. 20. U vz. č. 1, 7 a 8 lze pozorovat, oproti ostatním druhům piva, zvýšené hodnoty koncentrace dihydrokaemferolu. Všechny tři vzorky piva byla nefiltrovaná a jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,0026-0,0029 ug/ml. Nejnižší koncentraci měly vzorky č. 3, 4, 5, 9 a 11.



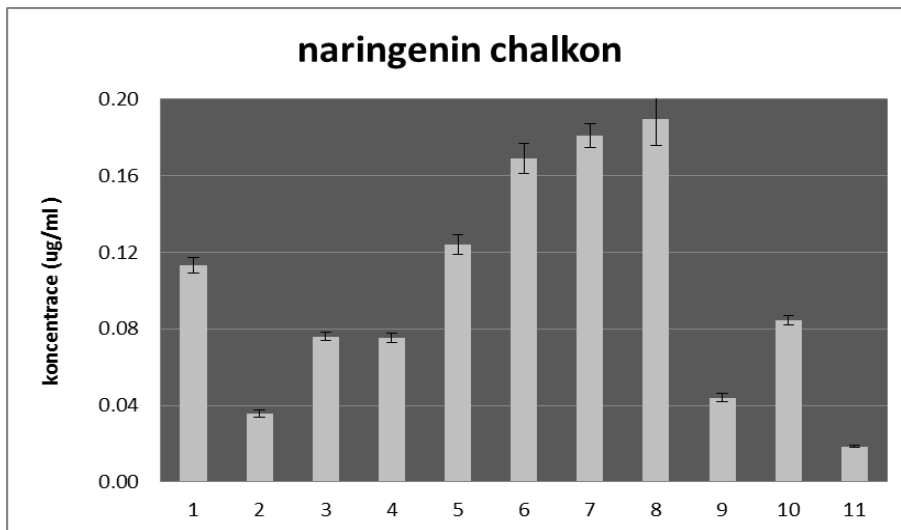
Obrázek č. 20 Výsledky stanovení koncentrace dihydrokaemferolu

V grafu na obrázku č. 21 lze pozorovat vysoké hodnoty koncentrace u vz. č. 5, 7 a 8. Tyto piva pochází z malých pivovarů. Vzorky č. 9, 10 a 11 jsou nealkoholická piva a jejich koncentrace homoeriodiktolu je nižší oproti pivům alkoholickým.



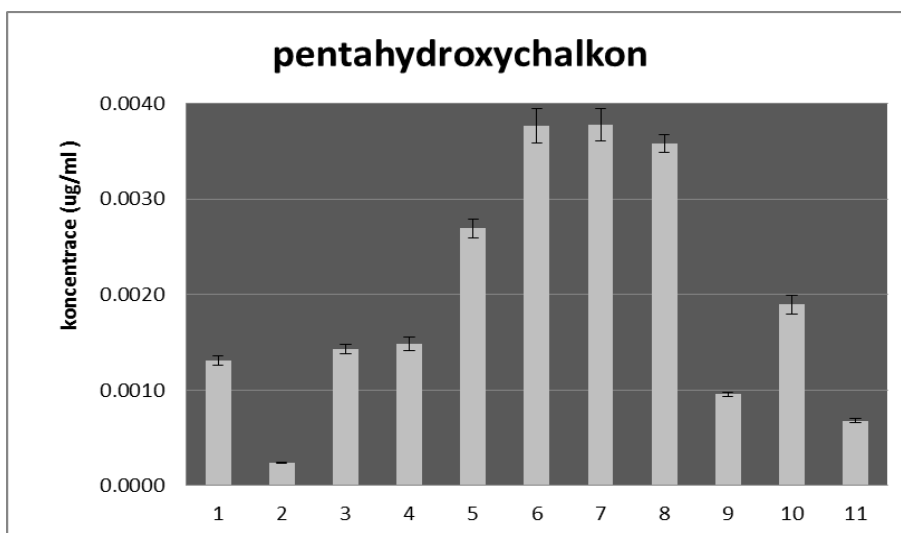
Obrázek č. 21 Výsledky stanovení koncentrace homoeriodiktolu

Jednotlivé koncentrace naringenin chalkonu jsou znázorněny na obrázku č. 22. Vysoké koncentrace byly zaznamenány u vz. č. 1, 5, 6, 7 a 8 všechny tyto vzorky kromě vz. č. 6 jsou piva nefiltrovaná. U piv nealkoholických (9, 10, 11) byla zaznamenána opět nižší koncentrace v porovnání s pivy alkoholickými.



Obrázek č. 22 Výsledky stanovení koncentrace naringenin chalkonu

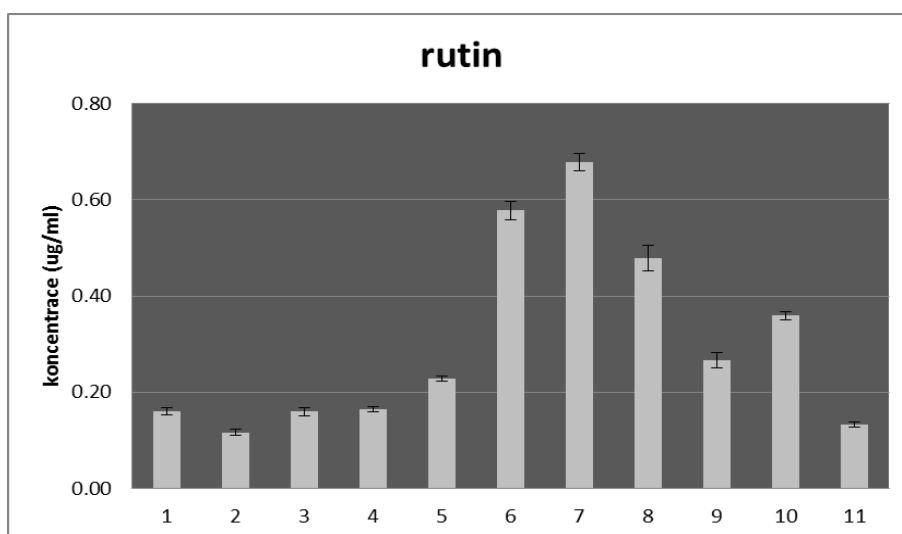
Nejvyšší koncentrace pentahydroxychalkonu byla u piv 6, 7 a 8. Nejnižší koncentrace byla naměřena u vzorku č. 2, což bylo pivo filtrované vyrobené ve velkém pivovaru. Ostatní vzorky se téměř nelišily.



Obrázek č. 23 Výsledky stanovení koncentrace pentahydroxychalkon

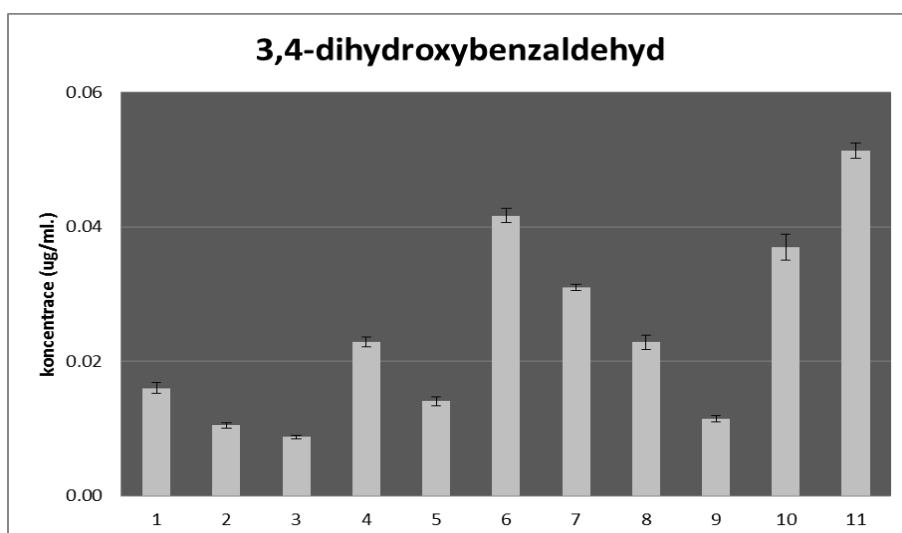
V grafu na obrázku č. 25 lze pozorovat vysoké hodnoty koncentrace rutinu u vz. č. 6, 7 a 8. Ostatní alkoholická piva (vz. č. 1, 2, 3, 4, 5) mají téměř shodné

hodnoty. Oproti ostatním obsaženým látkám je zde vidět že nealkoholická piva mají vyšší hodnoty v porovnání s alkoholickými pivy vyrobenými ve velkých pivovarech.



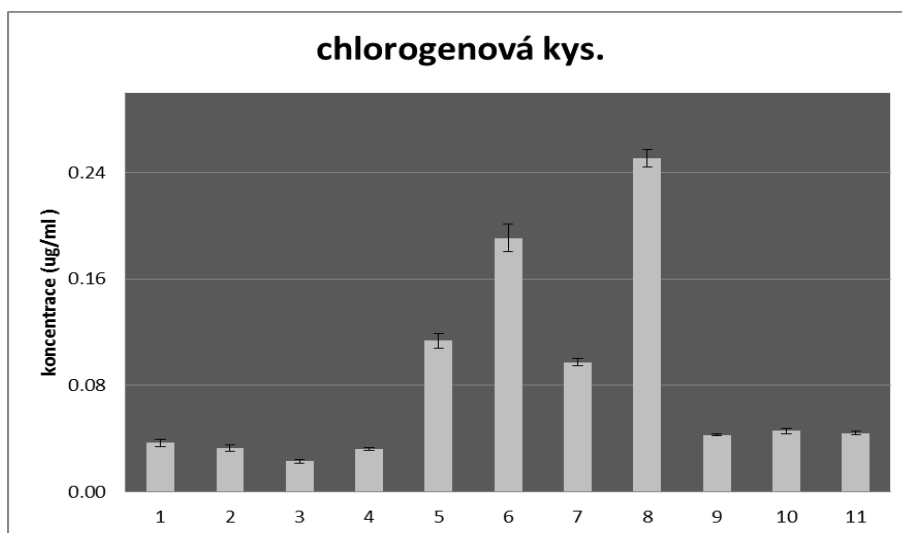
Obrázek č. 25 Výsledky stanovení koncentrace rutinu

Graf na obrázku č. 26 ukazuje koncentrace 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Na první pohled je vidět výrazná koncentrace u vz. č 11 což je nealkoholické pivo. Dále byly vysoké koncentrace naměřeny u vz. č. 6 a 10. Nejnižší koncentrace byla stanovena u vz. č. 1, 2 , dále pak 3 a 4, 5 a 6 zde piva pocházela od stejného výrobce a můžeme tady sledovat rozdíl koncentrací u piva nefiltrovaného a filtrovaného.



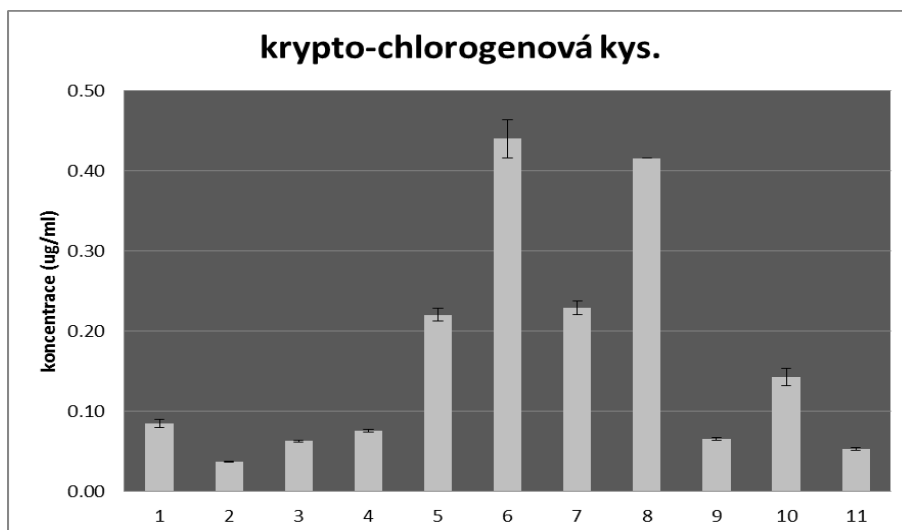
Obrázek č. 26 Výsledky stanovení koncentrace 3,4-dihydroxybenzaldehydu

Na obrázku č. 27 je vyobrazena stanovená koncentrace chlorogenové kyseliny ve vzorcích piva. U vzorků č. 9, 10 a 11 je vidět téměř totožná koncentrace chlorogenové kyseliny u nealkoholických piv. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u vz. č. 8 což bylo nefiltrované pivo z malého pivovaru. Nejnižší koncentrace byly u piv vyráběných ve velkých pivovarech a to u vz. č. 1, 2, 3, 4.



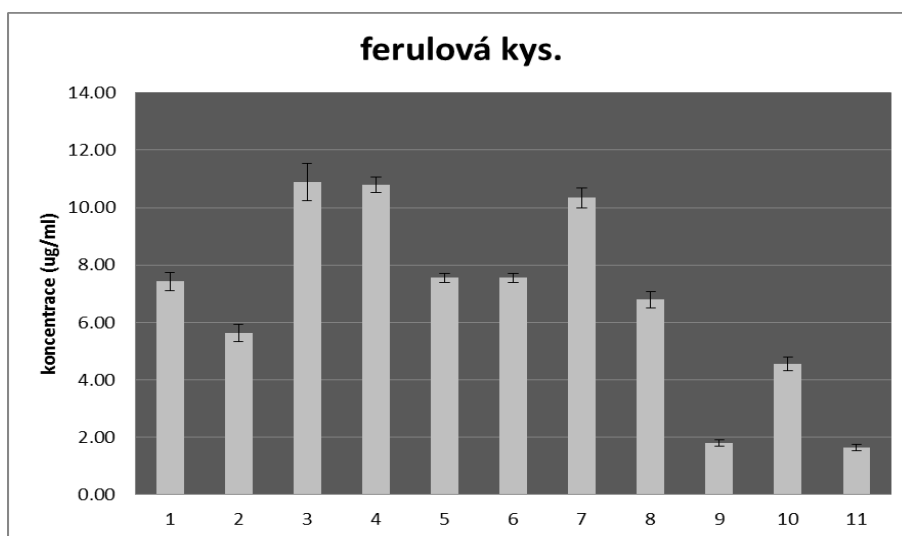
Obrázek č. 27 Výsledky stanovení koncentrace chlorogenové kyseliny

Z grafu vyplívá, že nejméně kyseliny krypto-chlorogenové obsahují vz. č 1, 2, 3 a 4 tyto piva pochází z velkých pivovarů. Nejvyšší hodnoty byly opět naměřeny u vzorků piva pocházejících z menších pivovarů. U vzorků nealkoholického piva (9, 10, 11) byly naměřené koncentrace také velmi nízké.



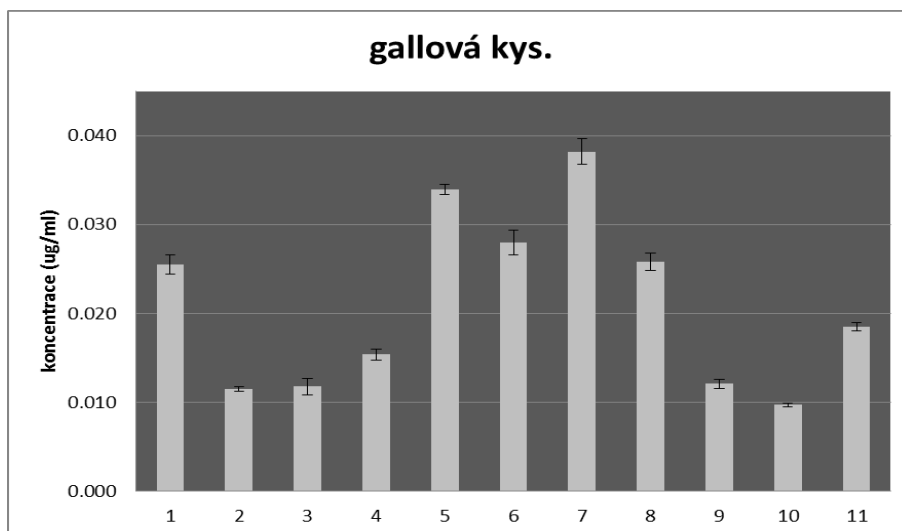
Obrázek č. 28 Výsledky stanovení koncentrace krypto-chlorogenové kyseliny

Celková koncentrace kyseliny ferulové je znázorněna v grafu na obrázku č. 29. Nejnižší hodnoty byly detekovány u nealkoholických piv (9, 10, 11). Vzorky 3 a 4 pocházející od stejného výrobce, mají téměř stejně vysokou koncentraci, což lze tvrdit i u vzorků č. 5 a 6 kde se koncentrace také téměř nelišila.



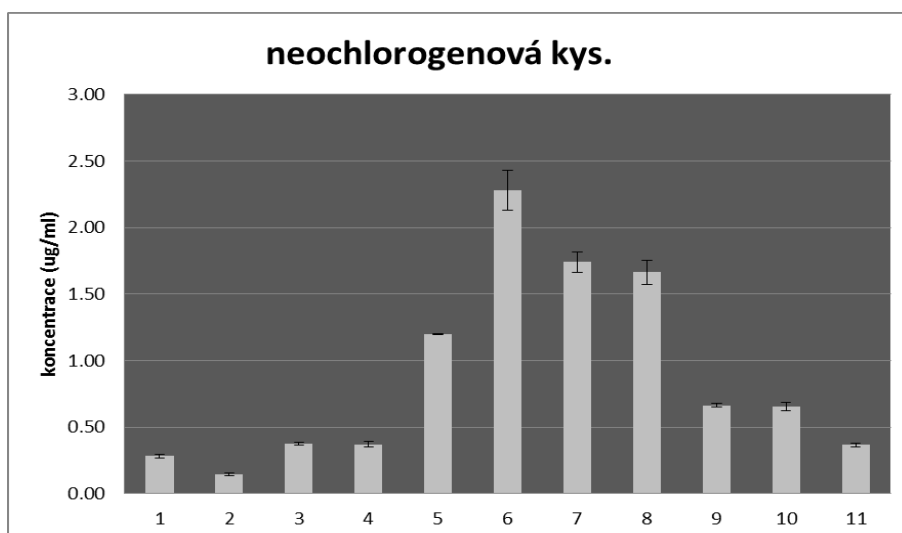
Obrázek č. 29 Výsledky stanovení koncentrace ferulové kyseliny

Graf na obrázku č. 30 ukazuje koncentrace gallové kyseliny. Na první pohled je vidět výrazná koncentrace u vzorků pocházejících z menších pivovarů (5, 6, 7, 8). U vzorku č. 1 je viditelná vyšší koncentrace oproti ostatním pivům vyrobených ve velkých pivovarech.



Obrázek č. 30 Výsledky stanovení koncentrace gallové kyseliny

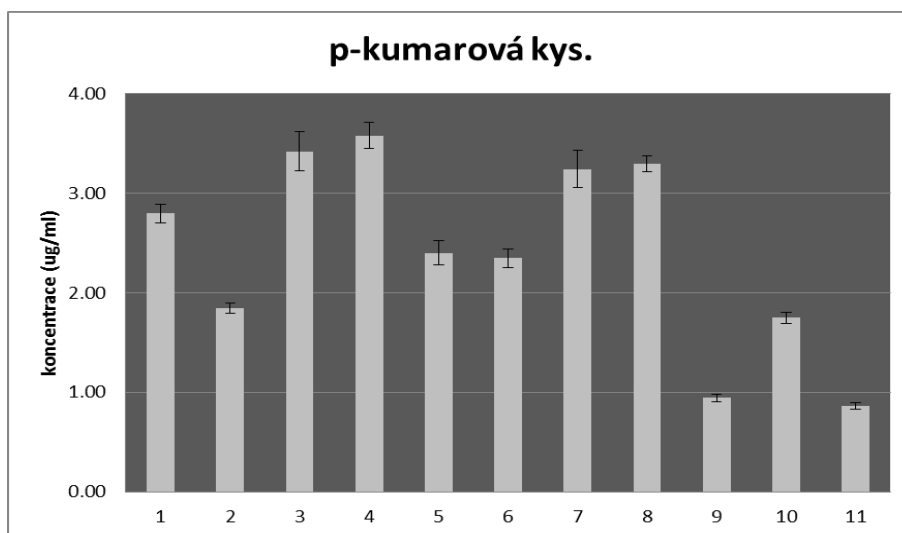
Jednotlivé koncentrace neochlorogenové kyseliny jsou znázorněny na obrázku č. 31. Vysoké koncentrace byly zaznamenány u vz. č 5, 7, 8, s nejvyšší hodnou u vzorku č. 6. Velmi nízké koncentrace byly vzorků 1, 2, 3, a 4 což byla piva pocházející z velkých pivovarů. Nealkoholická piva měla oproti nim o něco vyšší koncentraci.



Obrázek č. 31 Výsledky stanovení koncentrace neochlorogenové kyseliny

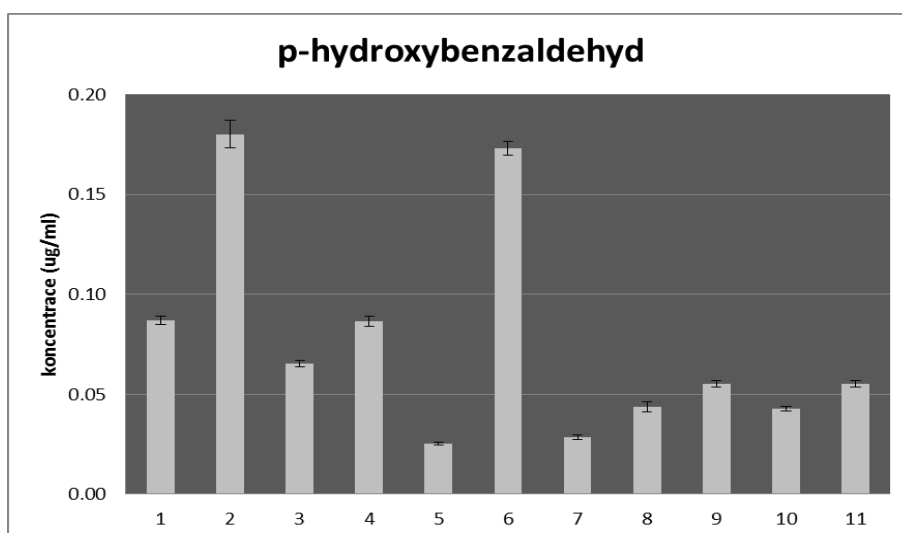
Podobný trend jako u kyseliny ferulové (graf na obrázku č. 29) můžeme pozorovat i u kyseliny p-kumarové obrázek č. 32, kde nejnižší hodnoty byly detekovány

u nealkoholických piv (9, 10, 11). Vzorčky 3 a 4 pocházejí od stejného výrobce, mají téměř stejnou vysokou koncentraci což lze tvrdit i u vzorků č. 5 a 6.



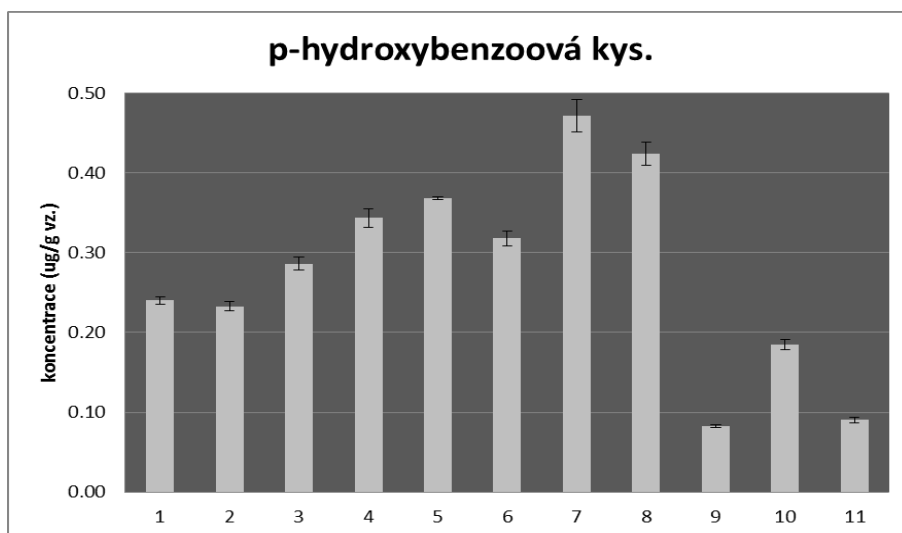
Obrázek č. 32 Výsledky stanovení koncentrace p-kumarové kyseliny

Na obrázku č. 33 je vyobrazena stanovená koncentrace p-hydroxybenzaldehydu ve vzorcích piva. U vzorků č 2 a 6 což jsou piva filtrovaná je nejvyšší koncentrace p-hydroxybenzaldehydu. Nižší koncentrace byly naměřeny ve vzorcích nealkoholického piva (9, 10, 11)



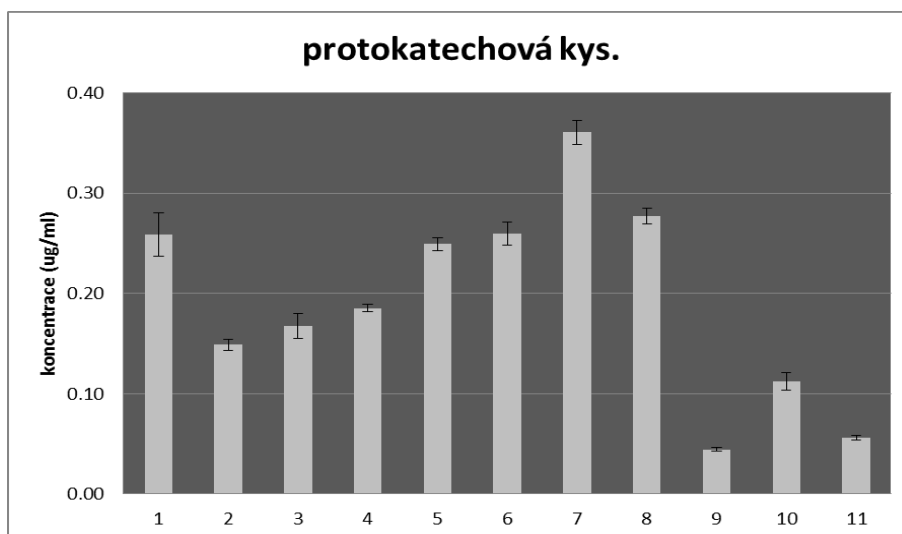
Obrázek č. 33 Výsledky stanovení koncentrace p-hydroxybenzaldehydu

Graf na obrázku č. 34 ukazuje koncentrace p-hydroxybenzoové kyseliny. Na první pohled je vidět nízká koncentrace u vz. č 9, 10 a 11 u nealkoholických piv. Nejvyšší koncentrace měla opět piva od malých pivovarů (5, 6, 7, 8) U piv z velkých pivovarů (1, 2, 3, 4) lze vidět nižší koncentraci.



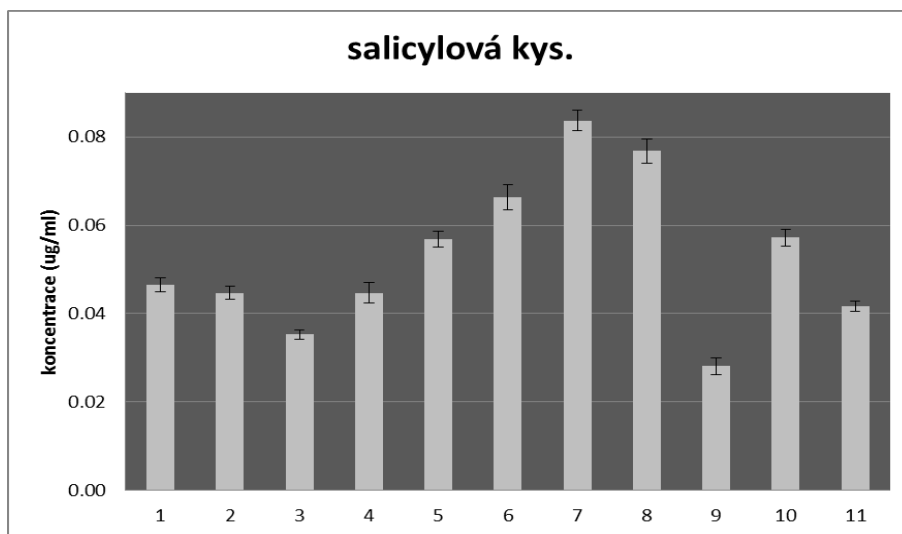
Obrázek č. 34 Výsledky stanovení koncentrace p-hydroxybenzoové kyseliny

Koncentrace kyseliny protokatechové jsou vyobrazeny na obrázku č. 35. Nejnižší koncentrace této kyseliny byla stanovena u vzorků nealkoholického piva (9, 10,11). Poměrně vyšší je koncentrace je u vzorků z piv vyrobených v menších pivovarech, až na vz. č. 1, který pochází z velkého pivovaru.



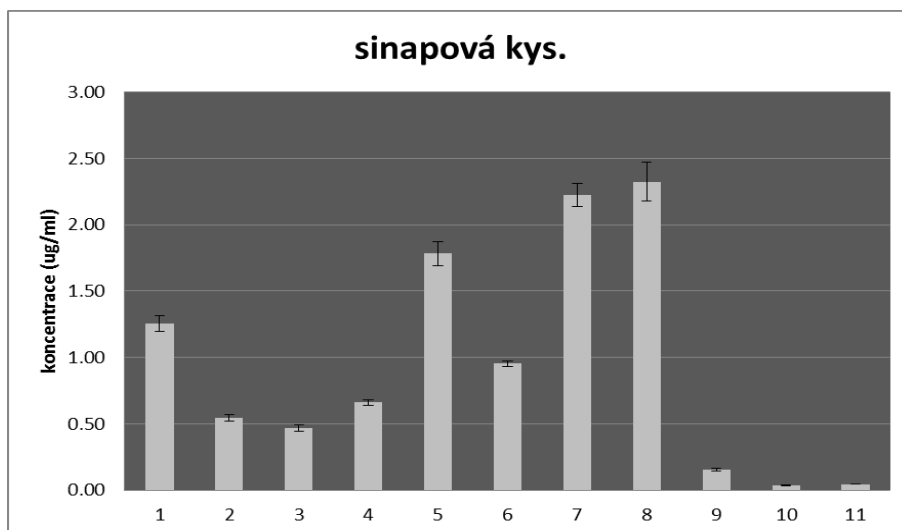
Obrázek č. 35 Výsledky stanovení koncentrace protokatechové kyseliny

Jednotlivé koncentrace salicylové kyseliny jsou znázorněny grafem na obrázku č.36. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u pív nefiltrovaných vyrobených v menších pivovarech (7, 8). Poměrně nízkou hodnotu koncentrace můžeme zaznamenat i u nealkoholických pív (9, 10, 11). U pív vyrobených velkovýrobou (1, 2, 3, 4) pozorujeme podobnou koncentraci.



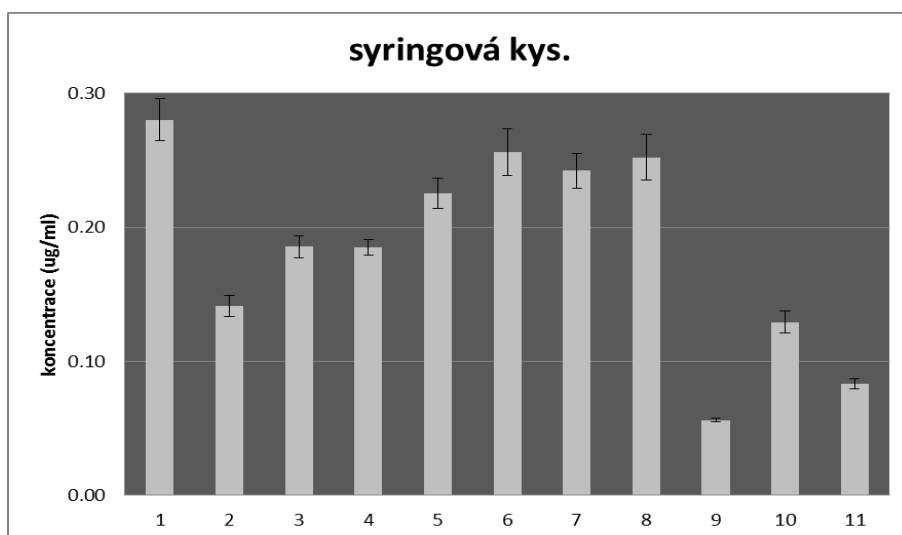
Obrázek č. 36 Výsledky stanovení koncentrace salicylové kyseliny

Na obrázku č. 37 je vyobrazena stanovená koncentrace sinapové kyseliny ve vzorcích piva. U vzorků č. 9, 10 a 11 je vidět, že nealkoholická piva obsahují mizivé množství této kyseliny. U vzorků piva nefiltrovaných a současně vyrobených v malých pivovarech (5, 7, 8) pozorujeme nejvyšší hodnoty koncentrace.



Obrázek č. 37 Výsledky stanovení koncentrace sinapové kyseliny

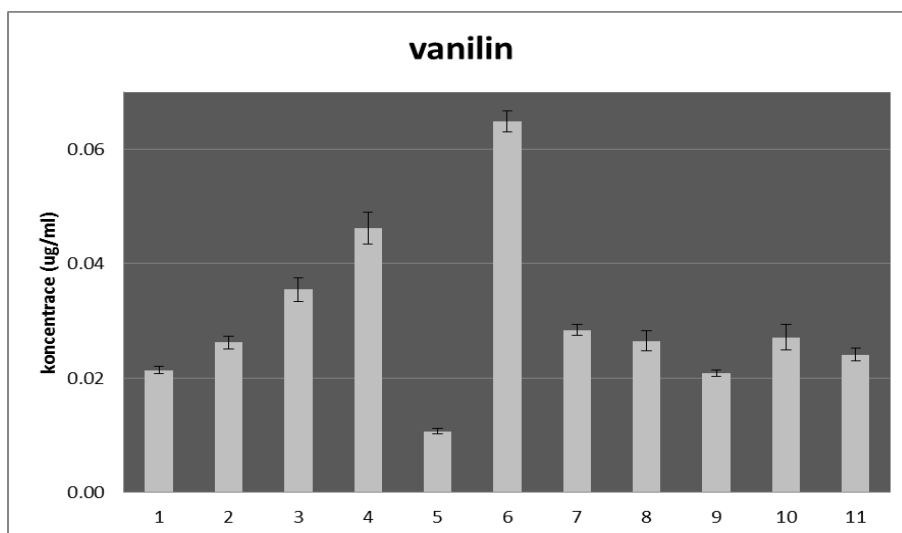
Jednotlivé koncentrace syringové kyseliny jsou znázorněny grafem na obrázku č.38. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u piva č. 1, kdy byla naměřena hodnota 0,28 $\mu\text{g/ml}$ o něco nižší hodnoty byly naměřeny u vzorků č. 6, 7 a 8 zde se jednalo o piva vyrobené v menších pivovarech. Nejnížší hodnoty koncentrace byly detekovány u piv nealkoholických (9, 10, 11).



Obrázek č. 38 Výsledky stanovení koncentrace syringové kyseliny

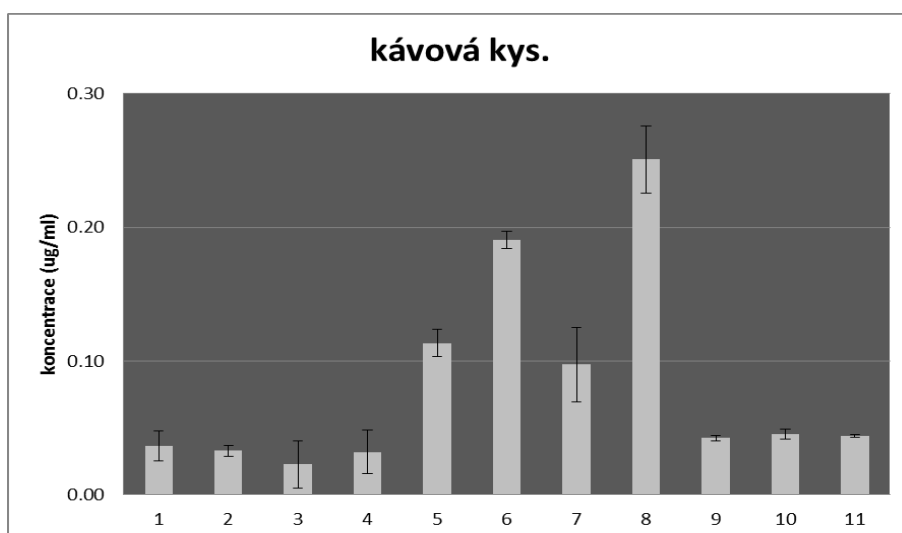
V grafu na obrázku č. 39 jsou stanoveny koncentrace vanilinu. Již na první pohled lze vidět, že nejvyšší hodnotu má vzorek č. 6. Jedná se vzorek filtrovaného piva

a jeho koncentrace je 0.0649 $\mu\text{g/ml}$. Vzorek č 5 je nefiltrované pivo, které pochází od stejného výrobce ale jeho koncentrace je několikanásobně nižší.



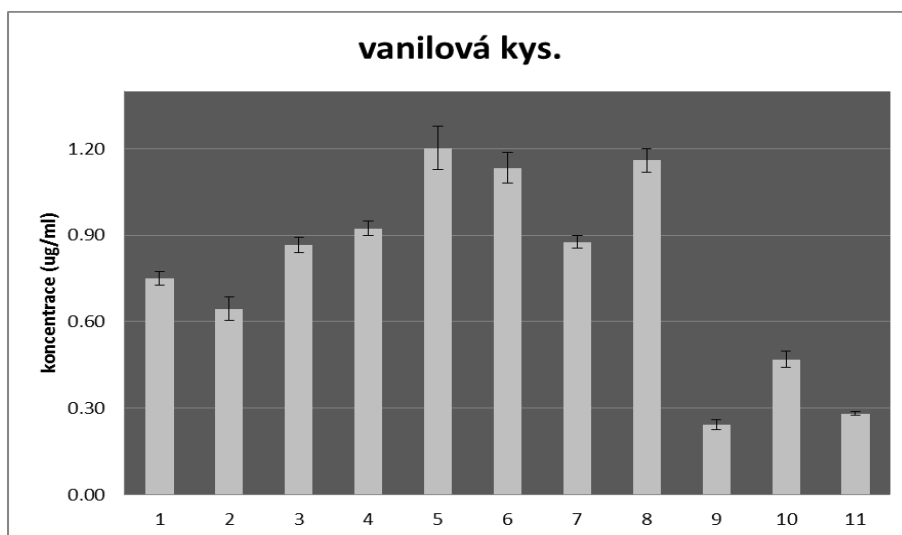
Obrázek č. 39 Výsledky stanovení koncentrace vanilinu

Koncentrace kyseliny kávové je na obrázku č. 40. Na první pohled je vidět vysoká koncentrace u vzorků č. 5, 6, 7 a 8 kdy se jedná o koncentraci k. kávové u piv vyrobených v malých pivovarech. U ostatních druhů piva je koncentrace téměř vyrovnaná.



Obrázek č. 40 Výsledky stanovení koncentrace kávové kyseliny

Koncentrace kyseliny vanilové je znázorněna v grafu na obrázku č. 41. Nejnižší hodnoty byly detekovány u piv nealkoholických (9, 10, 11). U piv, která jsou vyráběna v menších pivovarech (5, 6, 7, 8) byla koncentrace vyšší v porovnání s pivy vyráběnými ve větších pivovarech (1, 2, 3, 4)

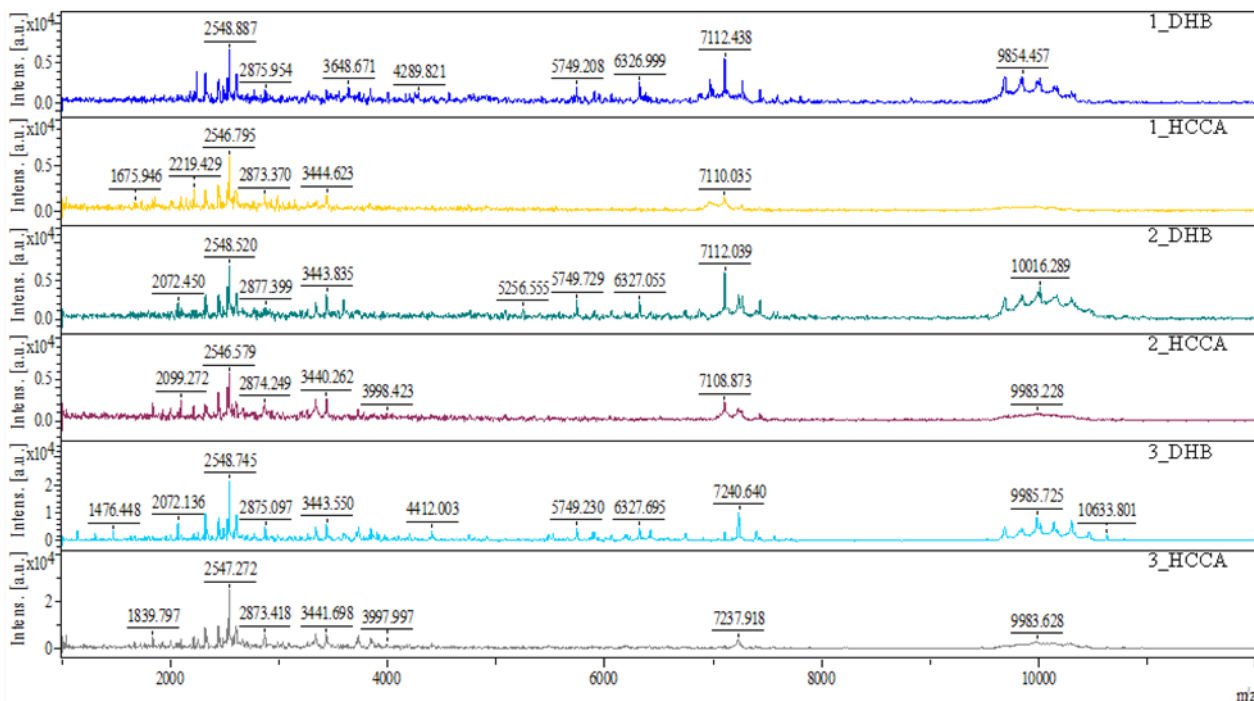


Obrázek č. 41 Výsledek stanovení koncentrace vanilové kyseliny

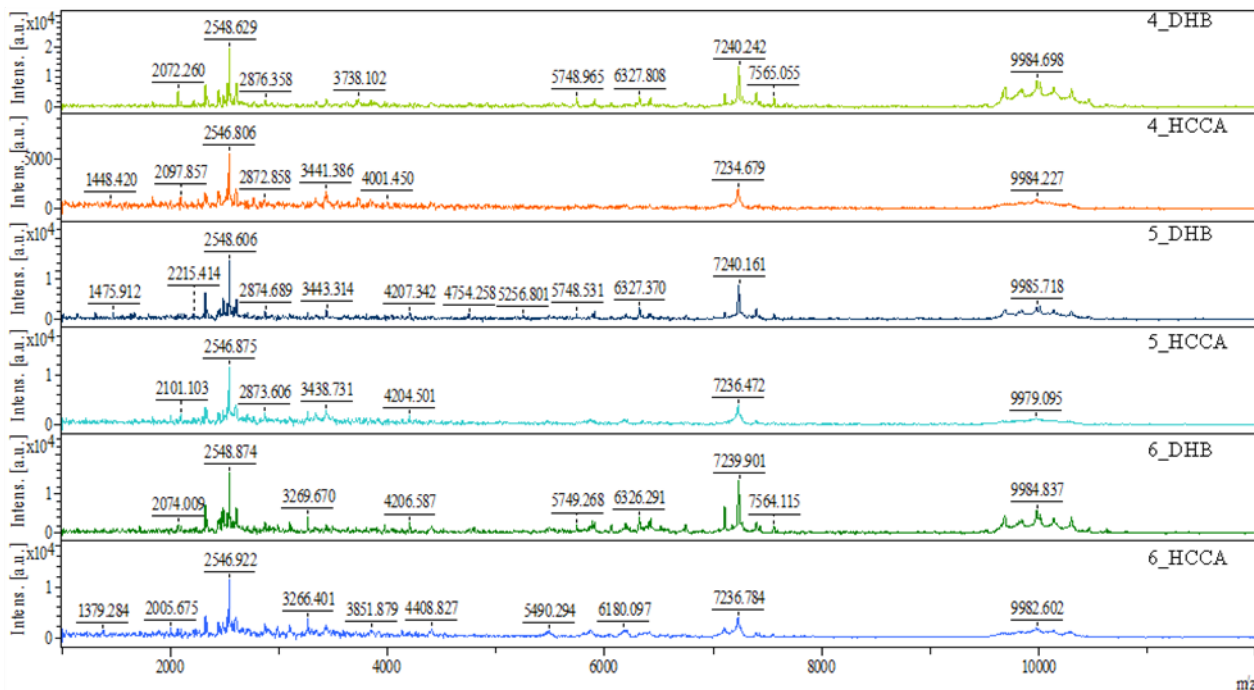
Obsah fenolů a flavonoidů se v literaturách liší [22] [56], protože každý druh piva má svou specifickou výrobu a pivo je zde vyráběno dle určitých receptur a postupů výroby. Velmi také závisí na použitých surovinách, odkud pocházely a jak s nimi během výroby bylo zacházeno.

4. Identifikace proteinů pomocí MALDI TOF

Z hmotnostních spekter vzorků piv po úpravě formou odsolení pomocí ZipTip C18 špiček vyplynulo, že všechny analyzované vzorky obsahují proteiny/polypeptidy s molekulovou hmotností kolem 9660 Da (pravděpodobně odpovídá proteinu LTP1), 7240 Da a 2548 Da. U vzorků piv 9 a 11 byly dále pozorovány relativně intenzivní píky kolem 5890 Da. Lze konstatovat, že dané vzorky se příliš neliší v kvalitativním složení proteinů/polypeptidů do 12 kDa. Nad 12 kDa nebyly detekovány žádné píky, což může být způsobeno nízkou koncentrací vysokomolekulárních proteinů, jejich nedostatečným odsolením, případně jejich ulpěním na vnitřní stěně špičky nebo v sorbentu. Bližší identifikace proteinů byla provedena z SDS-PAGE gelu.

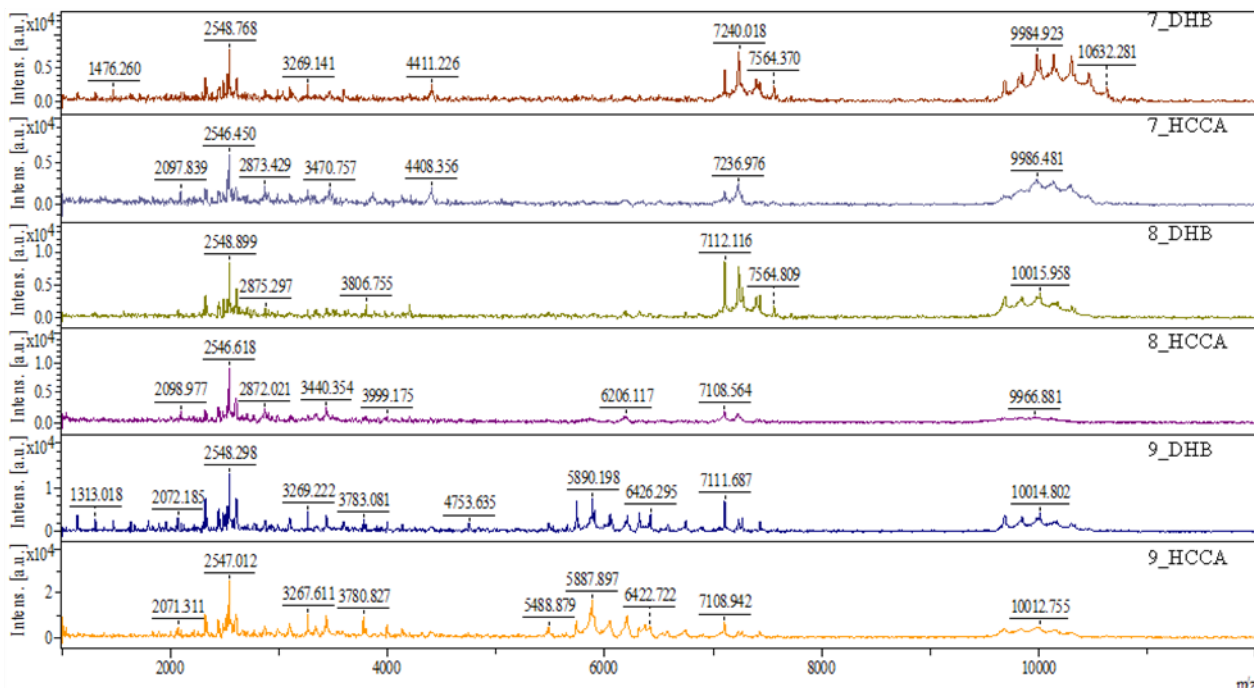


Obrázek č. 42 MALDI-TOF hmotnostní spektra pивních vzorků 1, 2 a 3 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové a 2,5-dihydroxybenzoové

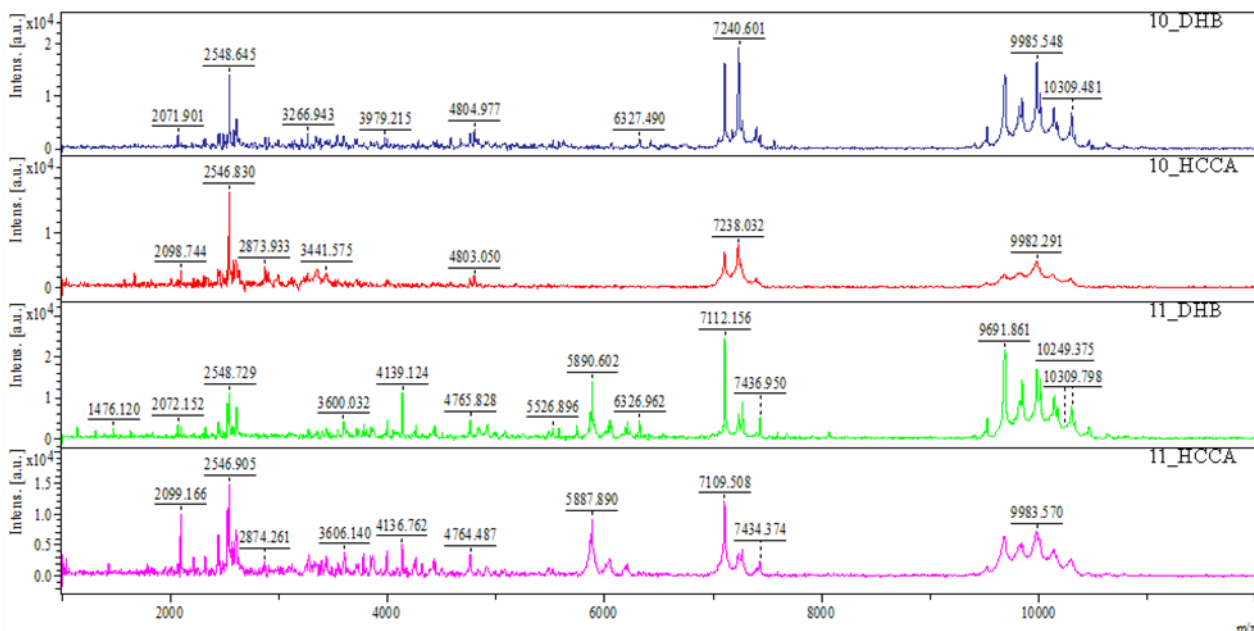


Obrázek č. 43 MALDI-TOF hmotnostní spektra pивních vzorků 4, 5 a 6 po odsolení.

Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové a 2,5-dihydroxybenzoové

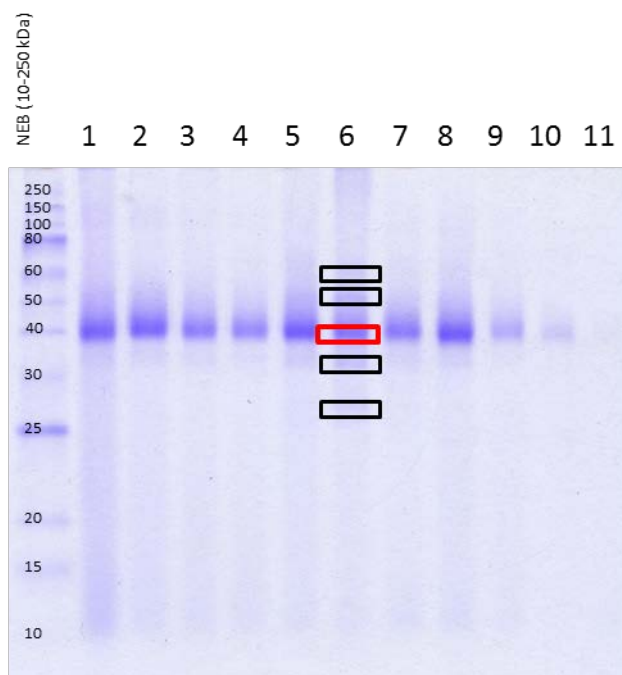


Obrázek č. 44 MALDI-TOF hmotnostní spektra pivních vzorků 7, 8 a 9 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové a 2,5-dihydroxybenzoové

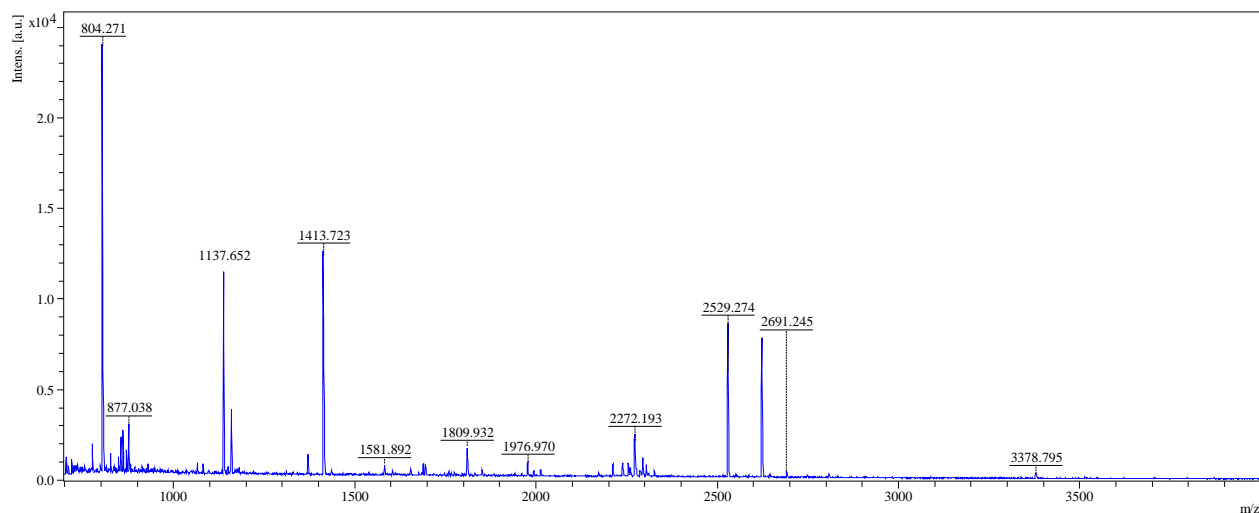


Obrázek č. 45 MALDI-TOF hmotnostní spektra pivních vzorků 10 a 11 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové a 2,5-dihydroxybenzoové

Pro identifikaci proteinů bylo vybráno 5 pozic proteinů na gelu u vzorku č. 6. Ty jsou zvýrazněny černými, resp. červeným, obdélníky viz obr. č. 46. Tyto úseky byly pečlivě vyřezány pomocí skalpelu a jednotlivé výřezky byly přeneseny do mikrovialek. Následně byla provedena trypsinace v gelu a peptidové mapování (PMF) pomocí protokolu Shevchenka a kol. [49]. Obr. č. 47 „Hmotnostní spektrum“ zobrazuje jednotlivé píky peptidů extrahovaných z naštěpeného proteinu v části gelu označeném červeným obdélníkem, hmotnosti těchto píků byly použity pro PMF pomocí MASCOT Serveru. Pouze z těch částí gelu, které byly označeny červeně se podařilo identifikovat protein se signifikantním score (75). Jedná se o protein Serpin Z4 vyskytující se v *Hordeum vulgare*.



Obrázek č. 46 SDS-Page gel pro identifikaci stanovení proteinů na MALDI-TOF



Obrázek č. 47 MALDI-TOF hmotnostní spektra jednotlivých peptidů extrahovaných z naštěpeného proteinu vyříznutého z gelu, označený červeným obdélníkem

V diplomové práci [57] byla provedena identifikace jednotlivých proteinů provedena pomocí MALDI TOF z 2D gelové elektroforézy. V literatuře byly ověřeny naše výsledky.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla směřována jako screeningová studie zaměřená na charakterizaci fenolů a flavonoidů, bílkovin a antioxidační aktivity u piva filtrovaného, nefiltrovaného a nealkoholického.

Teoretická část sumarizuje základní informace o pivu, především o použitých surovinách, výrobě, a o biologicky aktivních látkách, které mají vliv jak na konečný výrobek, tak ve vztahu ke konzumentovi.

Experimentální část je zaměřena na stanovení hlavních látek piva. Obsah celkových fenolických látek, celkových flavonoidů, antioxidační aktivity a celkových bílkovin byl stanoven pomocí automatické spektrofotometrické analýzy, kde vyšší antioxidační aktivitu měla piva alkoholická. Zastoupení a obsah fenolů a flavonoidů byl analyzován kombinovanou metodou kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 Series, který byl připojen k trojitému kvadrupólovému hmotnostnímu detektoru s ionizací ESI. Z výsledků je patrný velký rozdíl mezi pivy alkoholickými a nealkoholickými, kde nealkoholická piva obsahovala mnohem méně fenolů a flavonoidů v porovnání s pivy alkoholickými. Při porovnání piva vyrobeného ve velkých a piva vyrobeného v malých pivovarech, byly na tom co se týče vyšší koncentrace lépe piva vyrobená v menších pivovarech. Obsah proteinů byl analyzován pomocí 1D elektroforézy, a intenzita proteinů na gelu byla ověřena pomocí automatické spektrofotometrické analýzy. Dále byla provedena identifikace jednotlivých proteinů pomocí MALDI TOF. Z této analýzy vyplynulo, že všechny analyzované vzorky obsahují proteiny/polypeptidy s molekulovou hmotností kolem 9660 Da, dále byl identifikován z 1D gelu protein Serpin Z4 vyskytující se v *Hordeum vulgare*.

Ze všech provedených experimentů zaměřených na srovnávání nefiltrovaných, filtrovaných a nealkolických piv, je zřejmé, že se nejvíce od sebe odlišují ve složení biologicky aktivních látek piva alkoholická a nealkoholická.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KUNOVÁ, V. *Zdravá výživa. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 136s.* ISBN 80-247-0736-5,
- [2] VELISEK, J. *Chemie potravin. OSSIS, Tabor, Czech Republic, 2002, s. 216-220.*
- [3] VERHOEF. *Velká encyklopedie piva. 2003. s.* ISBN 80-7234-283-5.
- [4] KOSAŘ, K. a PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva. VÚPS, Praha, 2000.*
- [5] DOSTAL *Velká kniha o pivu, aneb, Blahodárné přírodní účinky piva. I.D.M, 1997.*
- [6] *Pivo a zdraví - "Lidstvo zatím lepší nápoj nevymyslelo"! 2010. s.* ISBN 9788072112531.
- [7] KADLEC, P. a ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE, V. *Technologie potravin II. Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. s.* ISBN 8070805102.
- [8] ROP, O. et al. *Nealkoholické a alkoholické nápoje. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. s.* ISBN 8073187485.
- [9] PELIKÁN, M. a SÁKOVÁ, L. *Jakost a zpracování rostlinných produktů. Jihočeská univerzita, 2001. s.* ISBN 8070405023.
- [10] PRUGAR, J. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008. s.* ISBN 8086576280.
- [11] HAJEK, L. H. W. I. C. [online]. [cit. Dostupné z: <http://www.zateckychmel.eu/index_cz.html>.
- [12] RYCHTERA, M. a PÁCA, J. *Bioinženýrství kvasných procesů. 1985. s.*
- [13] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví. 1. vyd. Praha. Grada Publishing as,*
- [14] JACKSON, M. a ŠENKYŘÍK, L. *Encyklopedie piva. Volvox Globator, 1995. s.* ISBN 8085769379.
- [15] BASAŘOVÉ, G. XANTHOTHUMOL-CHMELOVE PRYSKYŘICE NEBO POLYFENOL? *Chem. Listy, 2004, sv. 98, s. 825-830.*
- [16] DANIELA, R. S. TECHNOLOGICKÉ A MIKROBIOLOGICKÉ ASPEKTY VÝROBY PIVA SO ZNÍZENÝM OBSAHEM ALKOHOLU. *Chem. Listy, 2007, sv. 101, s. 542-549.*
- [17] LACHMAN, J. et al. Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. *Food Chemistry, 2007, sv. 103, č. 3, s. 802-807. ISSN 0308-8146.*
- [18] STEVENS, J. F. a PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry, 2004, sv. 65, č. 10, s. 1317-1330. ISSN 0031-9422.*
- [19] KALÁČ, P. *Funkční potraviny: kroky ke zdraví. Dona, 2003. s.* ISBN 8073220296.
- [20] CEPICKA, J. a KARABIN, M. Polyfenolové latky piva: přirozené antioxidanty. *Chemické listy, 2002, sv. 96, č. 2, s. 90-95. ISSN 0009-2770.*

- [21] MIRANDA, C. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 1999, sv. 37, č. 4, s. 271-285. ISSN 0278-6915.
- [22] BENEŠOVÁ, P. *Charakterizace aktivních látek v různých druzích piva*. Brno,
- [23] CIZKOVA, H. et al. Vyznam bilkovin z hlediska penivosti a stability peny piva. *Chemické listy*, 2006, sv. 100, č. 7, s. 478-485. ISSN 0009-2770.
- [24] LUBOMÍR, O. E. A. Přírodní látky hořké chuti. *Chemické listy*, 2007.
- [25] KARABÍN, M. et al. Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarství. *Chem. Listy*, 2009, sv. 103, s. 721-728.
- [26] KAPPLER, S. et al. Degradation of Iso- α -Acids During Wort Boiling. *Journal of the Institute of Brewing*, 2010, sv. 116, č. 4, s. 332-338. ISSN 2050-0416.
- [27] DE RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2006, sv. 1112, č. 1, s. 31-63. ISSN 0021-9673.
- [28] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. *Analytical techniques in the sciences*. ISBN, 2003, s. 80-863.
- [29] ABAD-GARCÍA, B. et al. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 2007, sv. 1154, č. 1, s. 87-96. ISSN 0021-9673.
- [30] SKOOG, D. A. a WEST, D. M. *Principles of instrumental analysis*. Saunders College Philadelphia, 1980. s.
- [31] MCMASTER, M. *HPLC: a practical user's guide*. John Wiley & Sons, 2007. s. ISBN 0470079088.
- [32] THOMSON, J. J. Bakerian lecture: Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 1913, sv. 89, č. 607, s. 1-20. ISSN 0950-1207.
- [33] TATSIS, E. C. et al. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, 2007, sv. 68, č. 3, s. 383-393. ISSN 0031-9422.
- [34] TRČKOVÁ, M. a KOČÍ, R. Využití metody LC/MS k analýze vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek. *Diplomová práce*. Brno: FCH VUT, 2008.
- [35] [online]. [cit. Dostupné z: <<http://biskupickypivovar.cz/>>].
- [36] DEMARCO, M. L. a FORD, B. A. Beyond identification: emerging and future uses for MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Clinics in laboratory medicine*, 2013, sv. 33, č. 3, s. 611-628. ISSN 0272-2712.
- [37] GURAN, R. et al. The MALDI Imaging for Study of the Physiological Processes in Tumors. *Chemické listy*, 2016, sv. 110, č. 2, s. 106-111. ISSN 0009-2770.
- [38] KAŠ, J. et al. *Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. ISBN 80-7080-586-2*,
- [39] KRIZKOVA, S. et al. SDS-PAGE as a Tool for Hydrodynamic Diameter-Dependent Separation of Quantum Dots. *Chromatographia*, 2015, sv. 78, č. 11-12, s. 785-793. ISSN 0009-5893.
- [40] [online]. [cit. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2651.pdf>].

- [41] ZÍTKA, O. et al. Použití automatizované elektroforézy na čipu pro studium laktoferinu a matrixových metaloproteinas. *Chem. Listy*, 2010, sv. 104, s. 197-201.
- [42] Publics Modem. [online]. 15.3.2016 [cit. Dostupné z: <<http://www.staropramen.cz/>>.
- [43] ENCHANTERS. [online]. [cit. Dostupné z: <<https://www.pivovarrychnov.cz/nase-piva#knezna-12>>.
- [44] [online]. [cit. Dostupné z: <<http://www.pivovarbroumov.cz/sortiment.html>>.
- [45] DIGITAL, S. [online]. [cit. Dostupné z: <<http://vpohybu.cz/caste-dotazy>>.
- [46] DON'T PANIC, S. R. O., WWW.DONTPANIC.CZ (ZDENĚK VÍTEK - ZDENEK.VITEK@DONTPANIC.CZ). [online]. [cit. Dostupné z: <<http://www.pivovarcernahora.cz/>>.
- [47] FG FORREST - CREATIVE TECHNOLOGIES, W. F. C., FG@FG.CZ, 1996-2016. [online]. [cit. Dostupné z: <<http://www.bernard.cz/cs/pivo/sortiment/lahvove-pivo/index.shtml>>.
- [48] FIDLER, M. a KOLĚŘOVĚ, L. ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ V CHMELU A PIVU. *Chem. Listy*, 2009, sv. 103, s. 232-235.
- [49] STRICKLAND, R. et al. Copper binding by proteins in alkaline solution. *Analytical Chemistry*, 1961, sv. 33, č. 4, s. 545-552. ISSN 0003-2700.
- [50] PAREJO, I. et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co (II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH·(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2000, sv. 44, č. 3, s. 507-512. ISSN 1056-8719.
- [51] KLECKEROVA, A. et al. STUDY OF CADMIUM AND ZINC INTERACTION IN MAIZE.
- [52] ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1959, sv. 82, č. 1, s. 70-77. ISSN 0003-9861.
- [53] SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 2006, sv. 1, č. 6, s. 2856-2860. ISSN 1754-2189.
- [54] MARTINKOVÁ, Z. Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu 2009.
- [55] PAŘILOVÁ, K. Studium vybraných aktivních látek v českém pivu 2009.
- [56] JELÍNEK, L. a KARABÍN, M. XANTHOTHUMOL: MOŽNOSTI IZOLACE A OBOHACOVÁNÍ PIVA. *Chem. Listy*, 2013, sv. 107, s. 209-213.
- [57] MÜLLER, L. Analýza proteomu piva pomocí hmotnostní spektrometrie. *Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická*, 2009.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Flavan

Obrázek č. 2 Chalkon

Obrázek č. 3 Flavonol

Obrázek č. 4 Kvercetin

Obrázek č. 5 Kyselina p-hydroxybenzoová a kyselina skořicová

Obrázek č. 6 Flavanon

Obrázek č. 7 Xantohumol

Obrázek č. 8 Humulon

Obrázek č. 9 Lupulon

Obrázek č. 10 Mechanismus isomerace humulonu

Obrázek č. 11 Princip MALDI-TOF

Obrázek č. 12 Barvení Coomassie blue

Obrázek č. 13 Barvení stříbrem

Obrázek č. 14 Barvení SYPRO Ruby

Obrázek č. 14 výsledky stanovení antioxidační kapacity (DPPH)

Obrázek č. 15 Výsledky stanovení celkových fenolů

Obrázek č. 16 Výsledky stanovení celkových thiolů

Obrázek č. 17 Výsledky stanovení celkových bílkovin

Obrázek č. 18 Výsledky stanovení celkových bílkovin

Obrázek č. 19 Výsledky stanovení koncentrace apigeninu

Obrázek č. 20 Výsledky stanovení koncentrace dihydrokaemferolu

Obrázek č. 21 Výsledky stanovení koncentrace homoeriodiktolu

Obrázek č. 22 Výsledky stanovení koncentrace naringenin chalkon

Obrázek č. 23 Výsledky stanovení koncentrace pentahydroxychalkon

Obrázek č. 25 Výsledky stanovení koncentrace rutinu

Obrázek č. 26 Výsledky stanovení koncentrace 3,4-dihydroxybenzaldehydu

Obrázek č. 27 Výsledky stanovení koncentrace chlorogenové kyseliny

Obrázek č. 28 Výsledky stanovení koncentrace krypto-chlorogenové kyseliny

Obrázek č. 29 Výsledky stanovení koncentrace ferulové kyseliny

Obrázek č. 30 Výsledky stanovení koncentrace gallové kyseliny

Obrázek č. 31 Výsledky stanovení koncentrace neochlorogenové kyseliny

Obrázek č. 32 Výsledky stanovení koncentrace p-kumarové kyseliny

Obrázek č. 33 Výsledky stanovení koncentrace p-hydroxybenzaldehydu

Obrázek č. 34 Výsledky stanovení koncentrace p-hydroxybenzoové kyseliny

Obrázek č. 35 Výsledky stanovení koncentrace protokatechové kyseliny

Obrázek č. 36 Výsledky stanovení koncentrace salicylové kyseliny

Obrázek č. 37 Výsledky stanovení koncentrace sinapové kyseliny

Obrázek č. 38 Výsledky stanovení koncentrace syringové kyseliny

Obrázek č. 39 Výsledky stanovení koncentrace vanilinu

Obrázek č. 40 Výsledky stanovení koncentrace kávové kyseliny

Obrázek č. 41 Výsledky stanovení koncentrace vanilové kyseliny

Obrázek č. 42 MALDI-TOF hmotnostní spektra pивních vzorků 1, 2 a 3 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoové (DHB)

Obrázek č. 43 MALDI-TOF hmotnostní spektra pивních vzorků 4, 5 a 6 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoové (DHB)

Obrázek č. 44 MALDI-TOF hmotnostní spektra pивních vzorků 7, 8 a 9 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoové (DHB)

Obrázek č. 45 MALDI-TOF hmotnostní spektra pивních vzorků 10 a 11 po odsolení. Jako matrice byly využity roztoky kyselin α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoové

Obrázek č. 46 SDS-Page gel pro identifikaci stanovení proteinů na MALDI-TOF

Obrázek č. 47 MALDI-TOF hmotnostní spektra jednotlivých peptidů extrahovaných z naštěpeného proteinu vyříznutého z gelu, označený červeným obdélníkem

9. SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1 Obsahy jednotlivých polyfenolických látek v pivu plzeňského typu

Tab. č. 2 Obsahy jednotlivých sacharidických látek v pivu

Tab. č. 3 Přehled použitých vzorků piva

Tab. č. 4 Postup barvení SYPRO Ruby

10. SEZNAM ZKRATEK

HDL - high density lipoprotein

LDL - low density lipoprotein

DNA - deoxyribonucleic acid

HMW - high molecular weight

LMW - low molecular weight

LPT1 - Lipid Transfer Protein

LBP - Lipid Binding Proteins

IR - infrared,

UV- ultraviolet

VIS - visible

LC - liquid chromatography

ED - elektrochemický detektor

MS - mass spectrometry

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

TOF - Time of Flight

PAGE - polyacrylamide-gelelectrophoresis

SDS – sodium dodecyl sulfat

CHZO - Chráněné zeměpisné označení

BU- jednotka pro hořkost piva

ABTS - 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu

DPPH - 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu

AH – antioxidantem

R• - radikál

DMSO – dimethylsulfoxid

DMPD - N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power
TPTZ - 2,4,6-tripyridyl-S-triazin
GAE - Gallic Acid Equivalents
SH - sulfhydroxilová skupin
DTNB - .5' - dithiobis(2-nitrobenzoová
TNB2 - 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny
HPLC - High-performance liquid chromatography
ESI - Electrospray Ionization
DHB - 2,5-dihydroxybenzoová
HCCA - α -kyano-4-hydroxyskořicová
PMF - Peptidové mapování
ACN - acetonitril
TFA - kyselině trifluoroctové
PMF - peptidové mapování