

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

NEALKOHOLICKÁ PIVA S PŘÍDAVKEM BYLIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

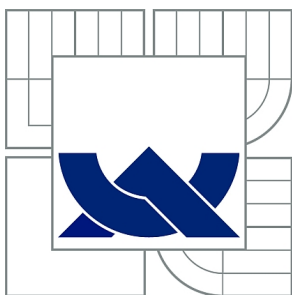
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

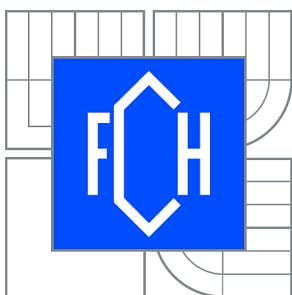
AUTHOR

TEREZIE VYSKOČILOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

NEALKOHOLICKÁ PIVA S PŘÍDAVKEM BYLIN

ALCOHOL-FREE BEERS WITH HERBAL EXTRACTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

TEREZIE VYSKOČILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0661/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Terezie Vyskočilová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Nealkoholická piva s přídavkem bylin

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše ke studované problematice - přehled dostupných nealkoholických piv s bylinnou složkou; charakterizace přídavné složky a jejích aktivních látek.
2. Příprava a analytická charakterizace bylinných extraktů přidávaných do nealkoholického piva.
3. Enkapsulace vybraných bylinných extraktů.
4. Senzorická analýza modelových nealkoholických piv s bylinnou příchutí.

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

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

Terezie Vyskočilová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá testováním vybraných bylinných příchutí do nealkoholických pív. V teoretické části jsou uvedeny způsoby výroby nealkoholického piva a zastoupení aktivních složek v bylinách. Připraveno bylo celkem 7 bylinných extraktů, které se přidávaly do 3 značek českých nealkoholických pív. U každé varianty byly zjišťovány změny obsahu aktivních látek před a po přidání bylinného extraktu.

Obsah polyfenolů, flavonoidů, hořkých látek a isosloučenin a také antioxidační aktivita byly stanovovány spektrofotometricky. Pomocí HPLC/UV-VIS analýzy byl stanoven obsah katechinů. Dva z připravených bylinných extraktů byly rovněž enkapsulovány do liposomů a u vytvořených částic byla zjištěna velikost i stabilita. Každá z variant včetně enkapsulovaných příchutí byla podrobena senzorické analýze s cílem zjistit odezvu spotřebitelů a preferenci příchutí.

SUMMARY

This bachelor thesis deals with alcohol-free beers and herbal extracts, which are the beers flavoured with. In the theoretical part the methods of non-alcoholic beer production and the representation of the active ingredients in herbs are described. A total of 7 herbal extracts were prepared and added into 3 non-alcoholic Czech beers. Each variant was examined in order to detect changes of the content of active substances before and after the addition of the herbal extract.

The content of polyphenols, flavonoids, bitter substances and iso-bitter acids as well as antioxidant activity were analyzed spectrophotometrically. Using HPLC/UV-VIS analysis a content of catechins was assayed. The two selected flavours were encapsulated into liposome; the particles were tested of size and stability. Sensory analysis of all herbal extracts including the encapsulated ones was performed to determine the response of consumers and flavour preferences.

KLÍČOVÁ SLOVA

nealkoholické pivo, byliny, senzorická analýza, enkapsulace, katechiny

KEYWORDS

Alcohol-free beer, herbs, sensory analysis, encapsulation, catechins

VYSKOČILOVÁ, T. *Nealkoholická piva s přídavkem bylin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 68 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studentky

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc., za vedení a udělené rady při tvorbě celé práce. Další poděkování patří Ing. Andree Háronikové za trpělivost, pomoc a ochotu, se kterou se mi při práci v laboratoři věnovala. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Petře Matouškové za pomoc při metodě enkapsulování.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Chemické složení piva	8
2.2	Výroba nealkoholického piva	8
2.2.1	Historie	8
2.2.2	Fyzikálně-chemické postupy	9
2.2.3	Technologie řízeného kvašení	12
2.2.4	Použití speciálních mikroorganismů	12
2.3	Byliny	14
2.3.1	Alkaloidy	14
2.3.2	Glykosidy	15
2.3.3	Gumy	16
2.3.4	Pryskyřice a balzámy	16
2.3.5	Hořké látky	16
2.3.6	Saponiny	17
2.3.7	Silice	17
2.3.8	Slizy	18
2.3.9	Třísloviny	18
2.3.10	Další složky	18
2.4	Charakterizace použitých bylin	18
2.4.1	Máta peprná	18
2.4.2	Mateřídouška úzkolistá	18
2.4.3	Meduňka lékařská	18
2.4.4	Rybíz černý	19
2.4.5	Šalvěj lékařská	19
2.4.6	Třezalka tečkovaná	19
2.4.7	Citrónová tráva	19
2.4.8	Ženšen pravý	19
2.5	Analyzované aktivní látky	20
2.5.1	Fenolové sloučeniny	20
2.6	Enkapsulace	21
2.6.1	Metody enkapsulování	22
2.7	Použité metody analýzy	22
2.7.1	HPLC	22
2.7.2	DLS	23
2.7.3	Zeta potenciál	24
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Použité chemikálie, přístroje a pomůcky	26
4.1.1	Standardní chemikálie	26
4.1.2	Ostatní chemikálie	26
4.1.3	Přístroje a pomůcky	26
4.2	Analyzované vzorky	27
4.2.1	Pivo	27
4.2.2	Byliny	27

4.2.3	Melasa	27
4.3	Příprava extraktů	27
4.4	Skupinové charakteristiky	27
4.4.1	Stanovení celkových polyfenolů	27
4.4.2	Stanovení celkových flavonoidů	28
4.4.3	Stanovení celkových hořkých látek	28
4.4.4	Stanovení isosloučenin	28
4.5	Stanovení antioxidační aktivity	28
4.6	Stanovení pH	29
4.7	Stanovení katechinů pomocí HPLC/UV-VIS	29
4.7.1	Podmínky analýzy	29
4.7.2	Optimalizace úpravy vzorku	29
4.8	Enkapsulace vybraných bylinných extraktů	29
4.9	Senzorická analýza	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
5.1	Složení ochucených piv	31
5.2	Skupinové charakteristiky	32
5.2.1	Stanovení celkových polyfenolů	32
5.2.2	Stanovení celkových flavonoidů	34
5.2.3	Stanovení celkových hořkých látek	36
5.2.4	Stanovení isosloučenin	37
5.3	Stanovení antioxidační aktivity	39
5.4	pH	41
5.5	Stanovení katechinů pomocí metody HPLC/UV-VIS	42
5.5.1	Optimalizace úpravy vzorku	42
5.5.2	Podmínky separace	42
5.5.3	Kvantifikace katechinů	42
5.6	Enkapsulace vybraných bylinných extraktů	47
5.6.1	Velikost částic	47
5.6.2	Stabilita částic – zeta potenciál	48
5.7	Senzorická analýza	48
5.7.1	Celkové výsledky senzorické analýzy	49
5.7.2	Párová zkouška	51
6	ZÁVĚRY	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	56
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	60
9	SEZNAM PŘÍLOH	60
10	PŘÍLOHY	61

1 ÚVOD

Pivo patří mezi první historicky doložené nápoje, které lidé vyráběli. Počátky jeho výroby sahají až do dob neolitu. V Mezopotámii v té době vznikala první technologie, která se dále rozšiřovala po celé Středozevní oblasti a dále do Evropy. Po celou dobu pivo neztrácí na oblibě a považuje se za kultovní nápoj [1].

V moderní době je snaha zpřístupnit pivo i těm, kteří nemohou požívat alkohol. Vzniká tedy pivo nealkoholické. Je určeno pro sportovce, řidiče, nemocné i pracující. V zemích Evropské unie se jako nealkoholická piva označují piva s obsahem alkoholu do 0,5 % obj. včetně. Další kategorie, nízkoalkoholické pivo, obsahuje alkohol v rozmezí 0,6 až 1,2 % obj. V zemích islámu je striktně požadován nulový obsah alkoholu [2].

Nealkoholické pivo je spojováno i se zdravým životním stylem; jde totiž o výborný iontový nápoj. Tento nápoj má relativně nízkou energetickou hodnotou v porovnání s různými slazenými limonádami. Pivo je dobře stravitelné (látky z extraktu jsou stravitelné z 95 % a 1 g těchto látek má energii 15,8 kJ) [1].

Spotřeba nealkoholického piva u nás tvoří asi 4 % celkové spotřeby piva, přičemž export je minimální. Největší výrobce, Radegast Birell, má na trhu téměř 70% podíl. Na českém trhu je 37 druhů nealkoholických piv, které vyrábí 30 pivovarů [3].

Na trhu se objevují i ochucené varianty piva, především v poslední době. Vyrábějí se alkoholická piva s příchutí např.: višňová, malinová, čokoládová, citrónová, pepřová, švestková, třešňová, vavříňová, koriandrová, bergamotová, brusinková, rakytníková, zázvorová, grapefruitová, mandarinková, borůvková, pomerančová, s přídavkem cannabis, vanilková, s příchutí cappuccino, fíková, kávová, mandlová aj. Na trhu nalezneme i alkoholická piva s příchutí bylinek (viz Příloha č. 1).

Nealkoholická piva s bylinnou příchutí na českém trhu ovšem chybí. Ochucovat nealkoholické pivo se zdá jako vhodný způsob, jak zamaskovat slabý senzorický profil a nevhodné příchutě, které během výroby mohou vznikat. Bylinné příchutě jsou optimální řešení, neboť jsou oblíbené a mohou získat oblibu i těch spotřebitelů, kterým ovocné příchutě, často od přírodních odlišné, nevyhovují.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chemické složení piva

Pivo nejen že umí skvěle zahnat žízeň, ale je významné také z nutričního hlediska. Obsahuje všechny potřebné základní živiny: vodu, sacharidy, bílkoviny, vitaminy, biogenní prvky a ionty [1]. Vyrábí se z vody, ječmene (sladu), chmele a pivovarských kvasinek. Zastoupení jednotlivých látek je ovšem proměnlivé dle extraktu mladiny a stupně prokvašení.

Hlavní složkou piva je voda, obsažena je asi z 92 %. Sacharidy patří také mezi důležité složky; zastoupeny jsou mono- a oligosacharidy, maltosa a maltotriosa, dextriny. Zdrojem energie je i ethanol. U nealkoholického piva je tento příspěvek ovšem minimální. Říz pivu dodává oxid uhličitý, který se vyznačuje i fyziologickými účinky. Podporuje tvorbu slin a kyseliny chlorovodíkové [1, 4].

Další skupinu tvoří dusíkaté látky a heterocyklické látky. Typickou chuť piva dodávají hořké látky z chmele, které podporují chuť k jídlu. Pivo je známé pro svůj vysoký obsah vitaminů; obsahuje všechny zástupce skupiny vitaminů B, vitamin H, niacin aj. Vysoký je také obsah minerálních látek a stopových prvků (asi 30 zástupců, většina pochází ze sladu). Obsah sodíku je relativně nízký, což je pozitivní fakt pro osoby s vysokým tlakem. Pivo obsahuje i polyfenolické látky a barviva (melanoidy). Kompozice těchto látek přispívá k příznivým zdravotním účinkům [1, 4].

2.2 Výroba nealkoholického piva

2.2.1 Historie

První nealkoholické pivo vznikalo ve dvacátých letech minulého století v USA a vyrábělo se pomocí evaporace a destilace. V Německu a Švýcarsku přišli s myšlenkou produkce nealkoholického piva po druhé světové válce, vyráběno bylo vakuovou filtrací piva [5, 6].

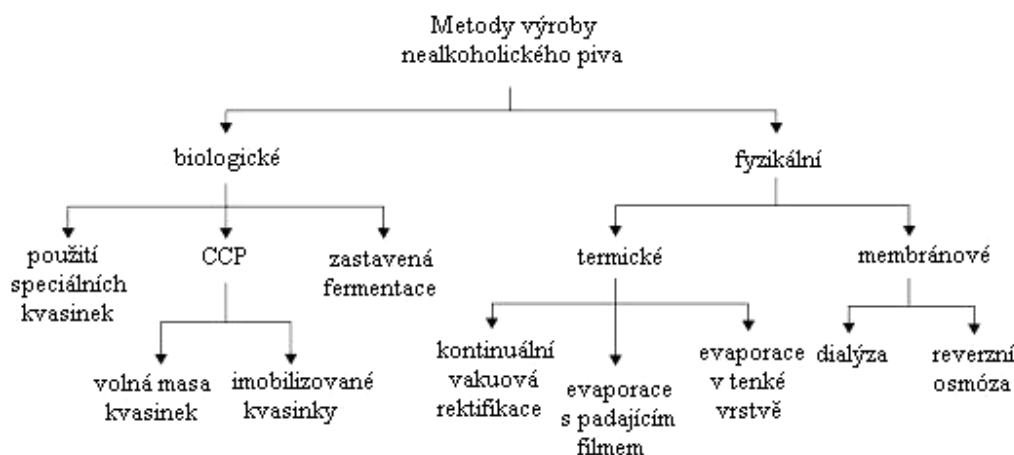
V České republice se začalo vyrábět nealkoholické pivo od sedmdesátých let; tento trend šel ruku v ruce se soudobým rozvojem automobilismu. Šlo o nealkoholický nápoj na bázi piva, tzv. Pito (název pochází ze dvou slov: Pivo a auTO). Tehdy se chuti tradičního piva příliš nepodobalo.

Technologie řízeného (limitovaného) kvašení, kterou bylo Pito vyráběno, se používá dodnes. V současné době se využívá i speciálního druhu kvasinek, které produkují minimální množství ethanolu. Jde o nealkoholické pivo Birell [6].

S postupem času bylo vyvinuto mnoho metod výroby nealkoholického piva, které se chutí více či méně přibližovalo chuti klasického piva.

Výrobu nealkoholického piva v současné době můžeme rozdělit do 3 postupů:

- fyzikálně-chemické postupy (fyzikální)
- technologie řízeného kvašení (biologické)
- použití speciálních mikroorganismů



Obrázek č. 1: Rozdělení metod výroby nealkoholického piva [7]

2.2.2 Fyzikálně-chemické postupy

Principem je odpařování a filtrace – v praxi jde o metody souhrnně označované jako termické (evaporační) a membránové techniky. Výchozí surovinou je alkoholické pivo, ve kterém dochází k odstranění alkoholu. Obě techniky ale požadují speciální přístroje a tím jsou provozní náklady vyšší než u ostatních postupů [8].

Při odpařování, destilaci a reverzní osmóze dochází k zahušťování piva. Ředí se proto odplyněnou vodou (při procesu odplynění dochází k odstranění reaktivního kyslíku, který by mohl zhoršit kvalitu piva); může být syceno oxidem uhličitým [9].

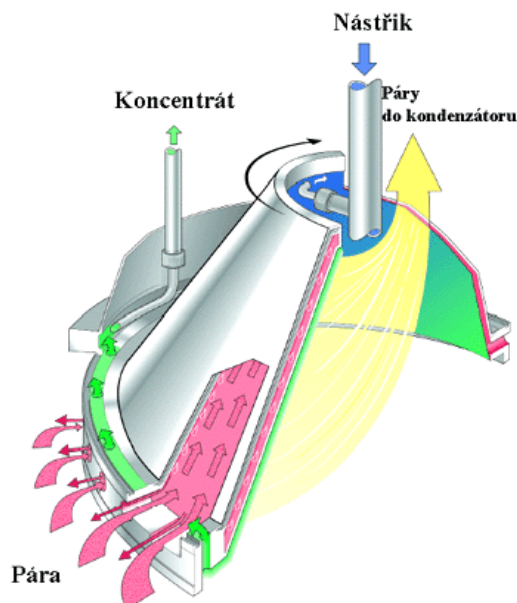
2.2.2.1 Termické techniky

Vakuová destilace

Destilace se provádí za vakua., slouží k tomu deskové výměníky. Pivo se zahřeje párou na teplotu 45 °C a přivádí se do „stripperu“. Jde o nádobu, ve které se zachycují při nižší teplotě těkavé aromatické látky. Pivo dále pokračuje do vakuového prostoru; po odpaření ethanolu je obohaceno buketními látkami ze stripperu a naředěno na původní koncentraci odplyněnou vodou [9].

Evaporace na tenké vrstvě

Příkladem této metody může být vakuová rotační odparka Centritherm system od firmy Flavourtech Company. Celá odparka představuje dutý kužel tvořený jedním nebo více talíři umístěnými v jedné ose. Pivo je přiváděno shora a rozstříkáváno po celém vnitřním vyhřívaném povrchu. Pomocí odstředivých sil je pivo rozprostřeno po celém vnitřním povrchu ve velmi tenké vrstvě 0,1 mm a pivo setrvává na této ploše méně než 1 s. Dealkoholizované se pak sbírá na spodním okraji kužele. Páry ethanolu stoupají kuželem nahoru a opouští celý systém středovým potrubím do kondenzátoru [7].

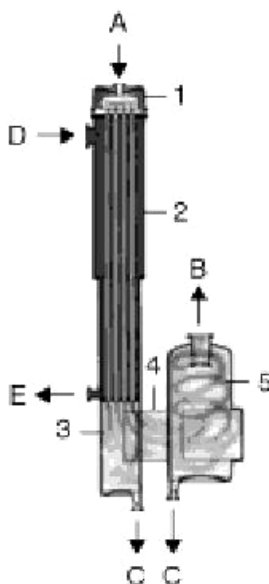


Obrázek č. 2: Schéma vakuové rotační odparky od firmy Centritherm [10]

Evaporace se stékajícím filmem

Tato metoda se považuje za nejlevnější tepelnou technologii. Vyznačuje se vysokou účinností a jednoduchou údržbou zařízení. Alkoholické pivo se za podmínek vakua ohřeje k varu. Dále je vstřikováno do vyhřívaných trubek. Vlivem gravitaci stéká dolů a postupně dochází k odparu. Pivo se nachází v trubkách okolo několika sekund. Alkohol je odstraňován v separátoru u dna výměníku a odchází do kondenzátoru [7].

Pokud se do systému zařadí několik odparek za sebou, je možné použít brýdové páry pro vyhřívání a šetřit energii. Teplota prvního členu musí být ale poměrně vysoká, aby byl zajištěn bod varu u ostatních členů.



Obrázek č. 3: Schéma odparky s padajícím filmem [7]

Kontinuální vakuová rektifikace

Pokročilejší technologií na výrobu nealkoholického piva je kontinuální vakuová rektifikace. Metoda je šetrná a dosahuje se velmi nízkých hodnot obsahu ethanolu.

Pivo se odplyní a předeheje, přes stripper pokračuje do rektifikační kolony. Dále se odvádí do evaporátoru, kde vznikají páry potřebné pro rektifikaci. Hotové pivo je obohaceno aromatickými látkami ze stripperu. Kvalita separace závisí na rovnováze pára-kapalina a na době setrvání piva v tepelném výměníku [7].

2.2.2.2 Membránové techniky

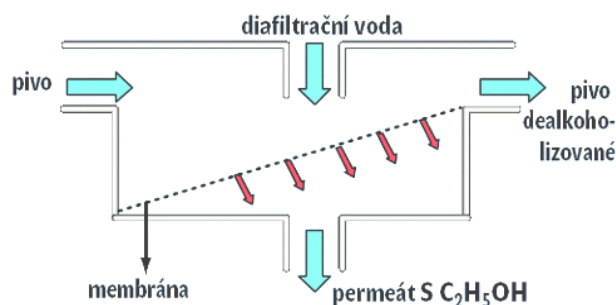
Podstatou technologie je odstranění menších molekul ethanolu přes polopropustnou membránu, přičemž buketní a extraktní látky vyšší molekulové hmotnosti zůstávají v pivě. Nedochází k tepelným zásahům, kvalita piva tedy není ovlivněna v takové míře, jako tomu bylo u technik zmíněných výše [9].

Reverzní osmóza

Hnací silou je rozdíl tlaků na obou stranách membrány a musí být stabilně vyšší než tlak osmotický.

Proces probíhá za přetlaku 40 bar. Původní pivo po přefiltrování se přivádí tangenciálně (tzv. cross flow) do prostoru se semipermeabilní membránou, skrze kterou odchází ethanol a voda. Membrána je plochá přepážka z acetátu celulosy, nylonu a jiných polymerů [7].

Proces je náročný na vybavení; je třeba výkonných čerpadel, která zajistí dostatečný průtok. Při nižších rychlostech by mohlo dojít k usazování velkých molekul na povrchu membrán [9].

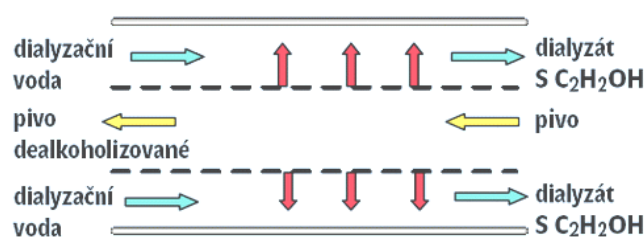


Obrázek č. 4: Schéma procesu při reverzní osmóze [9]

Dialýza

Při dialýze přestupují látky membránou ve směru nižší koncentrace, dokud nedojde k jejímu vyrovnání. Stupeň výměny je určen koncentračním gradientem na obou stranách membrány.

Na jedné straně membrány přecházejí ethanol a voda, na druhé straně protéká odsolený dialyzát bez alkoholu. Protiproudění uspořádání zaručuje vyšší koncentrační gradient. Turbulentní tok čistí póry membrány, celkový tlak je mírně zvýšený, ale je tendence udržovat hodnotu mírně nad hladinou nasycení oxidem uhličitým v původním pivu, aby jeho obsah v dealkoholizovaném zůstal do určité míry zachován. V porovnání s reverzní osmózou není potřeba dodatečné sycení a vysokotlaké pumpy – proces je tedy levnější [9].



Obrázek č. 5: Schéma dialýzy [9]

2.2.2.3 Srovnání metod

Fyzikálně-chemické metody jsou nákladné, ale chuť dealkoholizovaného piva se blíží původnímu výrobku. Z hlediska ekonomického je nejvýhodnější variantou vakuová destilace (ovšem zde za cenu nežádoucích chuťových a barevných změn). Kvůli kvalitě produktu a šetrnosti procesu jsou upřednostňovány membránové techniky. Pivo není zahříváno a nedochází tak k částečnému znehodnocení. Nezajistí se ovšem tak nízké koncentrace ethanolu a příjemná chuť (ta je spíš slabší).

2.2.3 Technologie řízeného kvašení

Principem této technologie výroby nealkoholického piva je přerušení nebo omezení tvorby ethanolu přes kontrolu metabolismu kvasinek [8].

2.2.3.1 Limitovaná fermentace

Limitovaná fermentace je nejpoužívanější metoda pro výrobu nealkoholického piva. Při limitované fermentaci je omezen metabolismus kvasinek, ethanol je pak produkován v nízkém množství (pod 0,5 % obj.) [8].

Příkladem limitované fermentace je metoda CCP – tzv. „cold contact process“. Aplikací stresových faktorů, jako je nízká teplota a anaerobní podmínky, je potlačen růst a metabolismus kvasinek a ve výsledku je potlačena také i produkce ethanolu. Během fermentace, která trvá několik dní, se používá velké množství kvasinek, jež mohou mít i pozměněný metabolismus. Fermentace probíhá při teplotě 0–1 °C. Získané pivo má dobrý organoleptický profil [8].

2.2.3.2 Imobilizace kvasinek

Tvorba ethanolu je omezena přerušovaným kontaktem kvasinek a mladiny, Doba kontaktu se může libovolně měnit. Jde o technicky i ekonomicky náročnější metodu. Je nutné provádět čerání piva kvůli udržení čistoty imobilizačního zařízení (v něm jsou kvasinky navázány na nerozpustný nosič) [5, 9].

2.2.3.3 Zastavená fermentace

Proces kvašení se při dosažení požadovaného obsahu ethanolu zastaví vysokým tlakem nebo prudkým snížením teploty. Kvasinky jsou odstraněny. Tím se proces liší od limitované fermentace, kde je omezen metabolismus kvasinek [7].

Při této technice se využívá mladiny s nízkou koncentrací zkvasitelných cukrů a fermentace probíhá za anaerobních podmínek, aby se omezilo množení kvasinek a prodloužení lag-fáze. Je nutné sledovat celý proces a hladinu ethanolu [7, 8].

2.2.3.4 Srovnání

Pivo vyráběné těmito metodami se vyznačuje nižší kvalitou po stránce organoleptických parametrů. Nedostatečná chuť piva je výrazná při výrobě limitovanou nebo zastavenou fermentací. Podíl na tom má zvýšené pH (při přerušeném kvašení nepoklesne), nízký obsah CO₂, neúplné odstranění látek způsobujících chuť po mladině, nezralá chuť [8].

2.2.4 Použití speciálních mikroorganismů

Třetím z postupů výroby nealkoholického piva je použití speciálních kmenů nebo jinak geneticky upravených druhů kvasinek při procesu kvašení.

2.2.4.1 Využití speciálních kmenů kvasinek

Jde o náhradu pivovarských kvasinek jinými mikroorganismy, které mají slabou schopnost zakvašovat, nebo nemohou zakvašovat maltosu. V praxi se užívají např. *Saccharomyces ludwigii*. Jsou příbuzné *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, ale nemají invertasu a maltasu a tak nemohou štěpit maltosu. Během fermentace je nutné předejít kontaminaci jinými kvasinkami [7, 9].

2.2.4.2 Použití upravených mikroorganismů

Pro výrobu nealkoholického piva je možné používat upravené, mutantní druhy mikroorganismů. S výhodou se používá kvasinek, protože přežívají i s některými mutacemi, které nezvládají jiné eukaryotní organismy [11].

Firma Adachi aplikovala rekombinantní kmen *Saccharomyces cerevisiae*, jež měl přerušný gen pro pyruvátdekarboxylasu. Do kvasinky byl zároveň aplikován transformovaný plazmid nesoucí strukturní gen pro laktátdehydrogenasu. Produkce ethanolu byla o třetinu nižší [11].

Použití kvasinek mutantních v genech pro enzymy Krebsova cyklu

Úpravou kvasinek dochází ke snížení produkce ethanolu a zvýšení tvorby organických kyselin z cyklu. Je na ně možné nahlížet jako na senzory nežádoucí komponenty, ale také i jako na konzervační složku. Dostatek kyseliny mléčné vyrovnává konzervační účinek ethanolu, který není obsažen v dostatečném množství [8].

Při tvorbě těchto speciálních kmenů jde o přímý zásah do genomu pivovarských kvasinek, a jedním ze způsobů je mutagenese. Mutace je každá změna genu, která se zachovává při autoreprodukci genetického materiálu, a to ještě i tehdy, pokud už přestal působit činitel, který ji zapříčinil [8].

Regulaci produkce ethanolu je možné provádět pomocí tří kroků:

- 1) regulace přes citrát-syntasu, katalyzující reakci oxalát + acetyl-CoA → citrát
- 2) regulace přes reakce katalyzované isocitrátdehydrogenasou
- 3) 2-oxoglutarátdehydrogenasa, resp. celý její multienzymový komplex [8]

Schéma Krebsova cyklu se nachází v Příloze č. 2.

Vlivem nízké hodnoty pH je omezena aktivita alkoholdehydrogenasy a pyruvátdekarboxylasy (pH optimum je při vyšších hodnotách). Tím je potlačena produkce ethanolu z pyruvátu; ten je redukován na laktát [11].

Tabulka č. 1: Přehled obsahu ethanolu v závislosti na použité metodě [7]

Metoda výroby	% obj. ethanolu
zastavená fermentace a zředění	0,3-1,0
CCP	0,36-0,64
speciální kvasinky (<i>S. ludwigii</i>)	0,48
kontinuální vakuová rektifikace	0,1
vakuová odparka s padajícím filmem	0,4
reverzní osmóza	0,4
dialýza	0,4

2.3 Byliny

Byliny patří mezi pochutiny s vysokou nutriční hodnotou. Mezi významné účinky bylin patří antioxidační aktivita (především jako ochrana tuků) a antimikrobiální účinek. V neposlední řadě obohacují potravu svými senzorickými vlastnostmi [12, 13].

Každá bylina obsahuje velké množství funkčních látek a složek a tím má specifické zdravotní účinky. Mezi tyto složky patří alkaloidy, flavonoidy, hořké látky, slizy, taniny, těkavé oleje a další.

Účinné složky mohou být buď v celé rostlině, nebo jen v některé její části. Nadzemní části rostliny jsou: nať (herba), lodyha (summitas), pupen (gemma), list (folium), dřevo (lignum), kůra (cortex), květ (flos), plod (fructus), oplodí (pericarpium), stopka (stipes), semeno (semen), výtrusy (spora). Podzemní části rostliny jsou: kořen (radix) oddenek (rhizoma), hlíza (tuber), cibule (bulbus) [14].

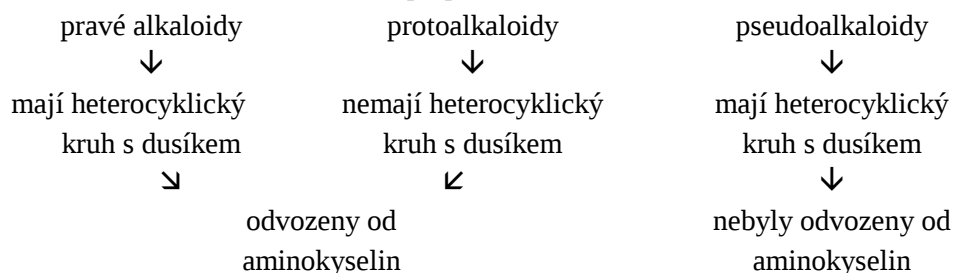
Přehled účinných složek bylin [14]

1. Alkaloidy	7. Silice	13. mléčné šťávy
2. Glykosidy	8. Pryskyřice a balzámy	14. Minerální látky
3. Saponiny	9. Slizy	15. Organické kyseliny
4. Třísloviny	10. Gummy	16. Vitaminy, biogenní aminy
5. Rostlinná barviva	11. Tuky a oleje	17. Látky s hormonálním působením
6. Hořké látky	12. Vosky	18. Fytoncidy

2.3.1 Alkaloidy

Alkaloidy se vyskytují v různých druzích bylin a společným znakem je obsažený atom dusíku. Tyto látky jsou velmi reaktivní. Ve vyšších dávkách jsou jedovaté. Proto je nutné je používat obezřetně. Účinek a složení se ovšem liší s každou rostlinou. Jejich název pochází ze spojení „alkali-like“, za bazické vlastnosti je odpovědný přítomný dusík. Mají hořkou chuť. V rostlině je častá přítomnost jednoho alkaloidu, který je doprovázen malým množstvím jiných, strukturně obdobných alkaloidů [12, 13, 15].

Rozdělení alkaloidů dle Friedliho [15]:



Syntéza alkaloidů vychází z aminokyselin tryptofanu, ornitinu, lysinu, fenylalaninu, tyrosinu a histidinu; pseudoalkaloidy mohou pocházet z terpenoidů nebo steroidů [12].

Nejznámějším zástupcem alkaloidů odvozených od **tryptofanu** jsou námelové alkaloidy. Jsou produkovány paličkovitými nachovou (houba); z obsažené kyseliny D-lysergové se dá získat LSD. Součástí nápoje tonik je chinin. Používá se proti malárii, tlumí CNS, používá se při srdečních arytmiích [12].

Nikotin patří mezi alkaloidy odvozené od **ornitinu a lysinu**. Další ze skupiny jsou alkaloidy pepře, chavicin a piperin. Chavicin dráždí nervová zakončení a vyvolává pocit tepla. Důležitým zástupcem je atropin z rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*). Na organismus působí psychotropně. Má využití

v očním lékařství – rozšiřuje zorničky, proto jej dámy v dřívějších dobách používaly; odtud pochází jeho druhové jméno. Alkaloidy, které běžně konzumujeme, tedy kofein, theofylin a teobromin, nacházíme v kávě, čaji a kakau. Tyto látky podporují funkci organismu [12, 14].

Kapsaicin, hřejivá složka chilli papriček, patří mezi alkaloidy odvozené od **fenylalaninu a tyrosinu**. Morfin, obsažený v opiu, je návyková látka a užívá se jako spasmolytikum. Tyto alkaloidy se nachází také ve vlašovičnicku větším (asi 4 %). Zvyšují krevní tlak, uvolňují křeče průdušek a střev [12, 14].

Mezi zástupce **terpenických alkaloidů** patří nufarin. Společně s alkaloidy leknínu je předmětem výzkumu antitumorózního účinku. **Steroidní alkaloidy** se vyskytují jako estery a glykosidy; ty mívají vlastnosti saponinů. Solanin je glykosid solanidinu a patří mezi toxické alkaloidy brambor [12, 14].

2.3.2 Glykosidy

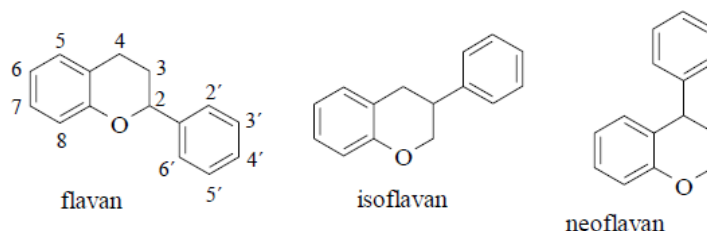
Glykosidy patří k derivátům cukrů. Na uhlíku v poloze 1 je navázán necukerný zbytek, tzv. aglykon.

Jde převážně o jedovaté a hořké látky, které plní funkci zásobní a ochranné složky. Předpokládá se jejich detoxikační význam. Pokud jsou totiž lipofilní škodlivé látky navázány na cukernou složku, mohou být přenášeny, protože se stanou rozpustnými ve vodě [14].

2.3.2.1 Fenolické glykosidy

Prvním zástupcem jsou flavanoidní glykosidy. Rozdělují se na základě struktur flavanu, isoflavanu a neoflavanu. Dle stupně oxidace se dále dělí na flavony, isoflavony, flavanoly, flavanony, flavanoly. V rostlinách se flavonoidy vyskytují především jako β -glykosidy [14].

Flavanoidy a isoflavanoidy mají široké spektrum účinku. Pomáhají při léčbě infekcí, posilují kapiláry. V rostlině se pravděpodobně účastní redoxních pochodů. Flavony a flavanoly mají funkci žlutých pigmentů. Isoflavanoidy patří mezi fytoestrogeny a fytoncidy [14, 16].



Obrázek č. 6: Základní struktury flavonoidů [14]

Skupina antrachinonových glykosidů má aglykon odvozený od antrachinonu. Dodávají rostlinám barvu; v lidském organismu ovlivňují činnost a funkci střev. Mají projímavý účinek, neboť stimulují kontrakce tlustého střeva. Aloe pravé projímá, dokáže ovlivnit sekreci žluče a hojí rány. Účinnou látkou jsou aloiny [13].

Lignany vznikají při tvorbě ligninů a nacházejí se ve dřevě, pryskyřicích i v plodech (např. lněná semínka). Jde o fytoestrogeny, mají estrogení efekt a v metabolismu se mohou přeměnit na látky na hormonálním principu. Hydrojuglon glukosid se vyskytuje v nezralých plodech vlašských ořechů. Snadno hydrolyzuje a uvolněný aglykon (hydrojuglon) se oxiduje na hnědý juglon, který dokáže silně zabarvit pokožku [14].

Glykosidy furanokumarinů mají schopnost absorbovat UV záření. Pozor je třeba dávat na bergapten, který při potřísnění kůže způsobuje její ztmavnutí a puchýřky. Furanokumariny interagují s DNA a RNA [14].

Nejdůležitějším zástupcem glykosidů pyranokumarinů je dikumarol, jež inhibuje syntézu protrombinu v játrech. Užívá se proto k léčení trombóz namísto heparinu a na rozdíl od něj se může podávat perorálně [14].

2.3.2.2 Steroidní glykosidy

Základní kostrou je cyklopentan-perhydrofenanthren neboli steran. Cukerná složka srdečních glykosidům ovlivňuje díky svým interakcím transport v organismu, účinnou složkou je aglykon. Struktura rostlinného aglykonu je tvořena kardenolidem, u živočišného bufadienolidem. Z fyziologického hlediska doplňují a podporují srdeční činnost. Pokud jsou steroidní glykosidy obsaženy v některých rostlinách ve vysoké koncentraci, jsou tyto rostliny označovány jako jedovaté. Jde např. o oleandr, leknín, magnolii nebo konvalinku (uvádí se, že je jedovatá i sama voda konvalinek, která se nachází ve váze). Nejznámějším zdrojem je náprstník červený (*Digitalis purpurea* L.) a vlnatý (*D. lanata*) [14].

2.3.2.3 Thioglykosidy

Vyskytují se v čeledi lichořeřišnicovitých a brukvovitých (brukvovitá zelenina jako zelí, kedlubna, křen, ředkvičky a semena řepky). Používá se semen brukve černohořčice, které obsahují glykosid sinigrin, k léčení zánětů dýchacích cest a revmatických obtíží [14].

2.3.2.4 Kyanogenní glykosidy

Nejznámější zástupce je amygdalin, který se vyskytuje v jádrech pecek. Při požití dochází k hydrolýze v žaludku a k uvolnění kyanovodíku [14].

2.3.3 Gummy

Jde o polysacharidy tvořené arabinosou, galaktosou a rhamnosou, jež bývají zakončeny nejčastěji kyselinou glukuronovou. Vyskytují ve formě Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ solí. Ve vodě tvoří lepivé koloidní roztoky, tzv. klovatinu [14].

2.3.4 Pryskyřice a balzámy

Poškozením kůry stromů získáváme amorfní hmoty; surové se označují jako balzámy a po oddestilování snadno těkavých složek se pevný, nerozpustný zbytek nazývá pryskyřice. Pryskyřice jsou po chemické stránce směsí terpenů, pryskyřičnatých kyselin, jejich esterů, pryskyřičnatých alkoholů a jejich esterů s aromatickými kyselinami. Balzámy mají vysoký obsah aromatických balzamických kyselin (skořicová, benzoová) [14].

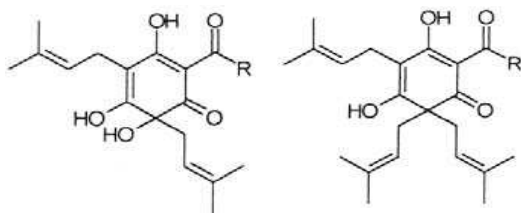
2.3.5 Hořké látky (hořčiny)

Hořké látky jsou převážně glykosidy, jedovaté nejsou. Hořkost se stanovuje jako celková v jednotkách hořkosti (viz stanovení v kapitole 4.4.3), neboť je tvořena širokou skupinou ne zcela zjištěných látek. Primární funkce těchto složek je ovlivnění trávicího traktu. Dochází ke zvýšení sekrece enzymů, žaludečních šťáv a žluče, ke zlepšení trávení a vstřebávání živin. Hořčiny dále mají uklidňující, protizánětlivý a protinádorový účinek [13, 14].

Pelyněk pravý (*Artemisia absinthium* L.), obsahuje β -thujon, který je jedovatý a poškozuje CNS. Absinthin a artabsin při izolaci destilací s vodní parou přecházejí postupně na chamazulen, který dává modré zbarvení všem pelyňkovým likérům.

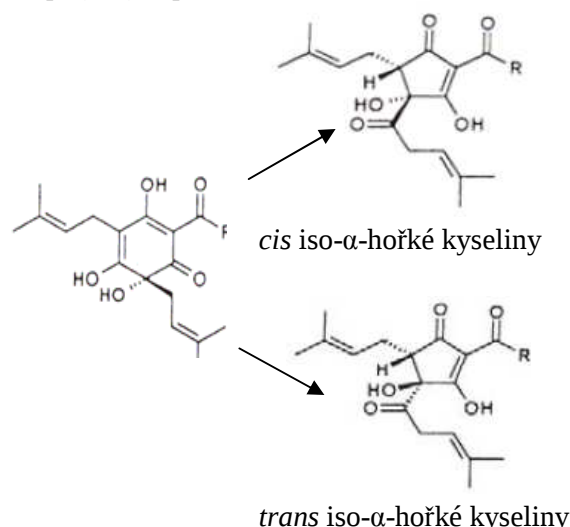
Další rostlinou je chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.). Pryskyřice obsahuje α - a β -hořké kyseliny. Během vaření piva v chmelovaru izomerují α -hořké kyseliny na iso- α -hořké kyseliny. Vznikají

ve dvou izomerech: *cis*- a *trans*-, přičemž izomer *cis*- je v dvojnásobném množství. Hořké látky jsou nestabilní a snadno podléhají rozkladu, oxidaci a izomeraci [14, 17, 18].



Obrázek č. 7 : α -hořké a β -hořké kyseliny [18]

R	α	β
$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	humulon	lupulon
$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	kohumulon	kolupulon
$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$	adhumulon	postlupulon
$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	posthumulon	postlupulon
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	prehumulon	prelupulon



Obrázek č. 8: Vznik isosloučenin [18]

2.3.6 Saponiny

Patří mezi glykosidy; obsahují sapogenin (lipofilní aglykon) a hydrofilní cukerný zbytek. Dle sapogeninu se dělí na steroidní a triterpenické. Saponiny podobně jako mýdlo tvoří pěnu při kontaktu s vodou. Podporují vstřebávání látek, rozpouští hlen, mají diuretický účinek, dráždí sliznice trávicího traktu. Tím, že narušují červené krvinky, patří mezi krevní jedy [13, 14].

Základní strukturou steroidních saponinů je cyklopentan-perhydrofenantren, tedy souvisejí se srdečními glykosidy, steroly, hormony a žlučovými kyselinami. V hojné míře se vyskytují u čeledi liliovitých (aloe) a amarylkovitých (agave americká). Používají se především pro výrobu steroidních hormonů [14].

Sapogenin v případě triterpenických saponinů má pentacyklickou triterpenovou strukturu.

Lékořice lysá (*Glycyrrhiza glabra* L.) – používají se sušené loupané kořeny, hlavní složka je sladký saponin glycyrrhizin 50x sladší než sacharosa. Triterpenické saponiny se vyskytují dále v prvosence jarní, přeslička rolní a mydlici lékařské, která může být pro vysoký obsah saponinů použita k výrobě přírodního mýdla [14].

2.3.7 Silice

Silice jsou definovány jako těkavé, intenzivně vonící směsi přírodních látek olejovité konzistence, lipofilní, ve vodě těžce rozpustné [14]. Mezi základní složky patří monocyklické, bicyklické a acyklické monoterpeny, seskviterpeny, deriváty fenylypropanu. Silice působí jako diuretika, usnadňují vykašlávání (eukalyptus), dráždí pokožku a vyvolávají pocit tepla, zvyšují chuť k jídlu (využití jako koření – kmín, koriandr, rozmarýn) [14].

Zázvor lékařský obsahuje seskviterpeny zingiberen, zingiberol a bisabolen. Ostrou chuť způsobují netěkavé ketony gingerol, zingeron, shogaol. Silice získávaná z borovic lesních je zastoupena především α -pinenem a terpeninem. Užívá se ke zklidnění, do revmatických masť a při onemocnění dýchacího ústrojí [14].

2.3.8 Slizy

Slizy jsou polysacharidy gelovité konzistence. Díky své konzistenci jsou schopné chránit sliznice a kůži a tím zmírňovat podráždění a zánět. Navíc zvětšují objem potravy ve střevech tím, že vážou vodu, a tak mohou fungovat jako projímadla [13].

Nejvíce rozšířený je gel tzv. tragant (produkt kozince). Po chemické stránce jde o směs dvou polysacharidů – basorinu a tragakanthinu, přičemž první složka je ve vodě nerozpustná a bobtná. Mezi další rostliny, které obsahují sliz, patří například podběl léčivý, jitrocel kopinatý, plicník lékařský, listy jahodníku obecného [14].

2.3.9 Třísloviny

Třísloviny jsou tvořeny různorodou skupinou látek a jsou známé hořkou chutí a adstringentním, svíravým účinkem. Principem je tvorba nerozpustných a málo botnavých látek díky vodíkovým vazbám a vazbám iontového typu mezi polypeptidickými řetězci bílkovin a kyselými fenolickými skupinami tříslovin [14].

Po chemické stránce jde o bezdusíkaté vysokomolekulární polyfenoly. Sráží se s bílkovinami, těžkými kovy a alkaloidy – používají se jako protilátky při otravách. Používají se dále při onemocnění zažívacího traktu, chrání před podrážděním a současně zmírňují zánět, zastavují krvácení [13, 14].

Nejznámější je tanin, což je směs esterů glukosy a kyseliny gallové anebo galloylgallové [14].

2.3.10 Další složky

Tuky a oleje zahrnují triacylglyceroly, fosfolipidy, vosky, vitaminy a steroly. Nacházejí se ve všech částech rostliny, ve zvýšeném množství vykonávají v plodech a semenech zásobní funkci. **Z organických kyselin** obsažených v rostlinách jde především o kyseliny citrónovou, jablečnou, šťavelovou, vinnou. Jejich účinek je projímavý. **Fytoncidy** jsou antiseptika rostlinného původu (antibiotika rostlin) [14].

2.4 Charakterizace použitých bylin

2.4.1 Máta peprná (*Mentha piperita*)

Máta povzbuzuje organismus, posiluje nervovou soustavu a má vliv na libido. Hlavní složka menthol snižuje citlivost a ochlazuje, odstraňuje zápach z úst. Zlepšuje chuť k jídlu, trávení, funkci žlučníku. Zastavuje zvracení a zmírňuje křeče, plynatost a různé střevní choroby. Mezi účinné látky patří menthol (50-60 %), menthon (20 %) a piperiton, menthylacetát (10 %), menthofuran (2-3 %), α -pinen, felandren a limonen, cineol, jasmon, acetaldehyd, isovaleraldehyd, kyseliny octová a valerová a další [14, 19].

2.4.2 Mateřídouška úzkolistá (*Thymus serpyllum*)

Mateřídouška posiluje organismus při únavě, nervových chorobách, depresi a epilepsii; má antiseptické účinky. Pomáhá při léčení kašle, a to i při chronických projevech. Uleví při bolestivé menstruaci a žaludečních a břišních křečích. Stejně jako máta bojuje proti zápachu z úst, omezuje nadýmání. Uvádí se, že odvar z mateřídoušky pomáhá při odvykání kouření a při kocovině. Účinné látky jsou třísloviny, hořké látky, silice (např. thymol), hořké látky [19, 20, 21].

2.4.3 Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)

Tato bylina se vyznačuje příjemnou citrónovou vůní a chutí po medu. Meduňka je známá a oblíbená pro schopnost uklidňovat, je to výborný lék proti nespavosti, přispívá ke klidnému spánku. Uklidňuje i

orgány stresem zasažené – srdce, dýchání, zažívání; uvolňuje křeče. Používá se při nachlazení, plynatosti, zvracení v těhotenství. Účinné látky jsou třísloviny, hořké látky, silice (citral, citronelal a geraniol) [14, 19, 21].

2.4.4 Rybíz černý (*Ribis negri*)

Uplatňuje se při mnoha obtížích. Používá se při nachlazení, problémech s močovými cestami (diuretikum), stejně tak i při revmatismu i léčbě dny. Mezi účinné složky patří vitamin C, flavonoidy kempferol, kvercetin a myricetin, resveratrol, katechinové třísloviny. V čerstvých listech jsou v malé míře obsaženy silice (geraniol, karyofylen, linalool). Dále můžeme v rybízu najít aminokyseliny glutamin a asparagin [21, 22, 23].

2.4.5 Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

Šalvěj má výrazné antibakteriální vlastnosti, užívané především při léčbě dutiny ústní (dásně, mandle, nosohltan). Šalvěj je známá schopností snižovat nadměrné pocení. Dále má schopnost uvolňovat křeče, snižovat tvorbu mateřského mléka. Zlepšuje též krevní oběh. Uvádí se, že při bodnutí hmyzem přináší list šalvěje úlevu. Účinné látky jsou silice (1,5-2,5 %; borneol, salviol, kafr, β -thujon – nelze užívat dlouhodobě), třísloviny, hořké látky (pikrosalvin), estrogenní hormony a amid kyseliny nikotinové [14, 19, 24].

2.4.6 Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)

Třezalka je ceněna pro široké spektrum účinků na lidský organismus. Uklidňuje, zbavuje úzkosti, deprese, nespavosti a strachu. Zlepšuje krevní oběh a upravuje menstruaci. Má vliv na trávicí trakt; zmírňuje potíže s játry a žlučníkem, s močovými cestami, pomáhá při překyselení žaludku. Účinné látky jsou třísloviny, silice a pryskyřice, červenofialové barvivo hypericin, katechinové třísloviny, flavonové glykosidy (hyperosid, rutin, kvercitrin), provitamin A a vitamin C [19, 21, 25].

2.4.7 Citrónová tráva (*Cymbopogon citratus*)

Mezi hlavní účinky citrónové trávy patří schopnost uklidnit podrážděný žaludek, upravit zažívání a nervové obtíže. Užívá se také při nachlazení, snižuje horečku. Studuje se její antifungicidní účinek, rostlina umí potlačit růst plísní a používá se při různých mykózách. Dokáže snížit hladinu cholesterolu v krvi. Citrónová tráva dodává energii, osvěžuje a bojuje proti stresu. Mezi účinné látky patří těkavé oleje citral (okolo 70 %) a citronella (funkce insekticidu). V silicích jsou přítomny limonen, geraniol, myrcen, linalol [26, 27, 28, 29].

2.4.8 Ženšen pravý (*Panax ginseng*)

Ženšen patří mezi tonizující rostliny (adaptogeny). Nejde přímo o léčivé byliny; mají ovšem také příznivý vliv. Posilují a povzbuzují organismus. Ženšen patří mezi antioxidanty, podporuje imunitu, paměť, bojuje proti stresu. Je to geriatrikum (zpomaluje stárnutí), zvyšuje odolnosti proti infekci. Hlavní účinnou složkou jsou glykosidy, tzv. ginsenosidy. Jde např. o panaxin (stimulace nervového systému), kyselinu panaxovou (srdce), panaquilon (stimulace endokrinní sekrece). Dále obsahuje aminokyseliny, vitaminy a minerály [14].

2.5 Analyzované aktivní látky

2.5.1 Fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny tvoří širokou skupinu aktivních látek, které se vyskytují v rostlinách. Jsou předmětem mnoha analýz; studuje se jejich zdravotní účinek při léčení mnoha obtíží a chorob.

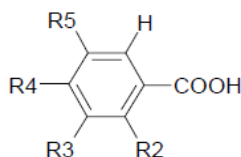
Mezi nejrozšířenější zástupce patří polyfenoly, zahrnující skupinu fenolových kyselin, flavonoidů, lignanů, hydrolyzovatelných taninů, stilbenů. Mezi hlavní zdroje patří např. čaj; obsah polyfenolů je vysoký i v pивě (přibližně $350 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) [16, 30].

2.5.1.1 Polyfenoly

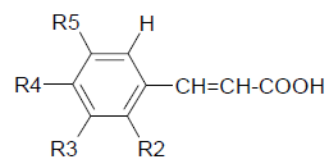
Polyfenoly jsou přírodní látky, sekundární metabolity rostlin, tvořeny širokou skupinou sloučenin. Polyfenoly piva pochází z ječmene a chmele, přičemž asi čtyři pětiny pochází ze sladu a zbytek z chmele. Polyfenoly ovlivňují stabilitu, trvanlivost i sensorické vlastnosti piva. V porovnání se zahraničními pivy mají česká piva vyšší obsah polyfenolů [31].

V první řadě mají polyfenoly funkci antioxidantů, vychytávají volné kyslíkové radikály. Antioxidační schopnost je dána přítomností fenolových kyselin a flavonoidů. Dále vážou do chelátů kovy, které katalyzují oxidační reakce. Zpomalují aterosklerózu tím, že omezují oxidaci LDL. Mají antimikrobiální, protizánětlivý a údajně i antikarcinogenní účinek [1, 32].

K fenolovým kyselinám patří látky odvozené od kyseliny hydroxybenzoové (kyselina gallová, protokatechová aj.), kyseliny hydroxyskořicové (kyselina ferulová, *p*-kumarová a kávová), kyseliny chlorogenové (neochlorogenová, kryptochlorogenová) [33].



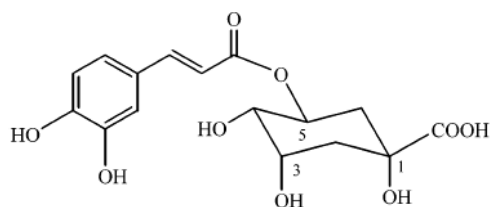
Obrázek č. 9: Deriváty kys. benzoové [33]



Obrázek č. 10: Deriváty kys. skořicové [33]

R2	R3	R4	R5	
H	H	H	H	benzoová
OH	H	H	H	salicylová
H	OH	OH	OH	gallová
H	OH	OH	H	protokatechová

R2	R3	R4	R5	
H	H	H	H	skořicová
H	H	OH	H	<i>p</i> -kumarová
H	OCH ₃	OH	H	ferulová
H	OH	OH	H	kávová



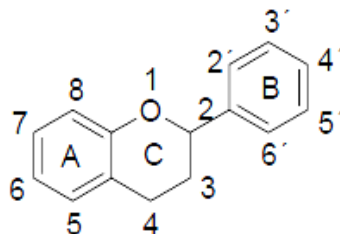
Obrázek č. 11: Kyselina chlorogenová [16]

2.5.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří nejrozsáhlejší skupinu polyfenolů. V rostlinné říši se v současné době vyskytuje více než 6 400 zástupců. Nejčastěji se vyskytují ve formě glykosidů. Bylo zjištěno, že v této formě nepodléhají účinkům polyfenoloxidas. Slovo flavonoidy pochází od výrazu flavus = žlutý. Skutečně, v rostlinách mají funkci barviv. Silně absorbují UV záření, čehož se využívá při detekci. Stejně jako

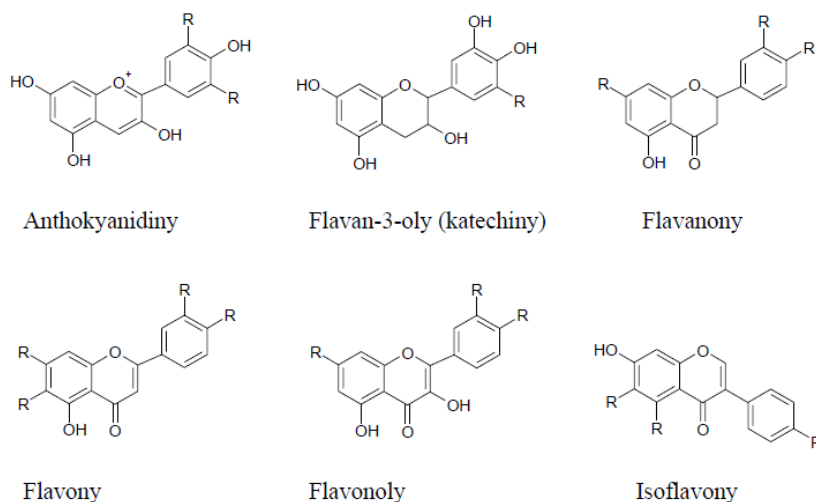
polyfenoly mají významný vliv na zdraví. Působí proti zánětům, virům, onkologickým onemocněním. Mají významný podíl na antioxidační aktivitě, protože umí vychytávat volné radikály. Druhým důvodem je schopnost tvořit cheláty a vychytávat tak ionty kovů [34, 35].

Jsou odvozeny od základního skeletu flavanu (proto se jim někdy říká flavanoidy). Podle pozice B-cyklu rozlišujeme flavonoidy, isoflavonoidy a neoflavonoidy (viz obrázek č. 6).



Obrázek č. 12: flavan neboli 2-fenylchroman [34]

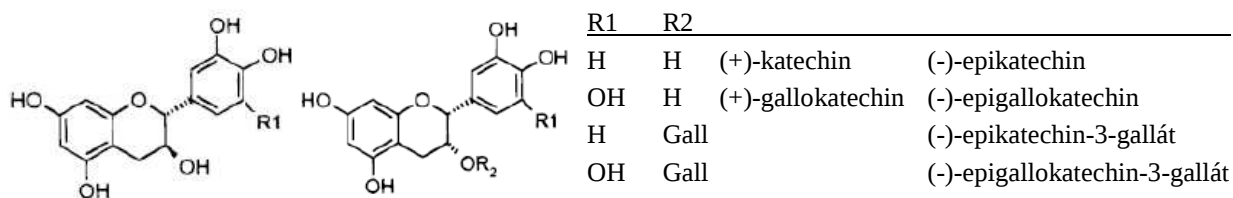
Dle stupně oxidace se dělí do šesti skupin uvedených na následujícím obrázku.



Obrázek č. 13: Dělení flavonoidů dle stupně oxidace [16]

2.5.1.3 Flavan-3-oly

V potravě tvoří asi nejrozšířenější skupinu, nalezneme je např. v ovoci a čaji. Ve volné formě jde o katechiny, v polymerní o proanthokyanidiny. Flavan-3-oly netvoří glykosidy. Katechin a epikatechin mají antioxidační aktivitu, pravděpodobně slouží také jako ochranná složka rostlin – mají i antibakteriální a antivirotickou aktivitu. Na druhou stranu jsou substrátem pro polyfenoloxidasu [34].



Obrázek č. 14: (+)-katechiny a (-)-epikatechiny [16]

2.6 Enkapsulace

Enkapsulace je proces zachycení aktivních činitelů do nosného materiálu a je to užitečný nástroj s cílem zlepšit dodávání bioaktivních molekul a živých buněk do potravin [36].

Během procesu dochází k vytvoření fyzické bariéry mezi náplní a okolním prostředím. Vznikají malé kapsle, které postupně po malých dávkách uvolňují obsah. Produkované částice mívají rozměry v řádu milimetrů až nanometrů. Metoda umožňuje zvýšit stabilitu citlivých složek (vitaminy, antioxidanty, probiotika aj.), a to během zpracování i uskladnění. Enkapsulování skryje nežádoucí organoleptické vlastnosti potraviny (hořká chuť, zápach), sníží prchavost těkavých aromatických látek, zpomalí degradaci (oxidace, hydrolýza). Na druhou stranu jde o technologii finančně poněkud náročnější. Ne zcela je zajištěna stabilita vzniklých útvarů a názor spotřebitelů není vždy příznivě nakloněn [36, 37].

Obalový materiál částice musí mít schopnost vytvořit rozhraní mezi částicí a jejím prostředím, vůči částici má být inertní. Materiál musí být odbouratelný a musí podléhat bezpečnostním požadavkům kladeným EFSA. Nejvíce se používají polysacharidy, např. štěpné produkty škrobu a rostlin, z mořských řas se získává alginát a karagenan. Pomocí živočichů se získává xanthan (fermentace) a chitosan (modifikace chitinu). Dále nachází využití i lipidy a proteiny. Do skupiny využitelných lipidů patří mastné kyseliny, vosky a fosfolipidy (lecitin). Ze skupiny proteinů jsou využívány proteiny mléka [36].

2.6.1 Metody enkapsulování

Samotná enkapsulace probíhá několika různými způsoby. Většinu technologií pojí společný princip: vytvořit kapičky aktivní látky (ať už je v jakémkoliv skupenství) a následně je obklopit nosičem. K tomu se používají různé metody [37].

Jednou z metod je způsob zachytávání částic v liposomech. Liposomy jsou dutiny tvořené dvojvrstvou lipidovou membránou. Membrána je složena z fosfolipidů (lecitin) a cholesterolu. Principem zachycení je hydrofilní a hydrofobní interakce vody a fosfolipidů. Vznikají částice o velikosti 30 nm až několik mikrometrů, které se mohou následně filtrovat či extrudovat. V současné době se liposomy používají především jako nosiče léčiv na poli farmaceutickém. V potravinářském průmyslu oblast aplikace zúžena výběrem suroviny, do které mají být enkapsuláty přidány. Především v emulgovaných potravinách je snížena stabilita při uskladnění [36, 37].

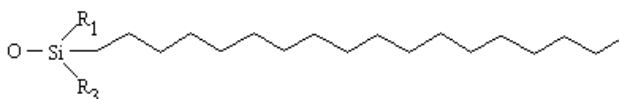
2.7 Použité metody analýzy

2.7.1 HPLC

Chromatografie je separační metoda, při které se analyzované vzorky rozdělují mezi stacionární a mobilní vzájemně nemísitelné fáze. V případě kapalinové chromatografie jde o kapalnou mobilní fázi [38].

V této práci je použita metoda HPLC s reverzní stacionární fází. Uplatňuje se při analýze nepolárních a slabě polárních látek. Je to nejvyužívanější metoda pro stanovení polyfenolů [39].

Stacionární fáze je nepolárního charakteru; vytváří se např. navázáním ligandu $C_{18}H_{37}$ - na silikagel. Použitý ligand ovlivňuje selektivitu [39].

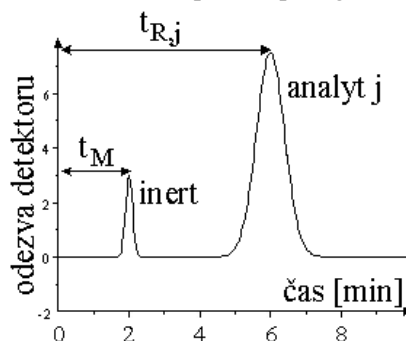


Obrázek č. 15: Chemická vázaná nepolární stacionární fáze typu C18 [38]

Eluce probíhá pomocí polárních mobilních fází jako je voda, methanol, acetonitril, dioxan. Úprava retenčních časů se provádí změnou pH (okyselení vede ke zvýšení retence slabě kyselých látek) [39].

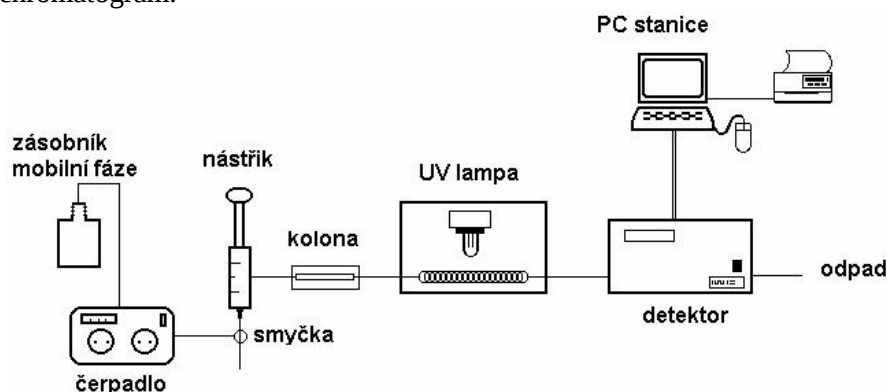
Analyzované látky lze rozlišit na základě retenčních časů t_R . Je to doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima píku. Každá chromatografická kolona je charakterizována mrtvým časem t_M , což je čas inertní složky, která není poutána ke stacionární fázi a vychází zároveň s mobilní fází. Rozdíl těchto časů je redukovaný retenční čas t'_R . Vyjadřuje dobu, kterou analyt stráví ve stacionární fázi [38].

Retenční čas je tedy kvalitativní charakteristika, plocha píků je kvantitativní charakteristika.



Obrázek č. 16: Retenční časy analytů [38]

Celý chromatografický systém je uveden na následujícím schématu (obrázek č. 17). Úvodní částí tvoří zásobník mobilní fáze, degasér a vysokotlaké čerpadlo - pumpa. Mobilní fáze dále pokračuje do smyčky, kde je nastřikován vzorek. Celá směs pokračuje na chromatografickou kolonu, kde se látky od sebe separují na základě afinity ke stacionární fázi. Ochrana kolony je zajištěna předkolonou. Eluát prochází přes měrnou celu detektoru a signál je přednášen do počítače a vyhodnocován softwarem. Výsledkem je chromatogram.



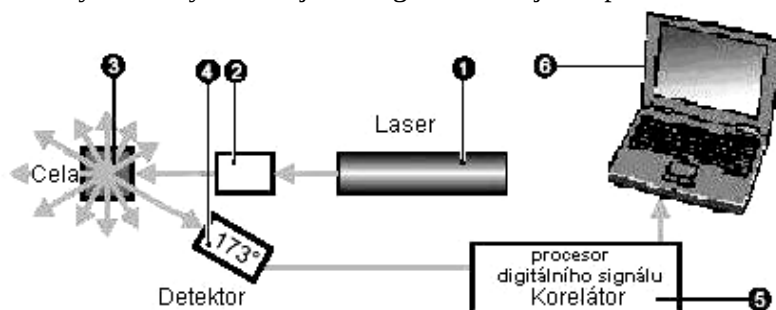
Obrázek č. 17: Schéma HPLC [40]

Existuje několik typů detektorů pro stanovení obsahu analytů. Jde o optické, hmotnostní, refraktometrické, voltametrické detektory aj. Mezi optické detektory patří i fluorimetický detektor a detektor s diodovým polem. V případě HPLC/UV-VIS se detekce provádí měřením absorpce při dané vlnové délce. Zdrojem záření pro VIS je halogenová žárovka, pro UV žárovka deuteriová [39].

2.7.2 DLS

„Dynamic light scattering“ (dynamický rozptyl světla) je metoda, která umožňuje měřit rozměry částic mikrod disperzních systémů. Principem je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty [41]. Částice vykonávají Brownův pohyb. Tento pohyb v kapalině je způsoben náhodnými srážkami s okolními částicemi. Tím, že se částice pohybují, intenzita rozptylu se mění, intenzita fluktuuje. Platí, že malé částice se pohybují větší rychlostí a tím pádem je i rychlejší fluktuace [41, 42, 43].

Přístroj Zetasizer Nano měří rychlost fluktuace intenzity světla, následně vypočítá distribuci velikosti dle korelační funkce, která vypovídá o míře podobnosti dvou signálů za určitý časový okamžik. Celé zařízení se skládá ze 6 součástí; 1 – laser jako zdroj záření, 2 – zeslabovač na případné zeslabení, resp. zesílení záření, 3 – měrná cela pro vzorek, 4 – detektor pro zjištění intenzity rozptylu. Signál intenzity z detektoru je převáděn na digitální signál pomocí 5 – korelátoru. Toto zařízení porovnává rychlost změny intenzity následujících signálů. Data jsou zpracována v 6 – počítači [43].



Obrázek č. 18: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS – měření velikosti částic [42]

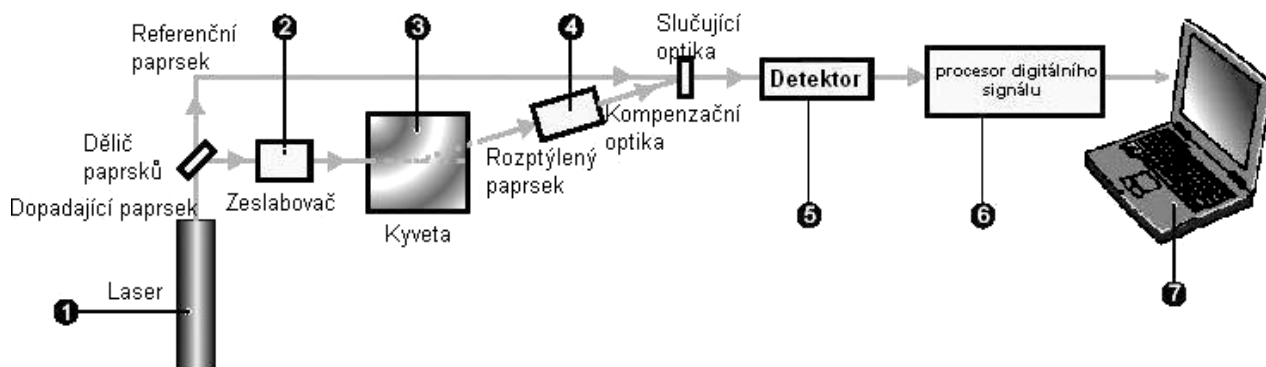
2.7.3 Zeta potenciál

Okolo každé částice existuje elektrická dvojvrstva tvořena ionty opačného náboje. Tyto ionty jsou uspořádány do dvou vrstev. V první tzv. Sternově vrstvě jsou vázány silně, v druhé difúzní slaběji. Při pohybu částice se pohybuje i vnitřní vrstva difúzní části, kdežto vnější vrstva je vůči částici nehybná. Hranice se nazývá rovina skluzu a potenciál této hranice se nazývá zeta potenciál [43].

Pokud mají částice velký zeta potenciál – ať záporný nebo kladný, vzájemně se odpuzují, k agregaci nedojde a systém je stabilní. Oblast stability se nachází mimo interval 30 až -30 mV [42].

Zeta potenciál se zjišťuje pomocí elektroforetické pohyblivosti a Henryovy rovnice, která dává do vztahu elektroforetickou pohyblivost a potenciál zeta. Elektroforetická pohyblivost se stanoví elektroforézou a změřením rychlosti částic pomocí laserové Dopplerovy velocimetrie (Laser Doppler Velocimetry - LDV). Do cely s analyzovaným vzorkem jsou vloženy dvě elektrody. Fluktuace intenzity je pak úměrná rychlosti částic, kterou se pohybují k elektrodám [42].

Uspořádání přístroje se skládá ze 7 prvků: 1 – laser, jehož paprsek je členěn na dva svazky: referenční a dopadající na měrnou celu, 2 – zesilovač, 3 – kyveta, 4 – kompenzační technika (úprava rozptýleného paprsku), 5 – detektor, 6 – digitální procesor signálu, 7 – počítač se software [43].



Obrázek č. 19: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS – měření zeta potenciálu [42]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo připravit a charakterizovat bylinné extrakty a následně je využít jako příchutě pro vybraná nealkoholická piva.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Rešerše ke studované problematice – přehled dostupných nealkoholických piv s bylinnou složkou
2. Charakterizace přídavné složky a jejích aktivních látek,
3. Příprava a analytická charakterizace bylinných extraktů přidávaných do nealkoholického piva,
4. Enkapsulace vybraných bylinných extraktů,
4. Senzorická analýza finálních vzorků ochuceného piva.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

4.1.1 Standardní chemikálie

Kyselina gallová, gallic acid, Sigma-Aldrich (SRN)

Katechin, (+)-Catechin hydrate, minimum 98 %, Sigma-Aldrich, (SRN)

Trolox standard (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina), Sigma (SRN)

4.1.2 Ostatní chemikálie

Zkoumadlo Folin-Ciocalteuovo, Penta Chrudim (ČR)

Dusitan sodný p. a., Lach-Ner (ČR)

Hydroxid sodný p. a., mikroporly, Lach-Ner (ČR)

Uhličitan sodný, ReagentPlus™, ≥99,0 %, Sigma-Aldrich (SRN)

Hexahydrát chloridu hlinitého p. a., Lach-Ner (ČR)

Kyselina chlorovodíková 35 %, Lach-Ner (ČR)

Kyselina octová 99,8 % p. a., Lach-Ner (ČR)

2,2,4-trimethylpentan (isooktan), Sigma-Aldrich (SRN)

Aceton p. a., Lach-Ner (ČR)

Ethyl-acetát p.a., Lach-Ner (ČR)

Etylalkohol pro UV spectroscopy 99,8 %. Lach-Ner (ČR)

Methanol HPLC Super Gradient, Lach-Ner (ČR)

Methanol for UV spectroscopy, Lach-Ner (ČR)

Peroxodisíran draselný p. a., Mach chemikálie (ČR)

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS purum >99,0 %, Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.3 Přístroje a pomůcky

Předvážky Kern 440-33, Kern & Sohn GmbH (SRN)

Analytické váhy Boeco Germany (SRN)

Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios δ (UK)

Spektrofotometr Unicam Helios α (UK)

Třepačka Yellowline RS 10 basic (SR)

Vortex Techno Kartell TK3S (AUS)

pH metr Eutech Instruments WP pH Tester 30 (NED)

Ultrazvuk PS02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L Powersonic (SR)

Membránový extrudér Avestin, membrána 100 nm (SRN)

Soustava HPLC:

pumpa Enom Beta Gradient Pump (ČR)

termostat Ecom Column oven LCO 102 (ČR)

kolona Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6x150 mm, zrnění 5-Micron (USA)

detektor Ecom LCD 2084 (ČR)

Vakuová odparka Ika labortechnik HB4 basic (SRN)

Vodní lázeň Kavalier EL-20D (ČR)

Koloidní analyzátor Malvern Zetasizer Nano ZS (UK)

Stříkačkové filtry Biotechlab Simplepure NY 0,4 μm; 5 μm (BGR)

Mikropipety HTL Discovery Autoclavable (SRN), Biohit Proline (FIN)

4.2 Analyzované vzorky

4.2.1 Pivo

Pro analýzu byly vybrány 3 vzorky nealkoholického piva, každé baleno ve skle.

Bernard Free s čistou hlavou, Rodinný pivovar BERNARD a. s., 5. května 1, 396 01 Humpolec
obsah alkoholu max. 0,5 % obj., minimální trvanlivost do 5. 3. 2012

Lobkowicz Premium Nealko, Pivovar Protivín

obsah alkoholu max. 0,49 % obj., minimální trvanlivost do 23. 5. 2012

Staropramen Nealko, Pivovary Staropramen a. s., Nádražní 84, 150 54 Praha 5

obsah alkoholu max. 0,5 % obj., minimální trvanlivost do 19. 6. 2012

Tato nealkoholická piva jsou vyráběna metodou řízené fermentace.

4.2.2 Byliny

Pro práci bylo vybráno 8 druhů sušených bylin, každé baleny v papírovém sáčku.

Iva Hauerová, Tišnovská 1448/71, Brno:

Máta peprná nať, Herba menthae piperine, minimální trvanlivost do 6. 2. 2014

Mateřídouška nať, Herba serpylli, minimální trvanlivost do 6. 2. 2014

Meduňka nať, Herba melissae, minimální trvanlivost do 6. 2. 2014

Rybíz černý list, Folium ribis nigri, minimální trvanlivost do 23. 1. 2014

Šalvěj nať, Herba salviae, minimální trvanlivost do 6. 2. 2014

Třezalka nať, Herba hyperici, minimální trvanlivost do 25. 1. 2014

Gřešík Valdemar – Natura s. r. o., Děčín:

Lemongrass, Herba cymbopogoni species, minimální trvanlivost do 10. 10. 2013

Ženšen kořen, Radix ginseng, minimální trvanlivost do 5. 1. 2014

4.2.3 Melasa

Vzorky byly slazený melasou.

Bio třtinová melasa Blackstrap, Health Link s. r. o., Olomouc, minimální trvanlivost do 25. 11. 2013

4.3 Příprava extraktů

Sušené byliny byly naváženy a zality vroucí vodou. Louhování probíhalo 10 minut.

4.4 Skupinové charakteristiky

4.4.1 Stanovení celkových polyfenolů

Do zkumavky bylo přidáno 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného 1:9 s vodou, 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku piva sonifikovaného 20 minut. Po promíchání a 5 minutovém stání byl přidán nasycený roztok Na_2CO_3 . Po promíchání byl roztok ponechán 15 minut, následně byla měřena absorbance při $\lambda = 750$ nm oproti slepému vzorku. Pro kalibraci byl připraven roztok kyseliny gallové o koncentraci 0,1-0,7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibrační rovnice:

$$y = 1,2921 \cdot x \quad (1)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

4.4.2 Stanovení celkových flavonoidů

Vlastní měření: Do zkumavky s 0,5 ml vzorku piva sonifikovaného 20 minut bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO_2 . Obsah byl promíchán a nechal se 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku AlCl_3 , promícháno a ponecháno 5 minut stát. Bylo přidáno 1,5 ml roztoku NaOH o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a 1 ml destilované vody, po promíchání bylo ponecháno 15 minut stát a byla změřena absorbance při $\lambda = 510 \text{ nm}$ oproti destilované vodě. Pro kalibraci byl připraven roztok katechinu o koncentraci $0,05\text{--}0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Kalibrační rovnice:

$$y = 1,4424 \cdot x \quad (2)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

4.4.3 Stanovení celkových hořkých látek

Vlastní měření: K 10 ml vzorku sonifikovaného 20 minut bylo přidáno 0,5 ml HCl o koncentraci $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 20 ml isooktanu a několik skleněných kuliček. Vzorek byl protřepáván 15 minut při 20°C a poté byla stanovena absorbance v organické vrstvě při $\lambda = 275 \text{ nm}$ oproti izooktanu.

$$\text{Jednotky hořkosti} = 50 \cdot A [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}] \quad (3)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

4.4.4 Stanovení isosloučenin

Vlastní měření: K 10 ml vzorku sonifikovaného 20 minut bylo přidáno 1 ml HCl o koncentraci $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 20 ml isooktanu a několik skleněných kuliček. Vzorek byl protřepáván 5 minut při 20°C a poté byla stanovena absorbance v organické vrstvě při $\lambda = 275 \text{ nm}$ oproti isooktanu.

$$\text{Isosloučeniny} = 57,2 \cdot A - 5,9 [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}] \quad (4)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity (roztoková metoda, Trolox)

Před vlastním měřením byl připraven radikálový kation $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Pro celkový objem 10 ml roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bylo smícháno 0,0384 g ABTS (roztok o koncentraci $7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 0,0066 g peroxodisíranu draselného (roztok o konečné koncentraci $2,45 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$); roztok byl ponechán ve tmě alespoň po 12 hodin a před použitím byl zředěn ethanolem pro UV spektroskopii na výslednou absorbanci $0,700 \pm 0,020$ při $\lambda = 734 \text{ nm}$, měřeno proti rozpouštědлу.

Vlastní měření: do zúžené kyvety byl napipetováno 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 10 μl extraktu vzorku sonifikovaného 20 minut. Pokles absorbance byl zaznamenán v 10. minutě ($A_{t=10}$). Hodnoty každého ze vzorku byly odečítány od hodnoty absorbance 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s 10 μl vody ($A_{t=0}$).

Pro kalibraci byl připraven ethanolový roztok Troloxu o koncentraci $50\text{--}400 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (60% ethanol). Naměřené hodnoty absorbance byly odečteny od absorbance 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s 10 μl 60% ethanolu ($\Delta A = A_0 - A_1$). Kalibrační rovnice:

$$y = 0,7415 \cdot x \quad (5)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

4.6 Stanovení pH

pH metr byl spuštěn a ponořen do destilované vody. Po automatické kalibraci a ustálení hodnot byl ponořen do vzorku čistého piva i směsi piva a byliny a byla zaznamenána hodnota pH.

4.7 Stanovení katechinů pomocí HPLC/UV-VIS

5 standardů ze skupiny katechinů a fenolových kyselin (katechin a epikatechin, kyselina gallová, kyselina ferulová, kyselina chlorogenová) bylo rozpuštěno v mobilní fázi, přefiltrováno přes jednorázový filtr a převedeno do mikrocentrifugační zkumavky.

K chromatografické analýze katechinů byla použita sestava HPLC od firmy ECOM spol. s r.o. Ke zpracování analytických dat a chromatogramů byl použit chromatografický software Clarity.

4.7.1 Podmínky analýzy

Analýza obsahu katechinů probíhala za isokratických podmínek. Průtok mobilní fáze byl zvolen $0,75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ při teplotě 30°C na nerezové koloně C18 s předřazenou předkolonou, s fotometrickou detekcí při vlnové délce odpovídající maximu absorpce příslušné analyzované látky ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Vzorek byl na kolonu dávkován ventilem s dávkovací smyčkou o objemu $20 \mu\text{l}$. Jako mobilní fáze byl použit methanol: 1% kyselina octová v poměru 25:75.

Provedeno bylo jedno měření pro screening; množství jednotlivých katechinů bylo stanoveno pomocí odečtení ploch píků a kvantifikace pomocí externí kalibrace metodou kalibrační křivky.

4.7.2 Optimalizace úpravy vzorku

Vhodná úprava vzorku je důležitá jednak z hlediska získání námi sledovaných látek, tak i z hlediska správné účinnosti separace v chromatografické koloně.

V práci byly provedeny následující optimalizace úpravy vzorku. K analýze metodou HPLC byl nanesen neupravený vzorek, vzorek po kyselé hydrolýze, vzorek po extrakci do rozpouštědla a vzorek po hydrolýze i extrakci.

Hydrolýza byla prováděna v roztoku s kyselinou chlorovodíkovou (koncentrace $1,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v poměru 1:1. Směs byla zahřívána ve vodní lázni a po ochlazení a přefiltrování přes jednorázový filtr byl proveden nástřik. Extrakce byla provedena do ethylacetátu a extrakt po odpaření rozpouštědla byl rozpuštěn v 5 ml methanolu pro UV spektroskopii. Poté byl proveden nástřik do dávkovacího ventilu.

V případě kombinace hydrolýzy a extrakce byl podroben extrakci vzorek po hydrolýze.

4.8 Enkapsulace vybraných bylinných extraktů

Enkapsulace probíhala metodou balení částic do liposomů, jako obalový materiál byl zvolen lecitin izolovaný z vaječných žloutků.

Jeho izolace probíhala tak, že byl žloutek rozmíchán v 25 ml acetonu a po 10minutovém odstání byl přefiltrován, znovu rozmíchán se stejným množstvím acetonu a opět přefiltrován. Zbytek na filtru byl rozmíchán s 15 ml ethanolu, přefiltrován, koláč byl znovu rozmíchán a přefiltrován. Oba filtráty byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na odparce. Pevný podíl byl poté rozmíchán v 10 ml ethanolu. Ethanolový roztok lecitinu byl dávkován v koncentraci 0,5 % obj. (výsledná koncentrace).

Dvě vybrané příchutě (máta a mateřídouška) byly enkapsulovány a přefiltrovány přes filtr o velikosti 5000 nm . Následně byla proměřena jejich velikost a stabilita pomocí přístroje a software značky Zetasizer. Velikost částic byla upravena pomocí liposomátoru s membránou o velikosti 100 nm

a opět byla stanovena jejich velikost a zeta potenciál. Velikost i stabilita byly zjišťovány jak u bylinek čistých, tak ve směsi s pivem.

4.9 Senzorická analýza

Senzorické analýzy se zúčastnilo celkem 20 osob z řad vysokoškolských studentů. Hodnocení probíhalo 4. dubna 2012. V příloze č. 15 je uveden vzorový dotazník.

Senzoricky hodnoceny byly tři nealkoholická piva jednak čistá, jednak s bylinnou příchutí, popř. doslazená. Každému hodnotiteli byl předkládán vzorek o objemu 30 ml, názvy bylinných příchutí nebyly zveřejněny. Piva se hodnotila s použitím ordinálních stupnic (vůně, hořkost, sladkost), hodnocení bylo doplněno pořadovou zkouškou.

V druhé části analýzy byla prováděna párová zkouška. U každého piva byly předloženy 2 vybrané bylinné příchutě, a to ve formě extraktu a jako enkapsulovaný preparát. Hodnotitel měl stanovit rozdíl mezi oběma vzorky.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V práci byly řešeny možnosti ochucování nealkoholických piv bylinným extrakty. V čistých pivech, v bylinných extraktech a ve směsích byly stanoveny vybrané skupinové charakteristiky, antioxidační aktivita, hodnota pH, obsah katechinů. Dvě bylinné příchutě byly enkapsulovány a přidány do piva. Byla změřena velikost a stabilita vzniklých liposomů. Každá z ochucených variant piv byla podrobena senzorické analýze. V následující části jsou zhodnoceny výsledky a rozdíly piv před ochucením a po ochucení bylinnou složkou.

5.1 Složení ochucených piv

Každá bylina byla zvolena jako samostatná příchut', až na kombinaci citrónová tráva a ženšen, která se přidávala do piva ve směsi. Jako úvodní koncentrace byly připraveny vodné extrakty v poměru 10 g byliny na 100 ml vroucí vody, u ženšenu 3 g na 100 ml. Pomocí několika dílčích senzorických zkoušek byla optimalizována koncentrace bylinných extraktů. Pro vylepšení výsledné celkové chuti byly některé příchutě přislazeny. V maloobchodě se nepodařilo sehnat původně zamýšlený glukoso-fruktozový sirup, proto se jako alternativní přírodní sladidlo zvolila melasa.

Tabulka č. 2: Konečné dávkování

	bylina → voda	extrakt → pivo	bylina v ochuceném pívě
	dávkování (g·100 ml ⁻¹)	dávkování (ml·100 ml ⁻¹)	c (mg·100 ml ⁻¹)
máta	1,00	5,00	47,62
mateřídouška	0,50	2,50	12,20
meduňka	1,00	2,50	24,39
rybíz	1,00	6,67	62,53
šalvěj	1,25	2,50	30,49
třezalka	2,50	7,50	174,42
citrónová tráva	1,00	2,50	24,27
ženšen	0,15	0,50	0,73

Tabulka č. 3: Dávkování melasy (na 100 ml piva nebo 100 ml směsi piva s extraktem)

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen
	dávkování (g·100 ml ⁻¹)	dávkování (g·100 ml ⁻¹)	dávkování (g·100 ml ⁻¹)
máta	-	0,125	-
mateřídouška	-	-	-
meduňka	-	0,083	-
rybíz	0,075	0,125	0,075
šalvěj	-	0,125	-
třezalka	-	0,050	0,050
citr. tráva a ženšen	-	0,125	-

5.2 Skupinové charakteristiky

5.2.1 Stanovení celkových polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Toto činidlo je směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny a reakcí s fenoly dává modrý produkt, vhodný pro spektrofotometrické stanovení.

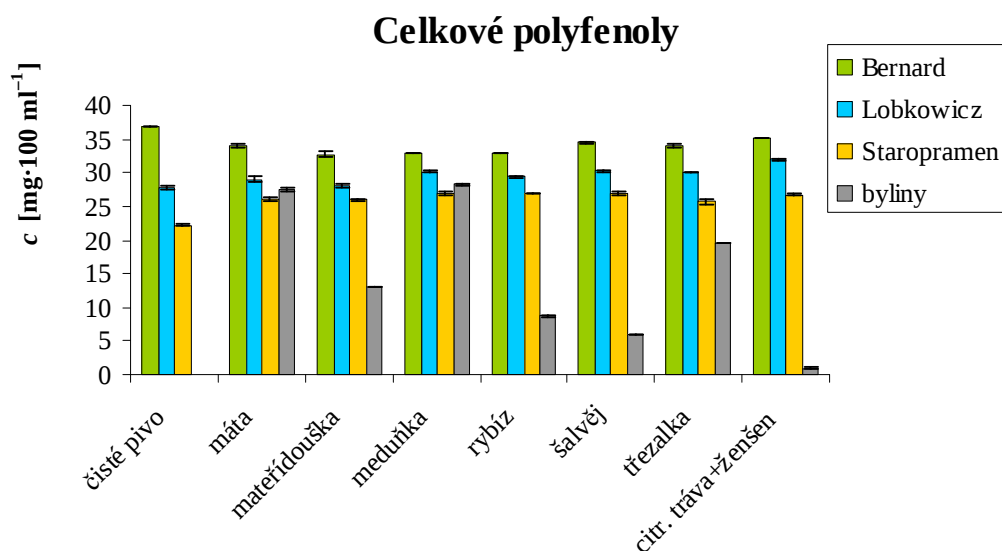
Jako standard byla použita kyselina gallová (viz kapitola č. 4.4.1).

Tabulka č. 4: Obsah celkových polyfenolů – koncentrace podle tabulky č. 2

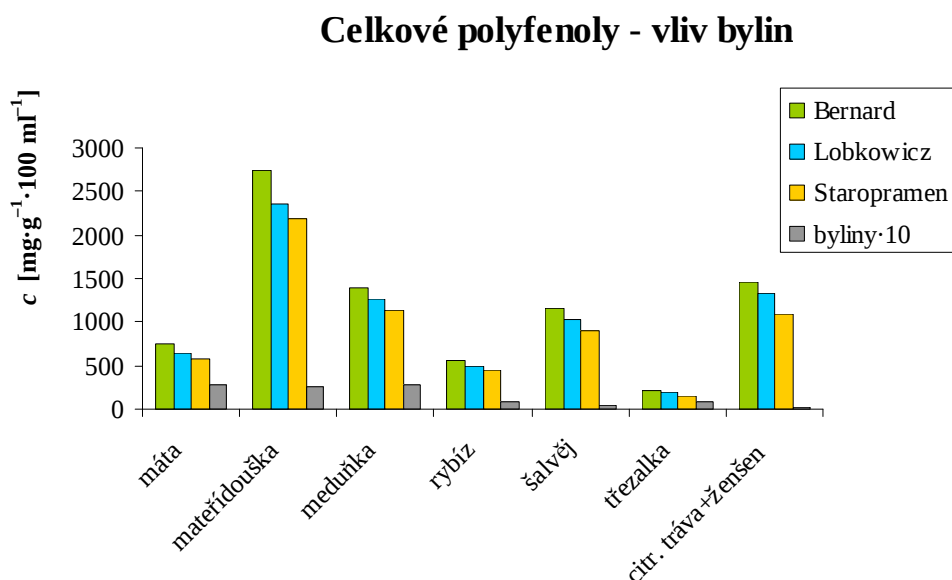
	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	c [mg·100 ml ⁻¹]	c [mg·100 ml ⁻¹]	c [mg·100 ml ⁻¹]	c [mg·100 ml ⁻¹]
čisté pivo	36,88 ± 0,04	27,86 ± 0,31	22,19 ± 0,13	-
máta	34,05 ± 0,31	29,06 ± 0,35	26,11 ± 0,18	27,44 ± 0,27
mateřídouška	32,74 ± 0,44	28,09 ± 0,15	26,00 ± 0,23	12,92 ± 0,00
meduňka	32,93 ± 0,04	30,14 ± 0,12	26,97 ± 0,19	28,25 ± 0,23
rybíz	32,85 ± 0,04	29,41 ± 0,08	26,86 ± 0,00	8,67 ± 0,08
šalvěj	34,52 ± 0,15	30,30 ± 0,19	26,93 ± 0,32	6,00 ± 0,04
třezalka	34,09 ± 0,27	29,99 ± 0,04	25,69 ± 0,31	19,62 ± 0,04
citr. tráva a ženšen	35,18 ± 0,04	32,00 ± 0,19	26,70 ± 0,15	0,97 ± 0,04

Tabulka č. 5: Obsah celkových polyfenolů vztažený na přídavek 1 g sušené byliny do 100 ml neochuceného piva. U čistých bylin jde o přídavek 1 g sušené byliny do 100 ml vody

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	c [mg·g ⁻¹ ·100 ml ⁻¹]	c [mg·g ⁻¹ ·100 ml ⁻¹]	c [mg·g ⁻¹ ·100 ml ⁻¹]	c [mg·g ⁻¹ ·100 ml ⁻¹]
máta	750,87	640,80	575,67	27,44
mateřídouška	2751,58	2361,28	2185,65	25,85
meduňka	1383,92	1266,83	1133,48	28,25
rybíz	560,45	501,70	458,13	8,67
šalvěj	1160,48	1018,67	905,48	4,80
třezalka	210,12	184,84	158,36	7,85
citr. tráva a ženšen	1449,22	1318,49	1100,07	1,13



Graf č. 1: Obsah celkových polyfenolů – koncentrace podle tabulky č. 2



Graf č. 2: Obsah celkových polyfenolů vztahující na přidavek 1 g sušené byliny do 100 ml neochuceného piva. U čistých bylin jde o přidavek 1 g sušené byliny do 100 ml vody

Graf č. 1 vyjadřuje celkový obsah polyfenolů analyzovaných ve 100 ml vzorku čistého piva, 100 ml bylinného extraktu a 100 ml směsi piva a bylinného extraktu (použité koncentrace viz tabulka č. 2). Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích piv se pohyboval mezi 22,19 až 36,88 mg·100 ml⁻¹. Ze tří analyzovaných značek piv měl nejvyšší obsah polyfenolů vzorek piva Bernard.

U značky Bernard došlo přidavkem bylin ke snížení obsahu polyfenolů. U ostatních dvou značek došlo vždy k nárůstu; u značky Lobkowicz nejvíce v případě příchutě citrónová tráva a ženšen, u Staropramenu v případě meduňky a šalvěje.

V grafu č. 2 jsou vyjádřeny účinky ekvivalentních dávek bylin. Hodnoty byly zjištěny početně. Nejprve byl vyjádřen obsah sušené byliny v objemu vzorku (100 ml). Výsledky příslušných směsí uvedených v tabulce č. 4 byly poděleny obsahem sušené byliny vztahované na celý objem vzorku; tím byl vyjádřen obsah polyfenolů v jednotkové dávce sušené byliny. Následně byl zjištěn objem původního piva v objemu celého ochuceného vzorku a obsah polyfenolů byl vztahován na 100 ml

neochuceného piva. Výsledkem je tedy poměrný obsah polyfenolů ve vzorku obsahujícím 1 g sušené byliny ve 100 ml neochuceného piva.

Pokud srovnáme účinek bylin, jak je patrné z tabulky č. 5 a grafu č. 2, nejsilnější účinek má především mateřídouška, pak následuje meduňka a citrónová tráva s ženšenem. Nejvíce polyfenolů obsahuje máta, mateřídouška a meduňka.

5.2.2 Stanovení celkových flavonoidů

Analýza obsahu celkových flavonoidů byla provedena spektrofotometrickou metodou. V alkalických podmínkách vznikl červeně zbarvený chelát, kde centrálním atomem byl hliník a ligandem flavon [34].

Jako standard byl použit katechin (viz metoda uvedená v kapitole 4.4.2).

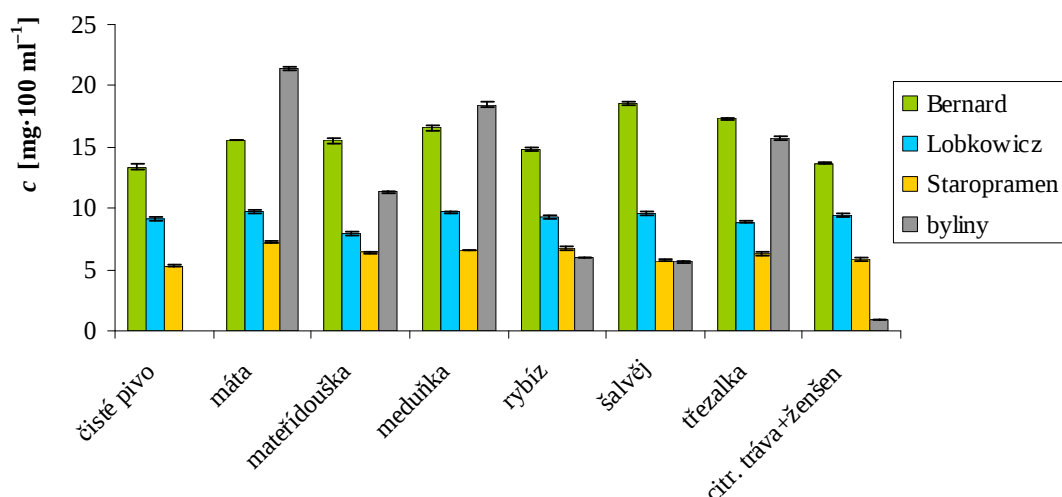
Tabulka č. 6: Obsah celkových flavonoidů – koncentrace podle tabulky č. 2

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	$c \text{ [mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$
čisté pivo	$13,36 \pm 0,26$	$9,15 \pm 0,20$	$5,29 \pm 0,12$	-
máta	$15,56 \pm 0,03$	$9,75 \pm 0,16$	$7,24 \pm 0,10$	$21,35 \pm 0,14$
mateřídouška	$15,50 \pm 0,17$	$7,88 \pm 0,16$	$6,38 \pm 0,10$	$11,37 \pm 0,07$
meduňka	$16,57 \pm 0,23$	$9,66 \pm 0,09$	$6,52 \pm 0,00$	$18,46 \pm 0,21$
rybíz	$14,84 \pm 0,15$	$9,24 \pm 0,12$	$6,70 \pm 0,13$	$6,00 \pm 0,03$
šalvěj	$18,58 \pm 0,15$	$9,59 \pm 0,12$	$5,75 \pm 0,11$	$5,66 \pm 0,07$
třezalka	$17,30 \pm 0,10$	$8,90 \pm 0,03$	$6,33 \pm 0,13$	$15,71 \pm 0,12$
citr. tráva a ženšen	$13,69 \pm 0,10$	$9,45 \pm 0,16$	$5,78 \pm 0,14$	$0,90 \pm 0,06$

Tabulka č. 7: Obsah celkových flavonoidů vztažený na přídavek 1 g sušené byliny do 100 ml neochuceného piva. U čistých bylin jde o přídavek 1 g sušené byliny do 100 ml vody

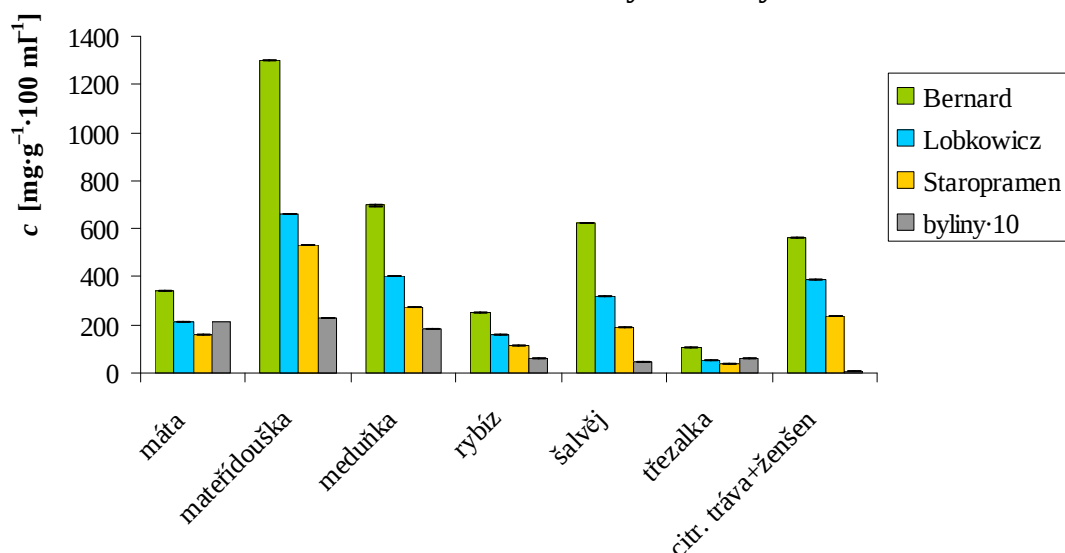
	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	c $[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$	c $[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$	c $[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$	c $[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$
máta	215,04	343,19	159,75	21,35
mateřídouška	662,35	1302,36	536,09	22,74
meduňka	405,95	696,34	273,87	18,46
rybíz	157,69	253,10	114,33	6,00
šalvěj	322,43	624,66	193,46	4,53
třezalka	54,84	106,61	39,03	6,29
citr. tráva a ženšen	389,42	564,13	238,03	1,05

Celkové flavonoidy



Graf č. 3: Obsah celkových flavonoidů – koncentrace podle tabulky č. 2

Celkové flavonoidy - vliv bylin



Graf č. 4: Obsah celkových flavonoidů vztahující na přírůvek 1 g sušené byliny do 100 ml neochuceného piva. U čistých bylin jde o přírůvek 1 g sušené byliny do 100 ml vody

V tabulce č. 6 a grafu č. 3 je uveden obsah analyzovaných flavonoidů ve 100 ml vzorku čistého piva, 100 ml bylinného extraktu a 100 ml směsi piva a bylinného extraktu (použité koncentrace viz tabulka č. 2). Obsah celkových flavonoidů ve vzorcích piva byl zjištěn v rozmezí 5,29 až 18,58 $\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$, což představuje asi 25% až 50% podíl celkového obsahu polyfenolů. U čistých bylin je to hodnota větší, a to mezi 65 až 95 %. Nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn u značky Bernard, téměř poloviční hodnota byla zjištěna u značky Staropramen.

Ke snížení obsahu došlo tentokrát u značky Lobkowicz, především přírůvkem mateřídoušky. Naopak nejvyšší příspěvek měla příchuť máta, stejně jako u Staropramenu. U značky Bernard byl zjištěn nejvyšší obsah flavonoidů po přidání šalvěje.

Graf č. 4 byl proveden pro srovnání efektu přírůvku stejného množství sušených bylin na celkové flavonoidy. Vyhodnocení proběhlo početně, jak je uvedeno v kapitole 5.2.1. V porovnání účinku samotných bylin opět sledujeme maximum hodnot u mateřídoušky, meduňky a také šalvěje a

citronové trávy s ženšenem. Výrazně vyniká mateřídouška v kombinaci se značkou Bernard. V případě bylinných extraktů měly opět nejvyšší obsah flavonoidů máta, mateřídouška a meduňka.

Vyšší obsah flavonoidů i polyfenolů byl stanoven u meduňky a šalvěje.

5.2.3 Stanovení celkových hořkých látek

Celkové hořké látky byly stanoveny dle metody EBC. Množství je vyjádřeno v jednotkách hořkosti EBU, které odpovídají 1 mg hořkých látek v 1 l piva.

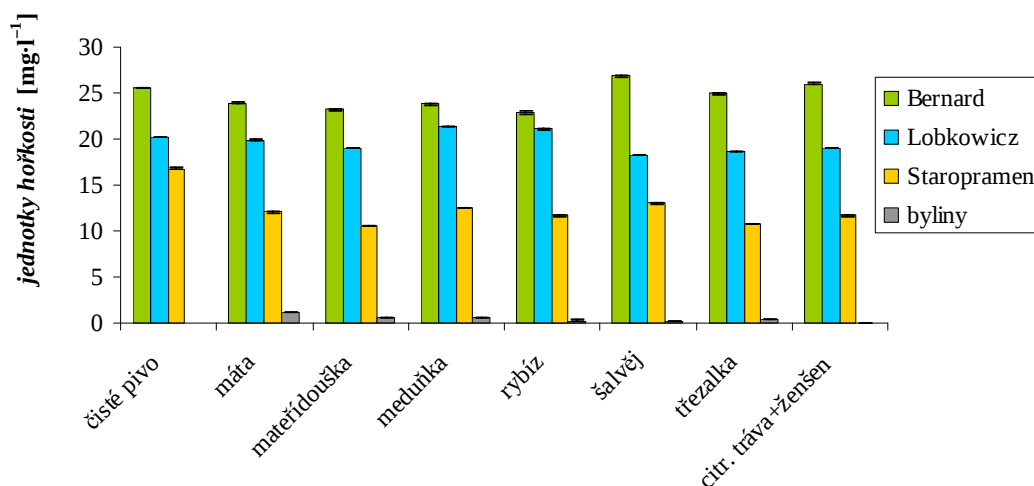
Tabulka č. 8: Obsah celkových hořkých látek – koncentrace podle tabulky č. 2

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	<i>JH [mg·l⁻¹]</i>	<i>JH [mg·l⁻¹]</i>	<i>JH [mg·l⁻¹]</i>	<i>JH [mg·l⁻¹]</i>
čisté pivo	25,60 ± 0,07	20,20 ± 0,04	16,78 ± 0,06	-
máta	23,88 ± 0,06	19,85 ± 0,11	12,05 ± 0,04	1,22 ± 0,02
mateřídouška	23,18 ± 0,06	18,98 ± 0,02	10,53 ± 0,02	0,60 ± 0,04
meduňka	23,78 ± 0,12	21,28 ± 0,02	12,48 ± 0,05	0,55 ± 0,00
rybíz	22,85 ± 0,14	21,08 ± 0,06	11,65 ± 0,04	0,28 ± 0,02
šalvěj	26,90 ± 0,08	18,33 ± 0,02	13,03 ± 0,08	0,13 ± 0,02
třezalka	24,95 ± 0,11	18,62 ± 0,02	10,75 ± 0,04	0,30 ± 0,00
citř. tráva a ženšen	26,02 ± 0,05	18,98 ± 0,02	11,70 ± 0,08	0,07 ± 0,02

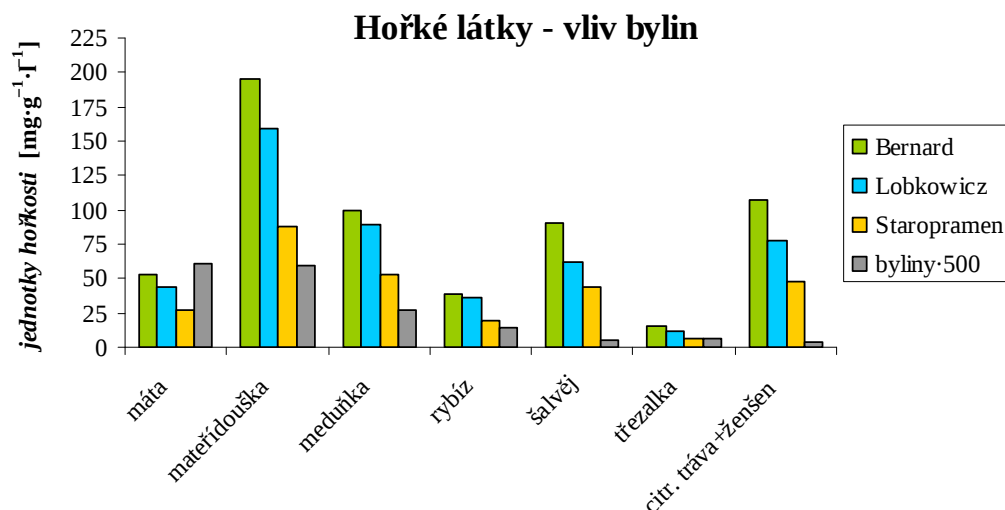
Tabulka č. 9: Obsah celkových hořkých látek vztažený na přídavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva. U čistých bylin jde o přídavek 1 g sušené byliny do 1 l vody

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	<i>JH [mg·g⁻¹·l⁻¹]</i>	<i>JH [mg·g⁻¹·l⁻¹]</i>	<i>JH [mg·g⁻¹·l⁻¹]</i>	<i>JH·500 [mg·g⁻¹·l⁻¹]</i>
máta	52,66	43,77	26,57	12,17
mateřídouška	194,86	159,55	88,53	12,00
meduňka	99,95	89,44	52,46	5,50
rybíz	38,98	35,97	19,87	2,83
šalvěj	90,44	61,64	43,82	1,07
třezalka	15,38	11,47	6,63	1,20
citř. tráva a ženšen	107,19	78,21	48,20	0,78

Hořké látky



Graf č. 5: Obsah hořkých látek – koncentrace podle tabulky č. 2



Graf č. 6: Obsah hořkých látek vztážený na přidavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva. U čistých bylin jde o přidavek 1 g sušené byliny do 1 l vody

U vzorků připravených dle tabulky č. 2 bylo stanoveno množství hořkých látek. Obsah se pohyboval v rozmezí 10,53 až 26,9 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, jak je patrné z tabulky č. 8. Nejvyšší výsledky byly detekovány opět u značky Bernard. Velmi nízké hodnoty hořkých látek byly stanoveny u bylinných extraktů, lze tedy předpokládat, že přidavek extraktu povede ke snížení hořkosti piva.

Kromě varianty Bernard-šalvěj a Lobkowicz-meduňka a Lobkowicz-rybíz lze skutečně tvrdit, že došlo ke snížení hořkosti. Šalvěj dosahovala vyšších hodnot i u značky Staropramen. Odvary z této byliny jsou oproti ostatním bylinám více hořké. Vyšší obsah hořkých látek u značky Lobkowicz bylo zjištěno s příchutí meduňka a rybíz.

Graf č. 4 byl proveden pro srovnání účinků ekvivalentních přísad bylin. Hodnoty byly stanovené početně postupem uvedeným v kapitole 5.2.1. Výsledkem je poměrný obsah hořkých látek ve vzorku obsahujícím 1 g sušené byliny v 1 l neochuceného piva.

Největší schopnost zvyšovat hořkost měly opět mateřídouška, meduňka, šalvěj a citrónová tráva s ženšenem. Při srovnání ekvivalentních koncentrací extraktů obsahovaly největší množství hořkých nejsilnějšími máta a mateřídouška.

5.2.4 Stanovení isosloučenin

Isloučeniny byly stanoveny spektrofotometrickou metodou uvedenou v kapitole č. 4.4.4. Obsah isosloučenin v neochucených pivech byl vyjádřen jako podíl hořkých kyselin, neboť z hořkých kyselin vznikají izomeraci při výrobě.

Tabulka č. 10: Obsah isosloučenin – koncentrace podle tabulky č. 2

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
čisté pivo	21,38 ± 0,19	15,95 ± 0,00	11,72 ± 0,05	nedetekovatelné
máta	19,00 ± 0,10	15,66 ± 0,08	8,32 ± 0,03	
mateřídouška	21,65 ± 0,07	12,46 ± 0,05	7,98 ± 0,03	
meduňka	22,10 ± 0,09	16,05 ± 0,03	7,81 ± 0,03	
rybíz	20,56 ± 0,03	15,09 ± 0,12	6,49 ± 0,07	
šalvěj	21,80 ± 0,12	14,43 ± 0,07	7,96 ± 0,03	
třezalka	20,35 ± 0,05	14,50 ± 0,05	6,32 ± 0,07	
citr. tráva a ženšen	21,37 ± 0,10	14,88 ± 0,05	7,54 ± 0,00	

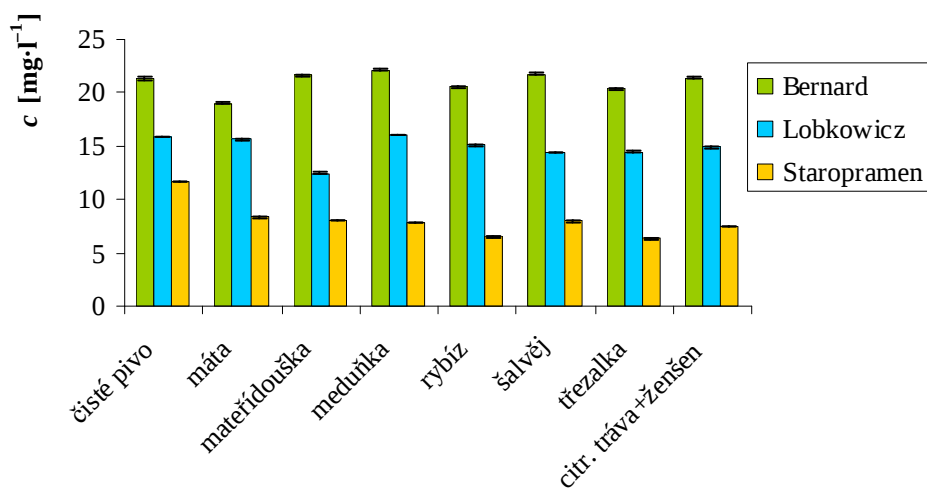
Tabulka č. 11: Zastoupení isosloučenin v hořkých látkách

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen
%	83,53	78,96	69,82

Tabulka č. 12: Obsah isosloučenin vztahovaný na přidavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva

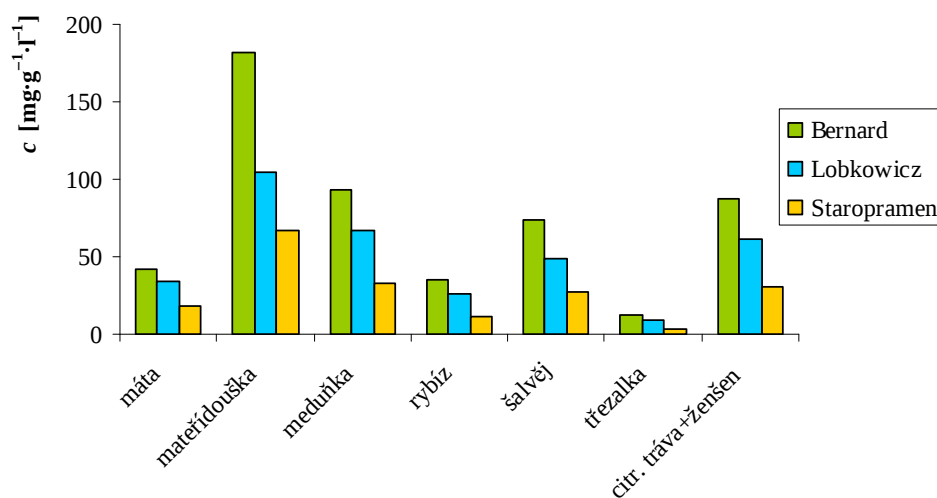
	Bernard	Lobkowicz	Staropramen
	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$
máta	41,90	34,54	18,35
mateřídouška	181,98	104,74	67,08
meduňka	92,87	67,43	32,82
rybíz	35,07	25,75	11,08
šalvěj	73,30	48,50	26,77
třezalka	12,55	8,94	3,90
citr. tráva a ženšen	88,03	61,32	31,07

Isloučeniny



Graf č. 7: Obsah isosloučenin – koncentrace podle tabulky č. 2

Isloučeniny



Graf č. 8: Obsah isosloučenin vztahovaný na přidavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva

Obsah isosloučenin ve vzorcích pív, jak je patrné z tabulky č. 10, byl stanoven v rozsahu 6,32 až 22,10 mg·l⁻¹. Ze tří značek pív byl zjištěn největší obsah isosloučenin u značky Bernard, a to necelých 84 % z celkového množství hořkých látek. Obsah isosloučenin u bylin nebyl detekovatelný, neboť isosloučeniny vznikají převážně varem ve chmelovaru. Přesto byly po ochucení zaznamenány změny. U značky Bernard došlo ke zvýšení obsahu isosloučenin přidáním mateřídoušky, meduňky a šalvěje. Přidáním meduňky došlo ke zvýšení obsahu isosloučenin taktéž u značky Lobkowicz. V ostatních případech došlo ke snížení. U značky Staropramen došlo k výraznému snížení obsahu isosloučenin, které v pivě přispívají k hořké chuti. Výsledek potvrzuje i Příloha č. 14 – výsledek senzorické zkoušky.

Vyjádřením stejných ekvivalentních dávek sušených bylin i neochuceného piva (postup viz kapitola 5.2.1) byl vyjádřen účinek bylin. Stejně jako u předchozích metod i v tomto případě byly stanoveny nejvyšší výsledky výrazně u mateřídoušky, následně meduňky a citrónové trávy a ženšenu.

5.3 Stanovení antioxidační aktivity [32]

Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky. Metoda se nazývá TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Je založena na principu úbytku zabarvení roztoku radikálu ABTS^{•+}, způsobeného redukcí tohoto radikálu. Míra odbarvení je úměrná antioxidační aktivitě vzorku.

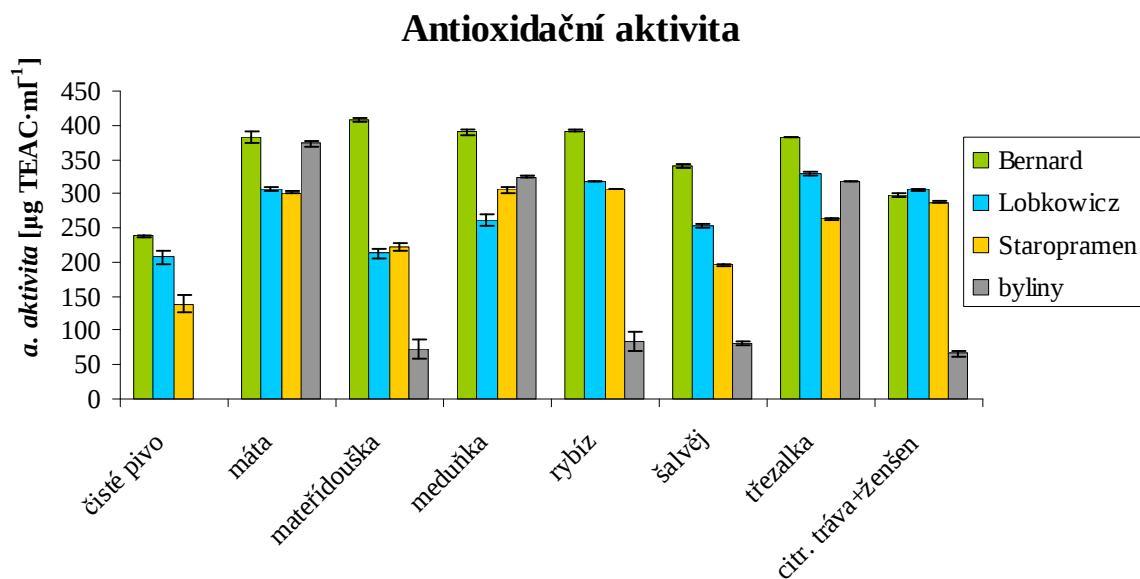
Antioxidační aktivitu v pivu způsobují přítomné fenolické a polyfenolické látky. Slabá schopnost redukce je připisována i hořkým kyselinám [44]. Vyjadřuje se v množství Troloxu, které má stejnou antioxidační aktivitu.

Tabulka č. 13: Antioxidační aktivita vyjádřena jako množství TEAC – koncentrace dle tabulky č. 2

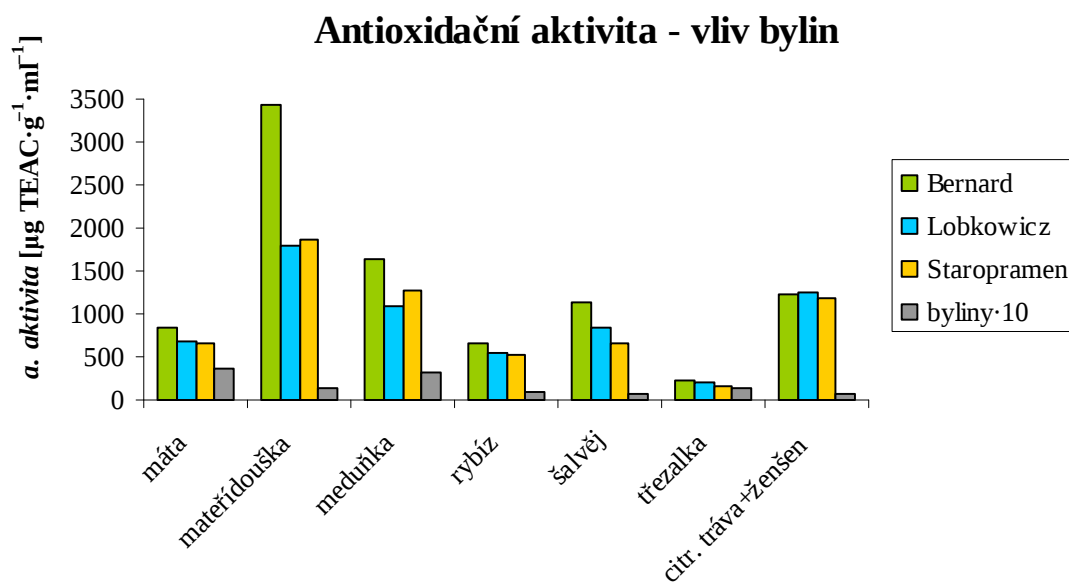
	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	c [μg TEAC·ml ⁻¹]	c [μg TEAC·ml ⁻¹]	c [μg TEAC·ml ⁻¹]	c [μg TEAC·ml ⁻¹]
čisté pivo	238,03 ± 0,67	207,01 ± 10,11	138,01 ± 12,67	-
máta	383,01 ± 8,09	306,81 ± 2,02	302,09 ± 1,10	373,57 ± 4,05
mateřídouška	407,96 ± 2,02	213,08 ± 6,74	221,17 ± 5,39	73,27 ± 14,79
meduňka	389,75 ± 4,05	260,96 ± 8,77	305,46 ± 4,72	324,34 ± 0,67
rybíz	391,77 ± 2,02	318,27 ± 0,00	306,81 ± 0,67	84,96 ± 14,83
šalvěj	341,20 ± 2,70	252,87 ± 3,37	195,55 ± 1,35	82,27 ± 2,70
třezalka	383,01 ± 0,00	329,74 ± 3,37	263,65 ± 2,02	317,60 ± 0,67
citr. tráva a ženšen	298,72 ± 2,02	306,14 ± 1,35	287,93 ± 0,67	66,53 ± 3,54

Tabulka č. 14: Antioxidační aktivita vztažená na přídavek 1 g sušené byliny do 1 ml neochuceného piva. U čistých bylin jde o přídavek 1 g sušené byliny do 1 ml vody

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	bylinný extrakt
	c [mg TEAC·g ⁻¹ ·ml ⁻¹]	c [mg TEAC·g ⁻¹ ·ml ⁻¹]	c [mg TEAC·g ⁻¹ ·ml ⁻¹]	c·10 [mg TEAC·g ⁻¹ ·ml ⁻¹]
máta	844,53	676,52	666,11	37,36
mateřídouška	3428,88	1790,95	1858,96	14,65
meduňka	1637,93	1096,67	1283,70	32,43
rybíz	668,33	542,95	523,39	8,50
šalvěj	1147,12	850,13	657,44	6,58
třezalka	236,06	203,23	162,50	12,70
citr. tráva a ženšen	1230,72	1261,28	1186,27	7,75



Graf č. 9: Antioxidační aktivita vztažená na množství TEAC – koncentrace podle tabulky č. 2



Graf č. 10: Antioxidační aktivita vztažená na přídavek 1 g sušené byliny do 1 ml neochuceného piva. U čistých bylin jde o přídavek 1 g sušené byliny do 1 ml vody

Antioxidační aktivita vzorků neochuceného piva a piva s bylinnou příchutí, připravených dle tabulky č. 2, byla detekována v rozsahu hodnot 138,01 až 407,96 $\mu\text{g TEAC}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u značky Bernard.

K největšímu přírůstku aktivity došlo u značky Bernard po přidání mateřídoušky, u značky Lobkowicz přidavkem rybízu a třezalky a v případě značky Staropramen přidavkem máty, meduňky a rybízu. Na antioxidační aktivitě se podílí velká skupina látek; dá se tedy předpokládat, že hodnoty jsou závislé na konkrétním složení každé byliny.

Vyjádřeným ekvivalentních přídavků sušených bylin do stejného objemu neochuceného piva je možné porovnat účinek bylin na antioxidační aktivitu. Vyhodnocení bylo provedeno početně, dle postupu uvedeného v kapitole 5.2.1. Nejvyšší vliv má na prvním místě mateřídouška. Dále následuje meduňka a citrónová tráva s ženšenem. Z čistých bylin v rovnocenném množství má nejsilnější antioxidační aktivitu máta a meduňka.

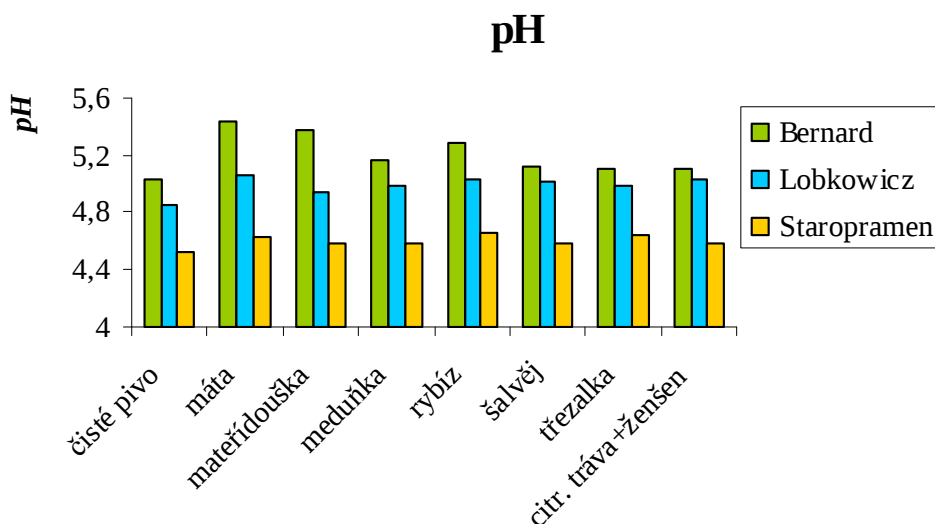
Antioxidační aktivita odpovídá spíše přítomnosti flavonoidů než polyfenolům celkovým. U vzorků s nízkou antioxidační aktivitou byl také zaznamenán nižší obsah flavonoidů. Vyšší hodnoty flavonoidů i antioxidační aktivity můžeme nalézt u máty a meduňky.

5.4 pH

Hodnota pH vzorků ochucených i neochucených piv byla zjištěna pomocí pH-metru. Měření bylo provedeno jednou, orientačně pro srovnání vlivu bylinných extraktů.

Tabulka č. 15: Hodnota pH ve vzorcích piva

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen
čisté pivo	5,03	4,85	4,52
máta	5,43	5,06	4,63
mateřídouška	5,37	4,94	4,58
meduňka	5,16	4,98	4,59
rybíz	5,29	5,03	4,66
šalvěj	5,12	5,02	4,58
třezalka	5,11	4,99	4,64
citr. tráva a ženšen	5,10	5,03	4,59



Graf č. 11: Hodnota pH

Hodnota pH vzorků ochucených i neochucených se pohybovala od hodnot 4,52 do 5,37; vzorky byly tedy mírně kyselé. Nejvíce kyselé vzorek bylo pivo značky Staropramen, naopak nejméně kyselé vzorek bylo pivo značky Bernard. Po přidání byliny došlo u všech vzorků k mírnému zvýšení pH, nejvíce přídavkem máty a nejméně přídavkem třezalky.

U Bernarda došlo ke zvýšení pH především přidáním máty a mateřídoušky. U Lobkowicze byl zjištěn největší nárůst pH po přidání máty. U Staropramenu došlo ke zvýšení hodnoty pH především přídavkem rybízu.

5.5 Stanovení katechinů pomocí metody HPLC/UV-VIS

Pomocí metody HPLC zjišťován obsah katechinu, epikatechinu, kyseliny chlorogenové, kyseliny ferulové, kyseliny gallové. Bylo zjištěno, že katechin a epikatechin byly za podmínek analýzy (viz kapitola 4.7.1) eluovány ve stejném retenčním čase, proto jsou vyjádřeny jako směs.

5.5.1 Optimalizace úpravy vzorku

Před samotným stanovením byla provedena optimalizace z důvodu odstranění nežádoucích doprovodných látek. Vzorky byly upraveny kyselou hydrolyzou a extrakcí do rozpouštědla (viz kapitola 4.7.2) a vzájemně byly porovnány chromatogramy přímého nástřiku neupraveného vzorku, hydrolyzovaného vzorku, extrahovaného vzorku a vzorku po hydrolyze a následné extrakci.

Porovnáním chromatogramů a jednotlivých píků byla jako optimální úprava vzorku zvolena kyselá hydrolyza.

5.5.2 Podmínky separace

Separace probíhala na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 dle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1. Retenční časy rostly v pořadí kyselina gallová, katechin a epikatechin, kyselina chlorogenová a kyselina ferulová.

5.5.3 Kvantifikace katechinů

Vyhodnocení obsahu jednotlivých zástupců katechinů bylo provedeno odečtením ploch píků dosazených do kalibračních rovnic [45]. Kalibrační rovnice byly sestaveny na stejné koloně za stejných podmínek, jako je uvedeno v této práci.

5.5.3.1 Vzorek piva značky Bernard

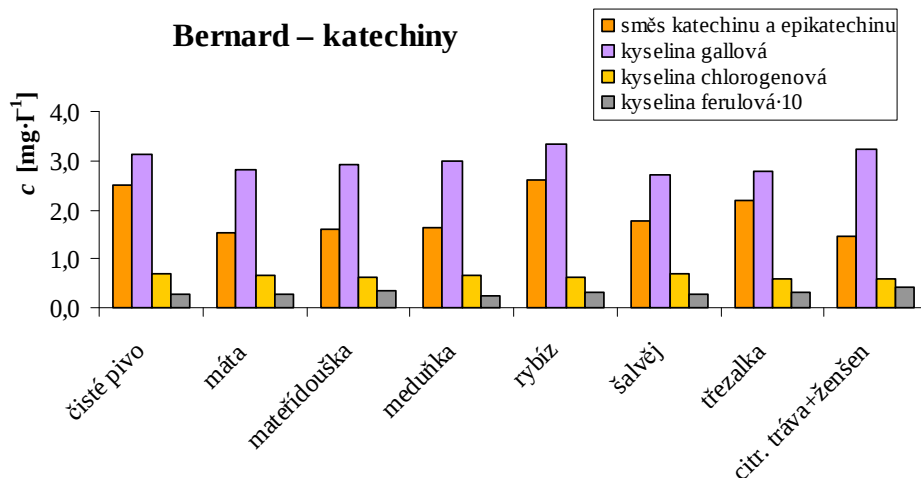
Tabulka č. 16: Obsah katechinů v pivu značky Bernard – koncentrace podle tabulky č. 2

Bernard	směs katechinu a epikatechinu	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	kyselina ferulová
	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$
čisté pivo	2,509	3,121	0,708	0,029
máta	1,526	2,814	0,669	0,027
mateřídouška	1,600	2,933	0,616	0,035
meduňka	1,641	2,974	0,664	0,023
rybíz	2,601	3,337	0,640	0,033
šalvěj	1,764	2,701	0,685	0,027
třezalka	2,207	2,773	0,589	0,031
citř. tráva a ženšen	1,460	3,237	0,600	0,042

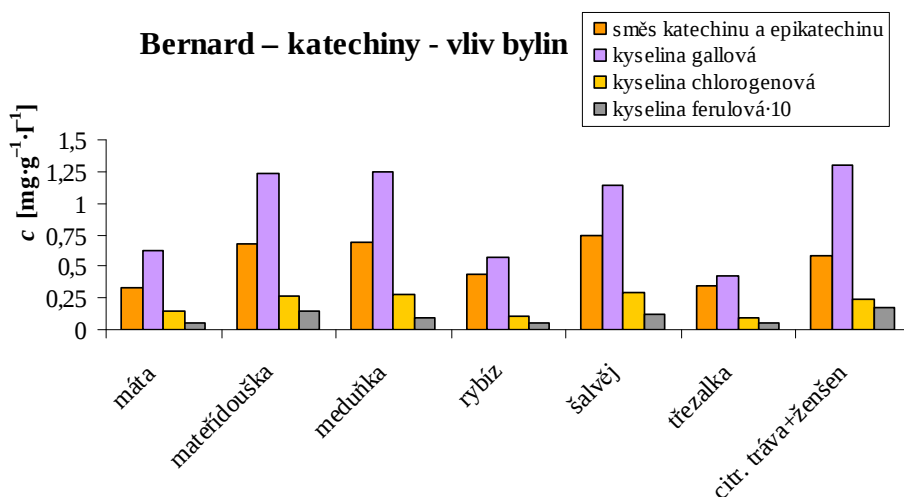
Tabulka č. 17: Obsah katechinů v pivu značky Bernard vztažený na přídavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva

Bernard	směs katechinu a epikatechinu	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	kyselina ferulová
	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \cdot 10 \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$
máta	0,336	0,620	0,148	0,059
mateřídouška	0,673	1,232	0,259	0,146
meduňka	0,689	1,250	0,279	0,097
rybíz	0,444	0,569	0,109	0,056

šalvěj	0,741	1,135	0,288	0,113
třezalka	0,340	0,427	0,091	0,048
citr. tráva a ženšen	0,585	1,296	0,240	0,169



Graf č. 12: Obsah katechinů v pivu značky Bernard



Graf č. 13: Obsah katechinů v pivu značky Bernard vztažený na 1 g byliny a 1 l čistého piva

Z grafu č. 12 je patrné, že z analyzovaných vzorků ochucených piv měla největší zastoupení kyselina gallová ($2,701\text{--}3,337\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), následně směr katechinu a epikatechinu ($1,460\text{--}2,601\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Kyselina chlorogenová i ferulová byly zastoupeny v malém množství, asi okolo $0,65\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,031\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Celkově nejvyšší obsah byl zjištěn u neochuceného piva a příchutě rybíz.

Při srovnání účinku ekvivalentních dávek sušených bylin do stejného objemu neochuceného piva (viz kapitola 5.2.1) lze tvrdit, že největší příspěvek tvořily příchutě mateřídouška, meduňka, šalvěj a citrónová tráva se ženšenem. Stejně tendence pozorujeme i u obsahu celkových flavonoidů, k nimž katechiny patří. Jejich obsah tedy přispívá k celkovému množství flavonoidů v nápoji.

5.5.3.2 Vzorek piva značky Lobkowicz

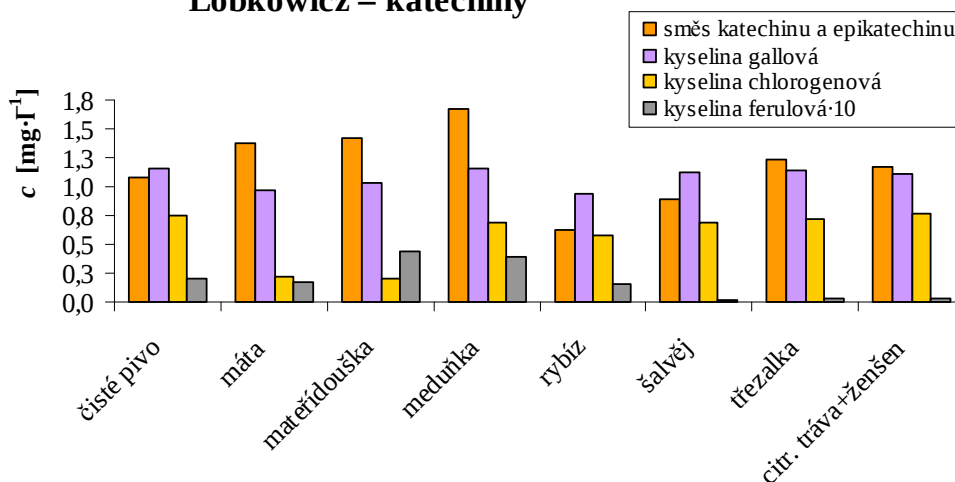
Tabulka č. 18: Obsah katechinů ve vzorku piva značky Lobkowicz – koncentrace podle tabulky č. 2

Lobkowicz	směs katechinu a epikatechinu	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	kyselina ferulová
	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$
čisté pivo	1,084	1,158	0,752	0,020
máta	1,374	0,976	0,212	0,017
mateřídouška	1,430	1,026	0,206	0,044
meduňka	1,669	1,162	0,689	0,039
rybíz	0,626	0,930	0,582	0,016
šalvěj	0,884	1,124	0,695	0,002
třezalka	1,227	1,146	0,725	0,003
citr. tráva a ženšen	1,178	1,109	0,766	0,003

Tabulka č. 19: Obsah katechinů v pivu značky Lobkowicz
vztahený na přidavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva

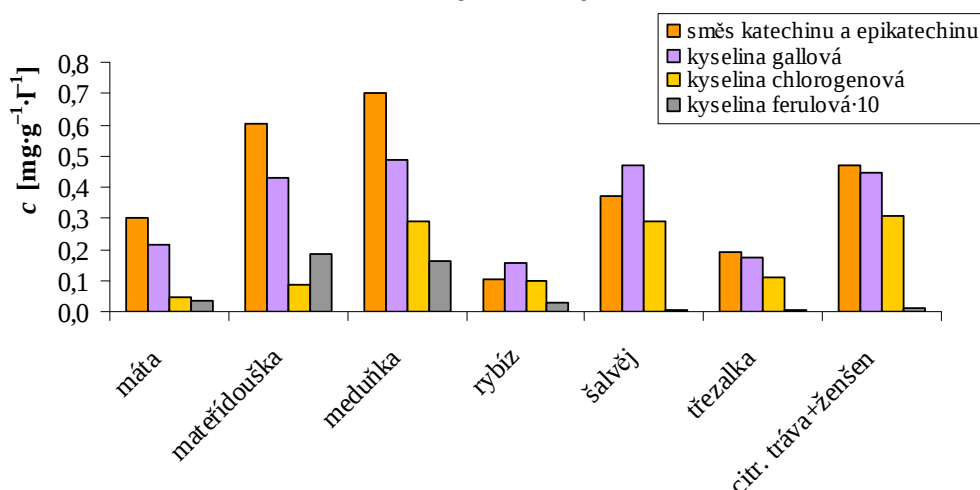
Lobkowicz	směs katechinu a epikatechinu	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	kyselina ferulová
	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c \cdot 10 \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]$
máta	0,303	0,215	0,047	0,037
mateřídouška	0,601	0,431	0,087	0,186
meduňka	0,702	0,489	0,289	0,165
rybíz	0,107	0,159	0,099	0,027
šalvěj	0,372	0,472	0,292	0,008
třezalka	0,189	0,177	0,112	0,005
citr. tráva a ženšen	0,472	0,444	0,307	0,013

Lobkowicz – katechiny



Graf č. 14 : Obsah katechinů ve vzorku piva značky Lobkowicz

Lobkowicz – katechiny - vliv bylin



Graf č. 15 : Obsah katechinů v pivu značky Lobkowicz vztažený na 1 g byliny a 1 l čistého piva

Ve vzorcích piva značky Lobkowicz byl stanoven obsah kyseliny gallové na 0,930 až 1,162 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, obsah katechinu a epikatechinu na 0,626 až 1,669 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Jak je patrné z grafu č. 14, patrné, že v několika případech dokonce přesahovaly obsah kyseliny gallové. Nejvyšší obsah těchto látek byl zjištěn u příchutě meduňka.

Obsah kyseliny chlorogenové i ferulové je nízký stejně jako u značky Bernard, hodnoty jsou však mnohem variabilnější. Nejvyšší obsah kyseliny chlorogenové byl detekován u čistého piva, příchutě třezalka a citrónová tráva s ženšenem. V případě kyseliny ferulové nacházíme maxima u mateřídoušky a meduňky.

Porovnáním hodnot z tabulky č. 19 je možné srovnat účinek stejného dávkování sušených bylin. Srovnání bylo provedeno početně dle kapitoly 5.2.1. Lze tvrdit, že největší příspěvky měla z bylin mateřídouška a meduňka a nejmenší naopak rybíz a třezalka. Stejný vliv je možné pozorovat u obsahu celkových flavonoidů.

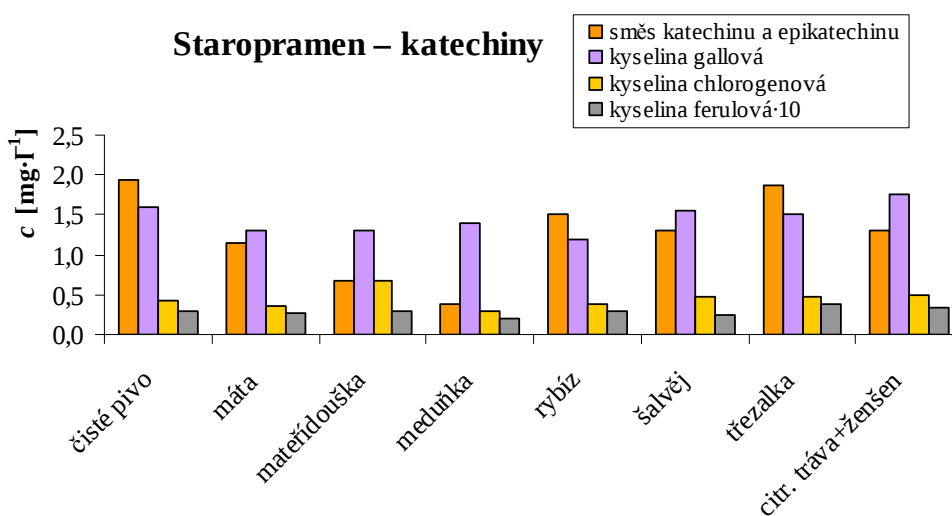
5.5.3.3 Vzorek piva značky Staropramen

Tabulka č. 20: Obsah katechinů ve vzorku piva značky Staropramen – koncentrace dle tabulky č. 2

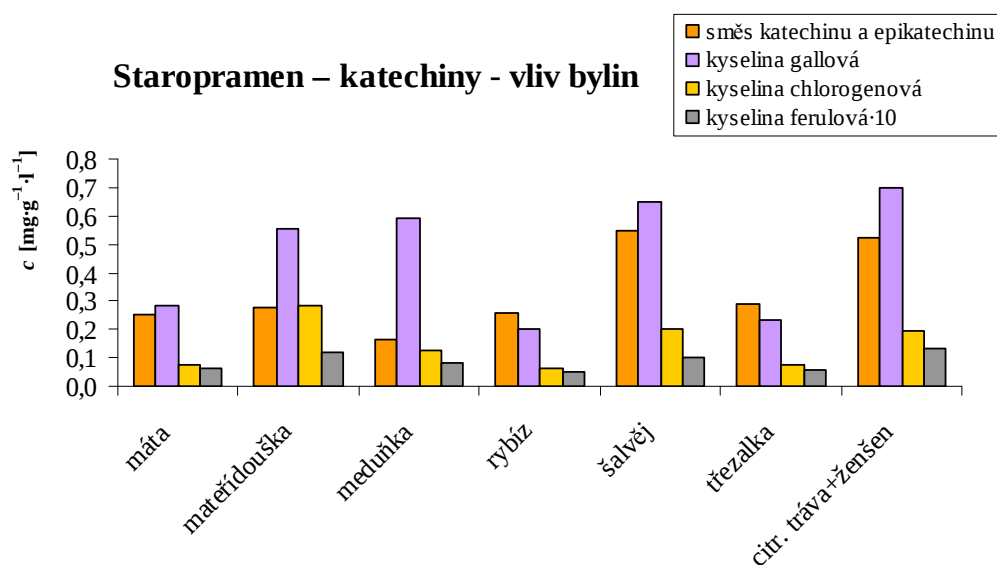
Staropramen	směr katechinu a epikatechinu	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	kyselina ferulová
	$c [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$
čisté pivo	1,942	1,605	0,424	0,029
máta	1,141	1,297	0,357	0,027
mateřídouška	0,664	1,313	0,676	0,028
meduňka	0,385	1,407	0,297	0,019
rybíz	1,502	1,196	0,380	0,029
šalvěj	1,299	1,545	0,484	0,024
třezalka	1,875	1,513	0,475	0,037
citr. tráva a ženšen	1,299	1,754	0,486	0,034

Tabulka č. 21: Obsah katechinů v pivu značky Staropramen
vztahený na přidavek 1 g sušené byliny do 1 l neochuceného piva

Staropramen	směs katechinu a epikatechinu	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	kyselina ferulová
	c [mg·g ⁻¹ ·l ⁻¹]	c [mg·g ⁻¹ ·l ⁻¹]	c [mg·g ⁻¹ ·l ⁻¹]	$c \cdot 10$ [mg·g ⁻¹ ·l ⁻¹]
máta	0,252	0,286	0,079	0,060
mateřídouška	0,279	0,552	0,284	0,120
meduňka	0,162	0,591	0,125	0,081
rybíz	0,256	0,204	0,065	0,050
šalvěj	0,546	0,649	0,203	0,102
třezalka	0,289	0,233	0,073	0,058
citr. tráva a ženšen	0,520	0,702	0,195	0,135



Graf č. 16: Obsah katechinů ve vzorku piva značky Staropramen



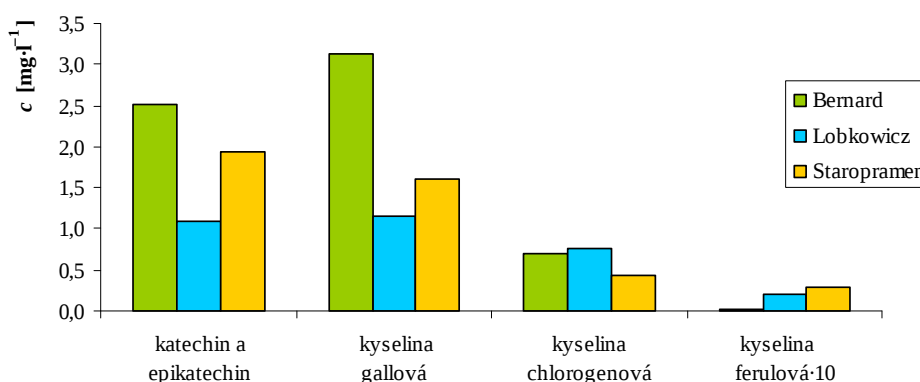
Graf č. 17: Obsah katechinů v pivu značky Staropramen vztahený na 1 g byliny a 1 l čistého piva

Při stanovení obsahu katechinů u piv značky Staropramen bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenými látkami je kyselina gallová (1,196–1,754 mg·l⁻¹), směs katechinu a epikatechinu (0,162–0,546 mg·l⁻¹).

Nejvíce byly tyto látky zastoupeny ve vzorku čistého piva a v příchuti citrónová tráva s ženšenem. Nejvyšší obsah kyseliny chlorogenové byl stanoven u mateřídoušky. Minoritní složkou byla kyselina ferulová (viz tabulka č. 20).

Při porovnání účinku bylin, který by byl očekáván při ekvivalentním dávkování sušených bylin i stejném objemu ochucovaného piva, sledujeme vysoký obsah kyseliny gallové u mateřídoušky, meduňky, šalvěje a citrónové trávy s ženšenem, u posledních dvou zmiňovaných je také vyšší obsah katechinu a epikatechinu. Vyšší obsah u jmenovaných bylin odpovídá i jejich vyššímu obsahu flavonoidů.

Obsah katechinů v neochucených pivech



Graf č. 18: Srovnání obsahu katechinů v neochucených pivech

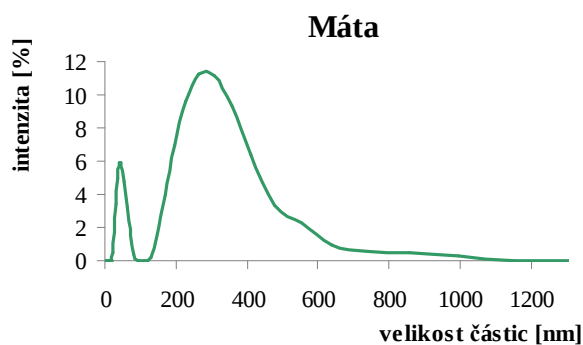
Při celkovém srovnání obsahu katechinů a fenolických kyselin je patrné, že největší zastoupení měla směs katechinu a epikatechinu a kyselina gallová. Nejvíce je tomu u značky Bernard, dále Staropramen a konečně Lobkowicz. U dalších zástupců se poměr mění; nejvíce kyseliny chlorogenové bylo stanoveno u značky Lobkowicz, nejvíce kyseliny ferulové u značky Staropramen. Oba dva zmíněné zástupci se však oproti kyselině gallové a směsi katechin a epikatechinu vyskytují v malém množství.

5.6 Enkapsulace vybraných bylinných extraktů

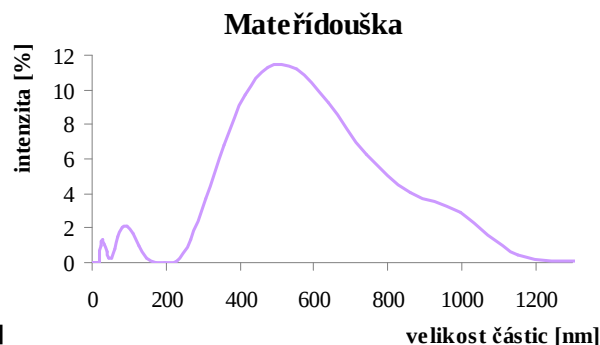
Dvě vybrané příchutě (máta a mateřídouška) byly enkapsulovány dle metody uvedené v kapitole 4.8. Byla proměřena velikost a stabilita částic před a po přefiltrování přes membránu o velikosti 100 nm.

5.6.1 Velikost částic

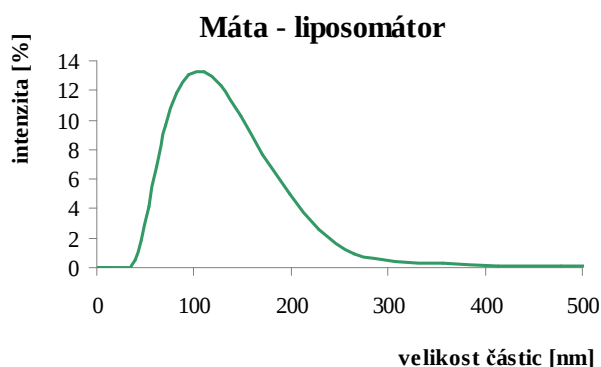
Velikost částic byla proměřena pomocí metody DLS (dynamický rozptyl světla). Platí, že s klesající velikostí částic roste rychlost jejich pohybu a tím dochází i k většímu rozptylu paprsku, který vzorkem prochází. Následující grafy č. 19 až 22 demonstrují zastoupení částic dané velikosti.



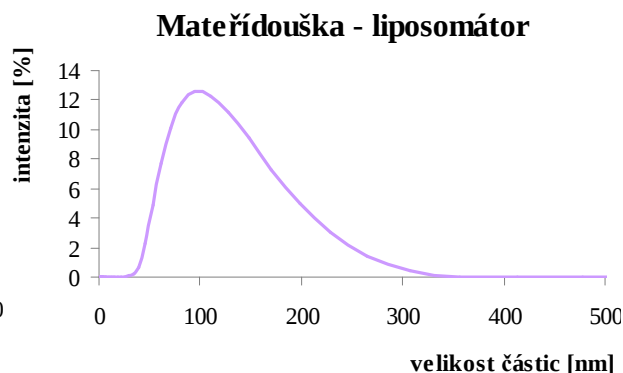
Graf č. 19: Čistý extrakt – máta



Graf č. 20: Čistý extrakt – mateřídouška



Graf č. 21: Čistý extrakt – máta po filtraci



Graf č. 22: Čistý extrakt – mateřídouška po filtraci

Velikost částic upravena pomocí liposomátoru s membránou 100 nm

Pomocí enkapsulace byly vytvořeny částice o různé velikosti. Po přefiltrování přes filtr o velikosti 5 μm byl zjištěn interval velikosti s maximem okolo rozměrů 0,5 a 0,3 μm . Po přefiltrování přes membránu byly separovány částice o velikosti 0,1 μm .

5.6.2 Stabilita částic – zeta potenciál

Stabilita částic je vyjádřena pomocí zeta potenciálu. Pokud je jeho hodnota větší než 30, nebo menší než -30 mV, jsou částice stabilní.

Tabulka č. 22: Stabilita částic

	Bernard	Lobkowicz	Staropramen	byliny
	zeta potenciál [mV]	zeta potenciál [mV]	zeta potenciál [mV]	zeta potenciál [mV]
máta	-2,68	-2,99	-2,76	-24,70
mateřídouška	-1,90	-1,84	-1,81	-27,70

Enkapsulované částice čistých bylinných extraktů vykazovaly zeta potenciál na hranici pásu stability. Po přidání do nealkoholických piv byly částice značně nestabilní. Následkem byla tvorba agregátů a rychlá sedimentace částic. Po úpravě velikosti částic liposomátorem se zeta potenciál nezměnil.

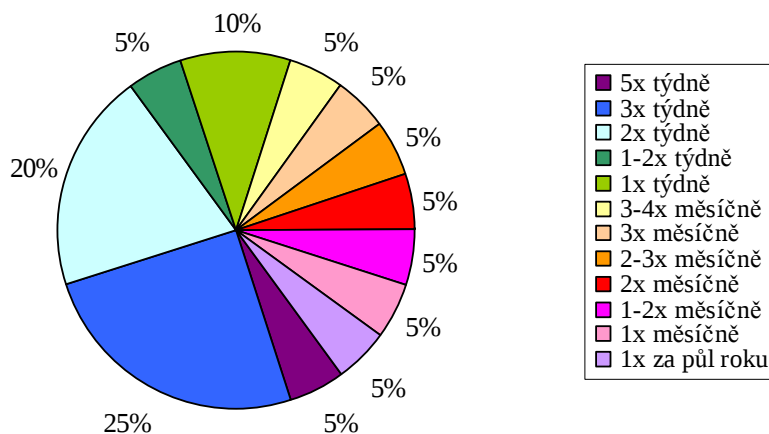
5.7 Senzorická analýza

Senzorická analýza je důležité odvětví potravinářského průmyslu. Poskytuje zpětnou vazbu na názor spotřebitelů a umožňuje vylepšovat a upravovat potraviny dle požadavků zákazníka a udržovat

tak sensorickou jakost. Sensorickou analýzou rozumíme hodnocení potravin bezprostředně našimi smysly, včetně zpracování výsledků lidským centrálním nervovým systémem. [46].

Senzorické analýzy se v předložené studii zúčastnilo 20 osob, z toho 9 žen a 11 mužů. Každému byly předloženy 3 druhy nealkoholického piva včetně 7 příchutí a 2 příchutí enkapsulovaných.

Frekvence pití piva

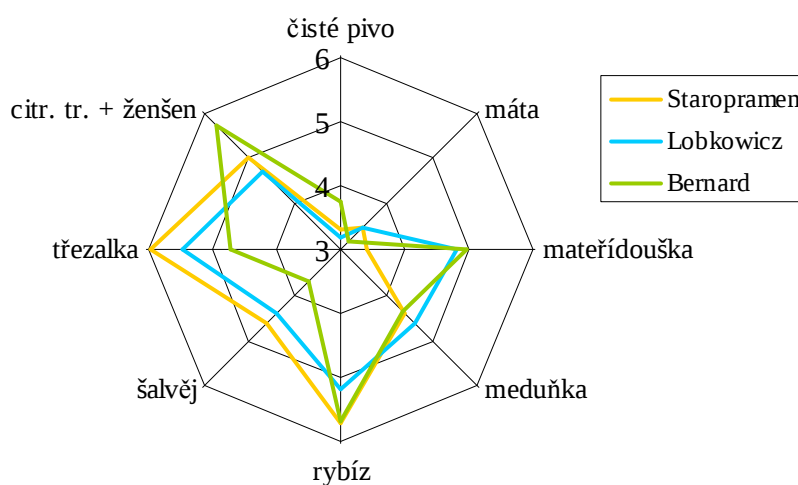


Graf č. 23: Frekvence pití piva dotazovaná u celkem 20 hodnotitelů

Z grafu je patrné, že převažující frekvence konzumu piva je 2-3x týdně. Necelá polovina osob konzumuje pivo s měsíční frekvencí. Kvalitní hodnocení piva je sice záležitostí pravidelných konzumentů, protože jde ale o nealkoholické pivo a navíc ochucené bylinami, je možné oslovit i takovou skupinu jedinců, která pivo nekonzumuje často. Proto je možné skupinu považovat za reprezentativní.

5.7.1 Celkové výsledky sensorické analýzy

Celkové hodnocení

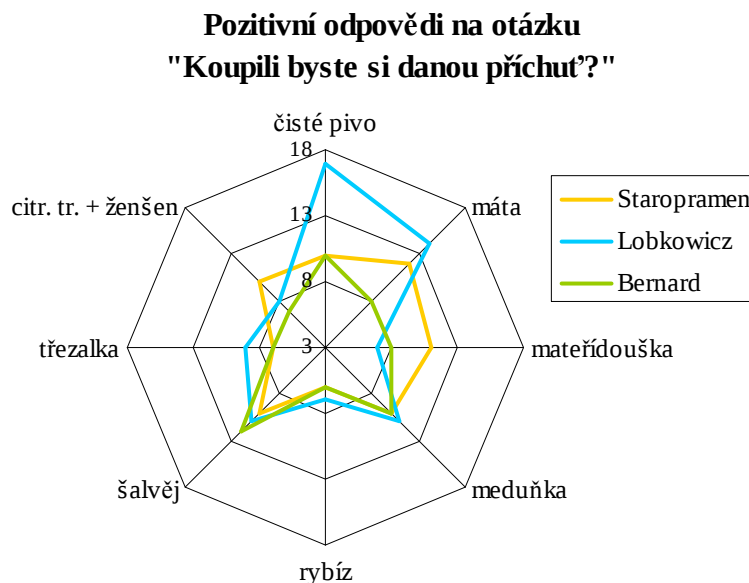


Graf č. 24: Celkové hodnocení čistých piv a bylinných příchutí (stupeň 1 – nejlepší, 8 – nejhorší)

Hodnotitelé měli za úkol seřadit jednotlivé příchutě v rámci jedné značky piva, přičemž číslo 1 připadalo pozici nejlepší, číslo 8 pozici nejhorší. Zprůměrováním pořadí a vynesáním do grafu je patrné, že u značky Bernard byla nejoblíbenější příchutí máta, která předčila i samotné neochucené pivo. Chutnala také příchutí šalvěj. Nejhorší ohodnocení bylo zaznamenáno u kombinace citrónová tráva se ženšenem a u extraktu z listů rybízu.

U značky Lobkowicz bylo nejlépe přijímáno samotné pivo, jako nejlepší mezi testovanými příchutěmi byla vyhodnocena máta. Nejhorší ohodnocení získala třezalka.

U značky Staropramen byla třezalka taktéž nejhorší vyhodnocenou příchutí, nízké ohodnocení získal také rybíz. Nejlépe bylo hodnoceno neochucené pivo a následně příchutí mateřídouška.



Graf č. 25: Vyhodnocení počtu pozitivních odpovědí na otázku, zda by si spotřebitelé dané pivo s příchutí koupili

Co se týče zájmu o daný produkt, po sečtení kladných odpovědí lze předpokládat, že by si konzumenti koupili Bernard ve variantě šalvěj, Lobkowicz ve variantě máta a Staropramen ve variantě máta a mateřídouška. Zájem nebyl o příchutí rybíz, třezalku a citrónovou travu se ženšenem.

Tabulka č. 23: Srovnání hodnocení z pohledu pohlaví

		Bernard		Lobkowicz		Staropramen	
		hodnocení		hodnocení		hodnocení	
		zájem o koupi:	seřazení příchutí	zájem o koupi:	seřazení příchutí	zájem o koupi:	seřazení příchutí
čisté pivo	celkové	10	3,75	17	3,20	10	3,30
	muži	6	3,55	8	3,82	5	4,09
	ženy	4	4,00	9	2,44	5	2,33
máta	celkové	12	3,20	14	3,45	12	3,50
	muži	8	2,82	7	3,64	6	3,92
	ženy	4	3,67	7	3,22	6	2,71
mateřídouška	celkové	8	4,95	7	4,80	11	3,40
	muži	3	5,27	3	4,91	6	3,62
	ženy	5	4,56	4	4,67	5	3,00
meduňka	celkové	10	4,35	11	4,65	10	4,40
	muži	7	3,91	6	4,82	8	4,38
	ženy	3	4,89	5	4,44	2	4,43
rybíz	celkové	6	5,65	7	5,15	6	5,70
	muži	3	5,73	3	4,82	2	5,64
	ženy	3	5,56	4	5,56	4	5,78
šalvěj	celkové	12	3,70	11	4,40	10	4,60
	muži	7	4,18	7	3,91	5	4,73
	ženy	5	3,11	4	5,00	5	4,44
třezalka	celkové	7	4,70	9	5,45	7	5,95
	muži	5	4,36	4	5,55	4	5,36
	ženy	2	5,11	5	5,33	3	6,67
citr. tráva a ženšen	celkové	7	5,70	8	4,70	10	5,00
	muži	4	6,18	4	4,55	5	4,18
	ženy	3	5,11	4	4,89	5	6,00

Tabulka ukazuje výsledky senzorické zkoušky s přihlédnutím na pohlaví hodnotitelů.

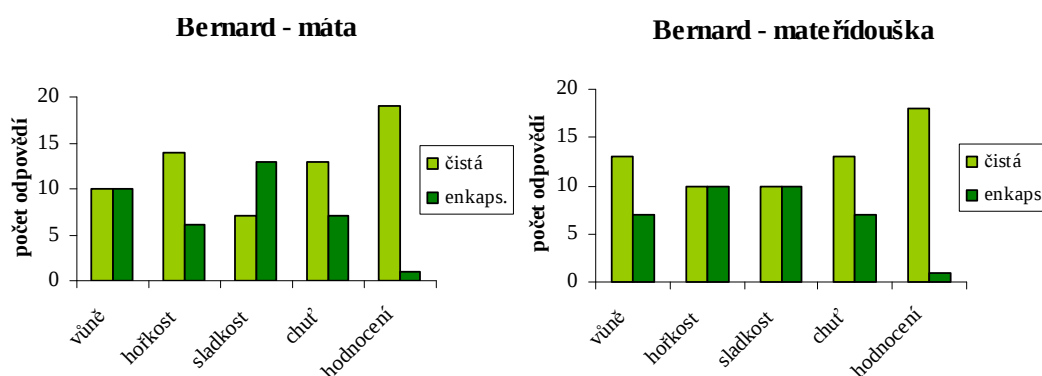
Z čistých piv chutnal mužům více Bernard. Ženy preferovaly spíše méně hořkého Lobkowicze a Staropramen. U značky Bernard ženy ohodnotily lépe jako příchut' meduňku, hůře šalvěj a citrónovou travu se ženšenem. Koupily by si spíše mateřídoušku. Mužům přišla nejvíce atraktivní máta. U značky Lobkowicz mužům chutnala nejvíce máta, ženám šalvěj. U piva Staropramen vykazuje příchut' citrónová tráva a ženšen značný rozpor v hodnocení u mužů a žen. Příchut' preferují spíše muži, ženám chutnalo spíše čisté pivo a z příchutí máta.

5.7.2 Párová zkouška

Cílem párové zkoušky bylo zjistit rozdíl v senzorickém hodnocení nealkoholického piva s přidavkem příchuti ve formě extraktu bez úprav a ve formě téže příchuti enkapsulované v liposomech.

Hodnotitelé měli za úkol označit, která varianta jim připadala s intenzivnější chutí. V celkovém hodnocení měli zvolit, která varianta se jim jeví jako lepší.

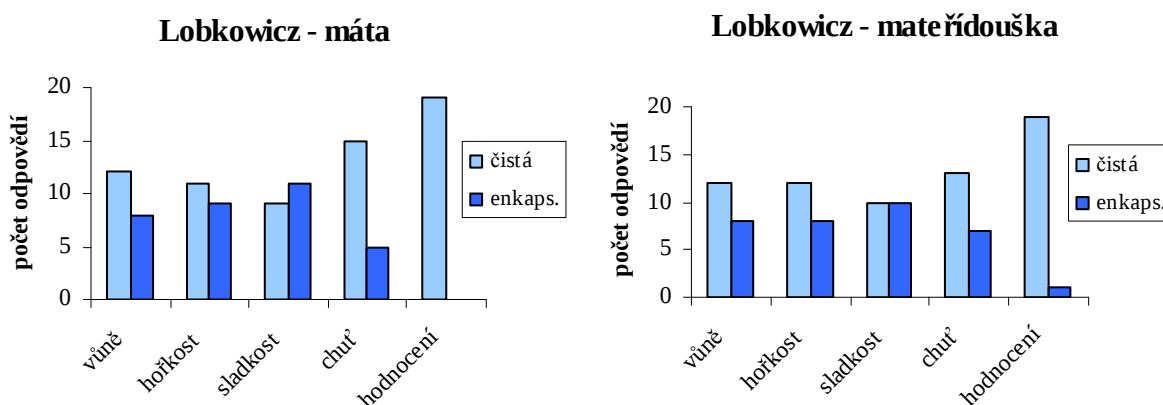
5.7.2.1 Výsledky párové zkoušky u značky piva Bernard



Graf č. 26 a 27 : Srovnání intenzity parametrů u čisté a enkapsulované byliny – pivo Bernard

U značky Bernard vidíme, že enkapsulace mírně zvýšila vnímání sladké chuti. Ostatní parametry zůstaly většinou intenzivní v neupravené verzi. Celkově získala lepší hodnocení neupravená bylina; opačný názor mělo v případě máty 5 % a mateřídoušky 10 % hodnotitelů.

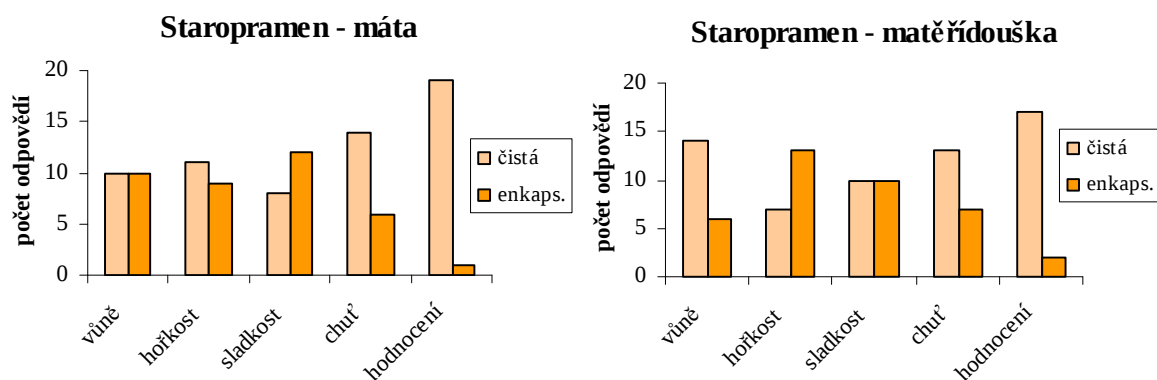
5.7.2.2 Výsledky párové zkoušky u značky piva Lobkowicz



Graf č. 28 a 29: Srovnání intenzity parametrů u čisté a enkapsulované byliny – pivo Lobkowicz

U značky Lobkowicz měla metoda enkapsulace vliv na sladkost u příchutě máta. U ostatních parametrů zůstala intenzita u neupravené bylinky. Opět získala lepší hodnocení neupravená bylina; opačný názor mělo v případě mateřídoušky 5 % hodnotitelů.

5.7.2.3 Výsledky párové zkoušky u piva značky Staropramen



Graf č. 30 a 31: Srovnání intenzity parametrů u čisté a enkapsulované bylinky – pivo Staropramen

U značky Staropramen, příchuti máta byla po přidání enkapsulované bylinky intenzivněji vnímána sladkost, u varianty matěřídouška zase hořkost. Většina ostatních charakteristik zůstala intenzivnější u neupravené formy bylinky. I zde získala významně lepší hodnocení neupravená bylinka. Opačný názor mělo v případě máty i matěřídoušky 5 % hodnotitelů.

6 ZÁVĚRY

Předmětem této bakalářské práce bylo vyvinout a otestovat bylinné extrakty určené pro ochucení nealkoholických pív. Pro práci byly vybrány 3 značky českých nealkoholických pív a 7 typů bylinných příchutí.

V teoretické části je uvedeno několik způsobů výroby nealkoholických pív. Druhá část teoretické části charakterizuje aktivní složky bylin a jejich fyziologický účinek; popsáno je i složení analyzovaných druhů bylin, a to máty, mateřídoušky, meduňky, listů černého rybízu, šalvěje, třezalky, citrónové trávy a ženšenu. Další kapitola teoretické části popisuje aktivní látky obsažené jak v pivech, tak i v bylinách. K nejvýznamnějším z nich patří polyfenoly. Tato široká skupina zahrnuje skupinu fenolových kyselin, flavonoidů, dále katechinů. Pivo je známé a vyhledávané pro svou jemnou hořkou chuť, ta je způsobena přítomností hořkých kyselin a isosloučenin, které z nich vznikají. Všechny uvedené aktivní látky přispívají k antioxidační aktivitě piva a tím prospěšným účinkům na organismus.

Praktická část se zabývá stanovením vybraných aktivních látek v ochucených pivech. Výsledky byly srovnány v rámci neochucených pív (Bernard, Lobkowicz, Staropramen), bylinných extraktů i směsí pív a příchutí. Obsah skupinových parametrů - celkových polyfenolů a flavonoidů, antioxidační aktivita, obsah celkových hořkých látek a isosloučenin byl stanoveny spektrofotometricky. Obsah individuálních katechinů a fenolických kyselin byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí. Vybrané příchuti byly připraveny i v enkapsulované formě. Studie byla doplněna senzorickou analýzou všech tří pív s bylinnými extrakty ve volné i enkapsulované formě.

Každý bylinný extrakt byl na základě orientačních chuťových preferencí připraven v jiné koncentraci. Zjištěné hodnoty byly proto vyjádřeny ve specifické koncentraci a následně byly výsledky přepočteny na ekvivalentní množství bylin a neochuceného piva.

Nejvyšší hodnoty všech analyzovaných skupinových parametrů byly stanoveny u nealkoholického piva značky Bernard. Celkový obsah polyfenolů se u ochucených pív pohyboval v rozmezí 25,69–35,18 mg·100 ml⁻¹. Největší množství polyfenolů bylo zjištěno u příchuti meduňka, šalvěj a citrónová tráva s ženšenem. K nejvyššímu nárůstu obsahu polyfenolů došlo u značky Staropramen.

Flavonoidy byly obsaženy v množství 25-50 % z celkového obsahu polyfenolů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo přidavkem máty a šalvěje.

Co se týče obsahu hořkých látek, přidavkem bylin došlo ve většině případů ke snížení. Příchutě tedy pivo chuťově zjemnily. Hořkost zůstala ovšem u šalvěje. Nejvíce hořkých jednotek bylo detekováno u varianty Bernard s příchutí šalvěj (26,90 mg·l⁻¹), nejméně u varianty Staropramen s příchutí mateřídouška (10,53 mg·l⁻¹).

K největší míře přeměny hořkých kyselin na iso-hořké kyseliny došlo u značky Bernard, v nejmenší míře u piva Staropramen. Isosloučeniny v bylinných extraktech detekovány nebyly, přesto nastaly po ochucení změny v obsahu. Přidávky extraktu mateřídoušky, meduňky a šalvěje dokonce obsah mírně zvýšily. U značky Staropramen přidavkem extraktu došlo výhradně ke snížení obsahu hořkých isosloučenin; snížení hořkosti potvrzují i výsledky senzorické analýzy.

Antioxidační aktivita se pohybovala v širším intervalu 138,01–407,96 µg TEAC·ml⁻¹. Přírůstek aktivity se lišil nejen v závislosti na použité bylině, ale i na značce piva.

Hodnota pH vypovídá o mírně kyselé povaze piv. Ochucením bylinnými extrakty došlo ve všech případech k mírnému zvýšení pH. Průměrný přírůstek hodnoty pH byl asi 0,15.

Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickým detektorem byl analyzován obsah katechinů a fenolových kyselin. Bylo zjištěno, že vzorky piva obsahovaly v nejvyšším množství kyselinu gallovou ($0,930\text{--}3,337\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), dále katechin a epikatechin, kyselinu chlorogenovou a v malém množství také kyselinu ferulovou. Obsah zmíněných látek byl nejvyšší u variant Bernard neochucené pivo a rybíz; Lobkowicz mateřídouška, meduňka a třezalka; Staropramen neochucené pivo a třezalka.

V rámci předložené práce byly dva extrakty bylin - máty a mateřídoušky připraveny jak ve formě vodného extraktu, tak i v enkapsulované formě. Extrakty byly enkapsulovány do liposomů na lecitinové bázi, velikost a stabilita částic byly analyzovány metodou dynamického rozptylu světla. Bylo zjištěno, že vytvořené částice se nacházely na hranici stability, avšak po přidání do piva byly liposomy velmi nestabilní, tvořily shluky a sedimentovaly. Enkapsulovaná varianta byla negativněji ohodnocena rovněž u spotřebitelů. Z hlediska senzorických parametrů bylo zeslabeno aroma, hořkost i celková chuť; na intenzitě získala jen sladkost. Proto lze navrhnout jako předmět dalšího zkoumání vývoj efektivnější, senzoricky příjemnější metody enkapsulace.

Významnou částí bakalářské práce byla senzorická analýza. Nejprve bylo nutné optimalizovat koncentraci extraktů ke spokojenosti potencionálních zákazníků, posléze bylo možné provádět analýzy obsahových látek i výsledné senzorické hodnocení finálního výrobku.

Všeobecně nejlepší hodnocení získala příchut' máta, a to bez rozdílu druhu piva, do kterého byla přidána. Další oblíbené příchutě byla mateřídouška a šalvěj, popř. meduňka. Lze se domnívat, že pro ochucení piv by měly být používány spíše aromatické byliny. Nasvědčuje tomu fakt, že jemné příchutě jako rybíz a třezalka získaly nejhorší ohodnocení.

Mezi varianty, které nejvíce preferovaly ženy, patřilo pivo Bernard šalvěj a citrónová tráva s ženšenem, Staropramen máta. Celkově nejoblíbenější neochucené pivo bylo pivo značky Lobkowicz.

Celkově nejvýraznější příspěvek ke koncentraci biologicky aktivních obsahových látek u všech analýz byl prokázán u extraktů z mateřídoušky, šalvěje a citrónové trávy s ženšenem. Tyto byliny se dávkuje v malém množství (ekonomicky příznivé) a mají příjemné senzorické vlastnosti (spotřebitelsky příznivé). Společně s mátou, která byla nejlépe hodnocena v rámci senzorické analýzy, lze zmíněné bylinné příchutě doporučit k dalšímu výzkumu a k případné budoucí aplikaci na trh.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Kladné účinky piva na zdraví populace. *Pivovar a likérka Kanec v Žamberku* [online]. © 2007 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: www.pivovarzamberk.wz.cz/pivo_je_zdrave.doc
- [2] JANČAR, Rostislav. Dáte si dvě a nenadýcháte ani čárku. Jak se vyrábí nealkoholické pivo. *Technet.cz: Technika kolem nás* [online]. 25. srpna 2009 [cit. 2012-02-01]. Dostupné z: http://technet.idnes.cz/date-si-dve-a-nenadychate-ani-carku-jak-se-vyrabi-nealkoholicke-pivo-1dy-/tec_reportaze.aspx?c=A090719_191913_tec_reportaze_rja
- [3] Spotřeba nealko piv rostla, výroba veškerého piva se ale propadla. *Finance.cz* [online]. 5. 1. 2010 [cit. 2012-02-01]. Dostupné z: <http://www.finance.cz/zpravy/finance/247209-spotreba-nealko-piv-rostla-vyroba-veskereho-piva-se-ale-propadla/>
- [4] KELLNER, Vladimír. Pivo, vitaminy a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka. *BEERS.CZ: české pivo, aktuality, pivovary, hospody, diskuse, akce* [online]. 15. 05. 2003 [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://www.beers.cz/index.php?detail=10086&sekce=2>
- [5] MÁCHALOVÁ, Hana. *Technologie výroby nealkoholických piv*. České Budějovice, 2011. Dostupné z: <https://wstag.jcu.cz/StagPortletsJSR168/KvalifPraceDownloadServlet?typ=1&adipidno=19682>. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská. Vedoucí práce Ing. Iveta Češková.
- [6] Historie. *Birell* [online]. © 2011 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.birell.cz/birell/historie/>
- [7] MONTANARI, Luigi, Ombretta MARCONI, Heide MAYER a Paolo FANTOZZI. Production of Alcohol-Free Beer. In: PREEDY, Victor R. *Beer in health and disease prevention*. Amsterdam: Elsevier, 2009, s. 61-76. ISBN 978-0-12-373891-2. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=hBO3N5qLTEIC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_vpt_buy#v=onepage&
- [8] SELECKÝ, Radoslav a Daniela ŠMOGROVIČOVÁ. Technologické a mikrobiologické aspekty výroby piva so sníženým obsahom alkoholu. *Chemické Listy*. 2007, roč. 101, s. 542-549. Dostupné z: http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_07_542-549.pdf
- [9] BASAŘOVÁ, Gabriela. Jak se vyrábí nízkoalkoholické a nealkoholické pivo?. *Vesmír* [online]. 2005, roč. 84, č. 4 [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/jak-se-vyrabi-nizkoalkoholicke-a-nealkoholicke-pivo>
- [10] Produkty CT. *BATAX* [online]. © 2010 [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: http://www.batax.cz/new/index.php?option=com_content&view=article&id=4&Itemid=12
- [11] SELECKÝ, Radoslav, Daniela ŠMOGROVIČOVÁ a Martin ŠULÁK. Produkcia nízkoalkoholického piva mutantnými pivovarskými kvasinkami. *Kvasný průmysl*. 2005, roč. 51, č. 7-8, s. 235-239. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=176>

- [12] VALTEROVÁ, Irena. *Alkaloidy* [online]. 2006 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/1121.ppt
- [13] Active Ingredients in Herbs. TYLEE, Peter & Jenny. *Herb Health Guide: Empowering you with health knowledge* [online]. © 2005 - 2011 [cit. 2012-02-08]. Dostupné z: <http://www.herb-health-guide.com/active-ingredients-herbs.html>
- [14] MORAVCOVÁ, Jitka. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha, 2006. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>
- [15] Alkaloids. FRIEDLI, Georges-Louis. *Herbal Blessings: Dr. Friedli's Alternative Medicine treatment program and FREE tutorials on herbs and phytochemistry* [online]. Emmitsburg, September 1996 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/alkaloids/alkaloid1.html>
- [16] KOPLÍK, Richard. *Rostlinné fenolové látky a flavonoidy: Speciální analýza potravin - přednášky* [online]. [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/koplikr/Rostlinné%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>
- [17] JURKOVÁ, Marie, Tomáš HORÁK, Jiří ČULÍK, Pavel ČEJKA a Vladimír KELLNER. Současné stanovení iso- α kyselin ve formě jejich cis- a trans- forem a tetrahydroisoalfa kyselin. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, č. 3, s. 164. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=22>
- [18] KOPLÍK, Richard. *Pivo a suroviny k výrobě piva: Analýza potravin v kontrolní praxi - přednášky* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/koplikr/5_Pivo.pdf
- [19] DUGASOVÁ, Aurélia a Dionýz DUGAS. *Babiččiny bylinky: průvodce našimi léčivými rostlinami*. Praha: Ottovo nakladatelství - Cesty, 2002, 216 s. ISBN 80-718-1696-5.
- [20] GEIGER, Fritz. *Bylinný receptář: důvěřujte léčivým silám přírody*. Překlad Jaroslav Procházka. České Budějovice: Dona, 1991, 128 s. ISBN 80-900-0807-0.
- [21] TREBEN, Maria. *Zdravie z Božej lekárne: liečivé rastliny: rady a skúsenosti*. Bratislava: Ikar, 1991, 95 s. ISBN 80-711-8012-2.
- [22] GREŠÍK, Valdemar. Rybíz černý list. *Grešík* [online]. © 2004 - 2008 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: <http://www.gresik.cz/nase-vyrobky/lecive-byliny/rybiz-cerny-list.html>
- [23] Černý rybíz - *Ribes nigrum*. *Mineralfit.cz* [online]. 25. 05. 2006 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <http://www.mineralfit.cz/clanek/cerny-rybiz-ribes-nigrum>
- [24] Šalvěj lékařská. *Mineralfit.cz* [online]. 21. 05. 2006 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <http://www.mineralfit.cz/clanek/salvej-lekarska>
- [25] Zázračná třezalka tečkovaná. *Mineralfit.cz* [online]. 19. 05. 2006 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <http://www.mineralfit.cz/clanek/zazracna-trezalka-teckovana>

- [26] Herb Uses. *Highland Herbs Tasmania! : Certified Organic Herbs* [online]. © 2012 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: http://highlandherbs.com.au/index.php?main_page=herb_uses
- [27] Citrónella (Oil of Citrónella) (021901) Fact Sheet. *US Environmental Protection Agency* [online]. 11/99, 6. duben 2012 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: http://www.epa.gov/opppbpd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_021901.htm
- [28] WOLTERS KLUWER HEALTH. Complete Lemongrass information from Drugs.com. *Drugs.com: Prescription Drug Information, Interactions & Side Effects* [online]. © 2009 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/npp/lemongrass.html>
- [29] CITRÓNOVÁ TRÁVA - Lemongrass | Sazenice. *BioRenesance.cz: obchod s přírodními produkty* [online]. [cit. 2012-04-13]. Dostupné z: <http://www.biorenesance.cz/biorenesance/eshop/44-1-Lecive-BYLINY/363-2-TOP-ROSTLINY/5/1936-CITRÓNOVA-TRAVA-Lemongrass-Sazenice>
- [30] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické Listy*. 2004, roč. 98, s. 239-241. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_02.pdf
- [31] KELLNER, Vladimír, Pavel ČEJKA, Gabriela MARINOVA, Valentin BAČVAROV, Marie JURKOVÁ, Jiří ČULÍK, Tomáš HORÁK a Josef DVOŘÁK. Studium jednoduchých polyfenolových látek v pivech různé provenience. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, č. 5, s. 234-238. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=9>
- [32] FIDLER, Martin a Lenka KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické Listy*. 2009, roč. 103, s. 232. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_03_232-235.pdf
- [33] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Petr HULÍN, Marcel KARABÍN a Pavel DOSTÁLEK. Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech Journal of Food Science*. 2009, roč. 25, č. 4, s. 182-188. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00311.pdf>
- [34] ONDREJOVIČ, Miroslav, Tibor MALIAR, Ľudovít POLÍVKA a Stanislav ŠILHÁR. Polyfenoly jablák. *Chemické Listy*. 2009, roč. 103, s. 394-396. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_05_394-400.pdf
- [35] MALEŠEV, Dušan a Vesna KUNTIĆ. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2007, roč. 72, č. 10, 921-939. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-5139/2007/0352-51390710921M.pdf>
- [36] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011, č. 1, s. 1806-1815. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>

- [37] ZUIDAM, Nicolaas Jan a Eyal SHIMONI. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: ZUIDAM, N a Viktor A. NEDOVIĆ. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York: Springer Science+Business Media, 2010, s. 20-21. ISBN 978-1-4419-1008-0. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=wi3GFjTn5gcC&printsec=frontcover&dq=encapsulation&hl=en&sa=X&ei=NP96T8PaBc6eOsPd_OEC&redir_esc=y#v=onepage&q=encapsulation&f=false
- [38] DOUŠA, Michal. [HPLC|*High Performance Liquid Chromatography*] [online]. © 1999-2011, 24. ledna 11 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- [39] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Petr HULÍN. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl*. 2006, roč. 52, č. 4, s. 112-114. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=166>
- [40] DOUŠA, Michal. [Postkolonová derivatizace v HPLC - Postcolumn derivatization HPLC]. [HPLC|*High Performance Liquid Chromatography*] [online]. 3. června 2010 [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Der/pcrs.htm#top>
- [41] ODDĚLENÍ STRUKTURNÍ ANALÝZY: KATEDRA FYZIKY KONDENZOVANÝCH LÁTEK MFF UK. *Dynamický rozptyl světla* [online]. Praha [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [42] VŠCHT PRAHA: ÚSTAV TECHNOLOGIE MLÉKA A TUKŮ. *Distribuce velikosti částic a koloidní stabilita* [online]. Praha [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/tmt/studium/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf
- [43] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. England, Feb. 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [44] MIKYŠKA, Alexandr, Danuša HAŠKOVÁ, Tomáš HORÁK a Marie JURKOVÁ. Vliv typu chmelové suroviny na antioxidační vlastnosti piva. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, 7-8, s. 294. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=3>
- [45] VALENTOVÁ, Radka. *Analýza vybraných aktivních látek v různých druzích výrobků z rýže*. Brno, 2011. Dostupné z: http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36890. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..
- [46] POKORNÝ, Jan, Helena VALENTOVÁ a Zdeňka PANOVSÁ. *Sensorická analýza potravin*. Praha: VŠCHT, 1998, 95 s. ISBN 80-7080-329-0.
- [47] Krebs Cycle Pictures and Summary. *University of Illinois at Chicago* [online]. [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2003/krebsfull.htm>

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

CNS	centrální nervová soustava
Gall	acyl kyseliny gallové
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
EBC	European Brewery Convention (Evropská pivovarská konvence)
EBU	European Bitterness Units (jednotky hořkosti)
HPLC/UV-VIS	high performance liquid chromatography

9 SEZNAM PŘÍLOH

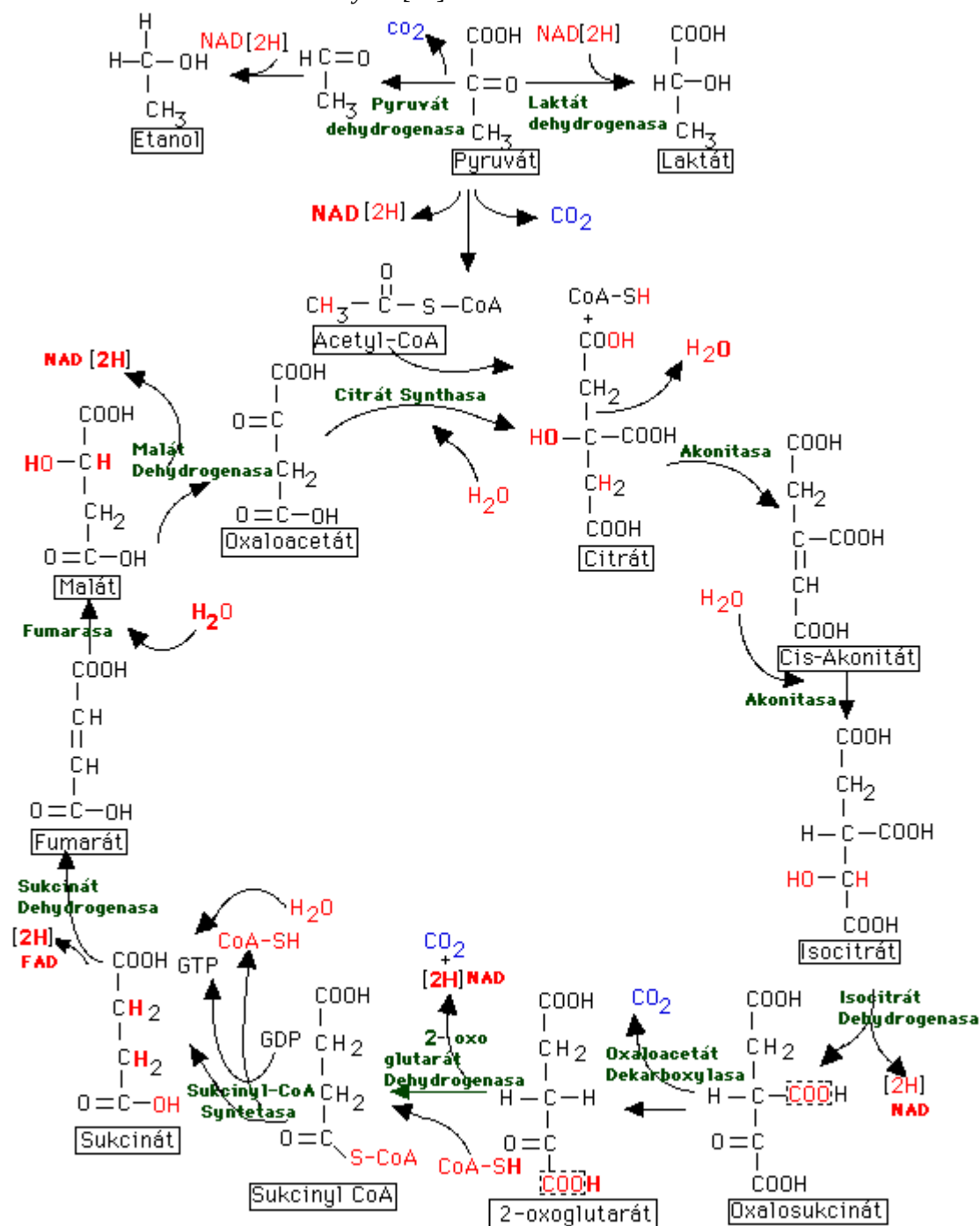
1. Přehled alkoholických piv s bylinnou složkou
2. Schéma Krebsova cyklu
3. Kalibrační závislosti pro výpočet obsahu daných katechinů
4. Kalibrační křivka pro stanovení celkových polyfenolů
5. Kalibrační křivka pro stanovení celkových flavonoidů
6. Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity
7. Chromatogram – stanovení katechinů a fenolických kyselin. Lobkowicz, příchut' rybíz
8. Chromatogram – stanovení katechinů a fenolických kyselin. Lobkowicz, příchut' třezalka
9. Graf příjemnosti vybraných parametrů – Bernard
10. Graf intenzity vybraných parametrů – Bernard
11. Graf příjemnosti vybraných parametrů – Lobkowicz
12. Graf intenzity vybraných parametrů – Lobkowicz
13. Graf příjemnosti vybraných parametrů – Staropramen
14. Graf intenzity vybraných parametrů – Staropramen
15. Vzor dotazníku pro senzorickou analýzu

10 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Přehled alkoholických piv s bylinnou složkou

Název	obsah alkoholu (% obj.)	Pivovar
Sedm kulí Ochucené polotmavé pivo s příchutí bylin	5,5	Ferdinand, Benešov
Olivětínský Opat Extra chmelené bylinné pivo	4,0	Broumov, Broumov
Olivětínský Opat Herbal bitter kvasničák	4,0	Pivovar Broumov, Broumov
Black Hill extrakt z 33 druhů bylin	5,5	Černá Hora, Černá Hora
PIKARD® tmavý ležák 14° puškvorcový	-	Zámek Zábřeh Ostrava, Ostrava
Rouge	5,0	U medvídků, Praha
Dr. Čížek	-	Radouš, Štáhlavy
Puškvorcový speciál	5,7	Domácí pivovárek Velký Rybník, Ostrov

Příloha č. 2: Schéma Krebsova cyklu [47]

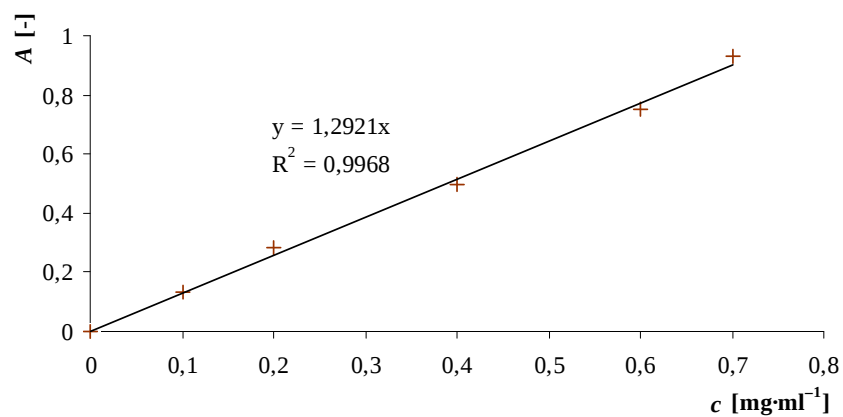


Příloha č. 3: Kalibrační závislosti pro výpočet obsahu daných katechinů [45]

Standard	Kalibrační rovnice [mg·l ⁻¹]	Regresní koeficient
katechin	$y = 23,14x$	$R^2 = 0,9993$
epikatechin	$y = 19,52x$	$R^2 = 0,9841$
kyselina gallová	$y = 269,31x$	$R^2 = 0,9990$
kyselina chlorogenová	$y = 116,38x$	$R^2 = 0,9980$
kyselina ferulová	$y = 266,31x$	$R^2 = 0,9908$

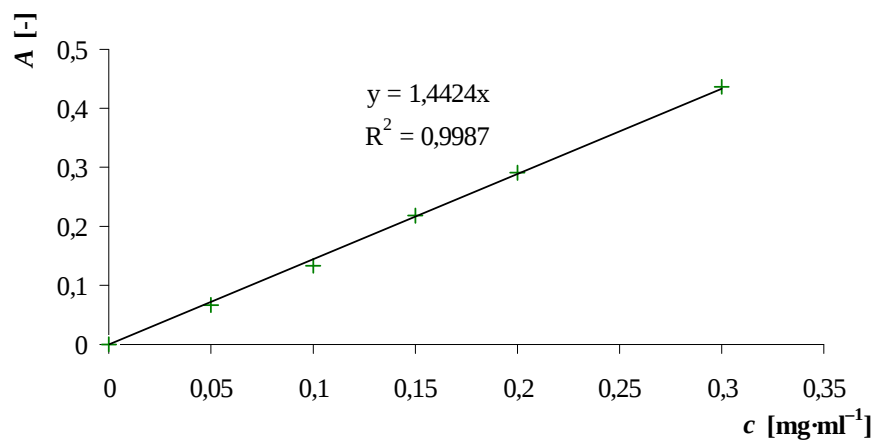
Příloha č. 4: Kalibrační křivka pro stanovení celkových polyfenolů

Kalibrace - kyselina gallová



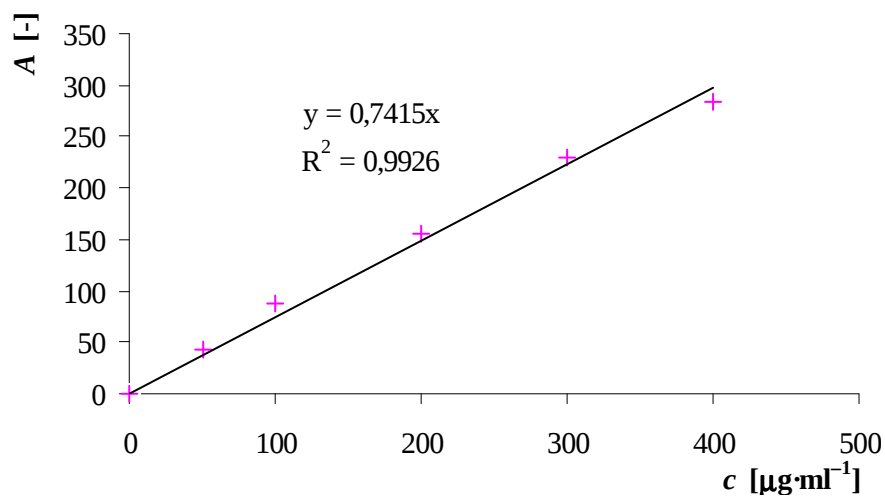
Příloha č. 5: Kalibrační křivka pro stanovení celkových flavonoidů

Kalibrace - katechin

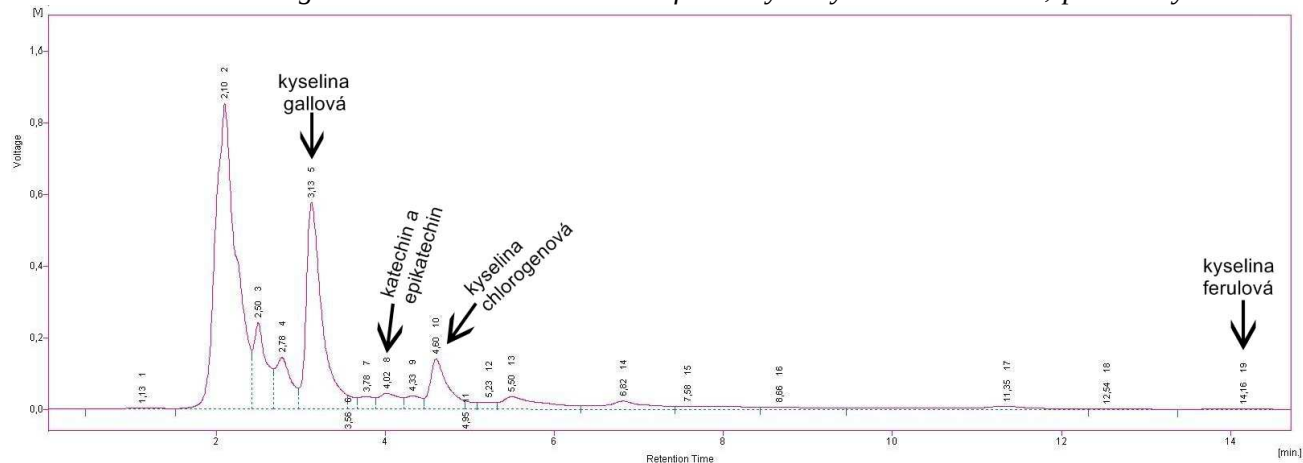


Příloha č. 6: Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity

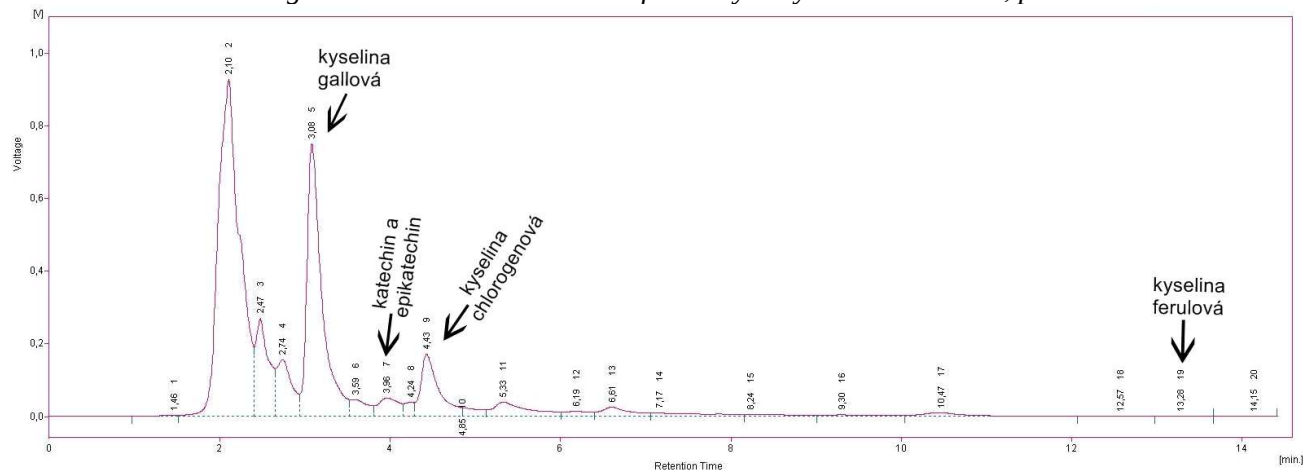
Kalibrace - Trolox



Příloha č. 7: Chromatogram – stanovení katechinů a fenolických kyselin. Lobkowicz, příchut' rybíz

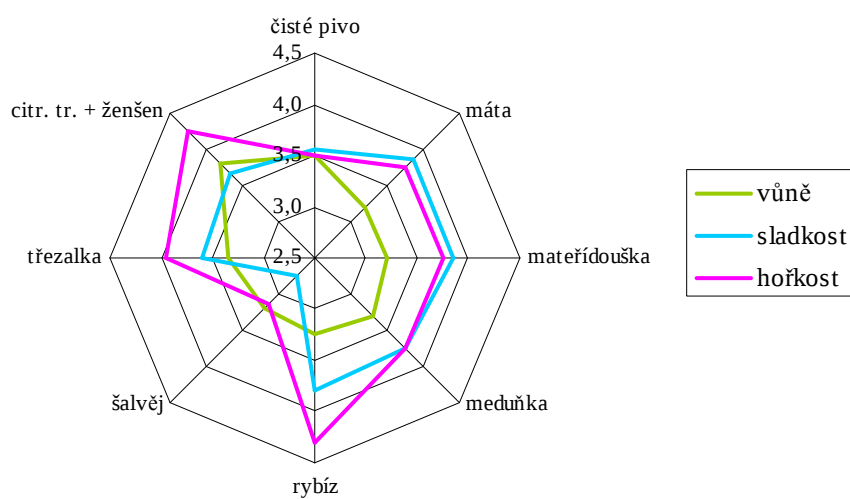


Příloha č. 8: Chromatogram – stanovení katechinů a fenolických kyselin. Lobkowicz, příchut' třezalka



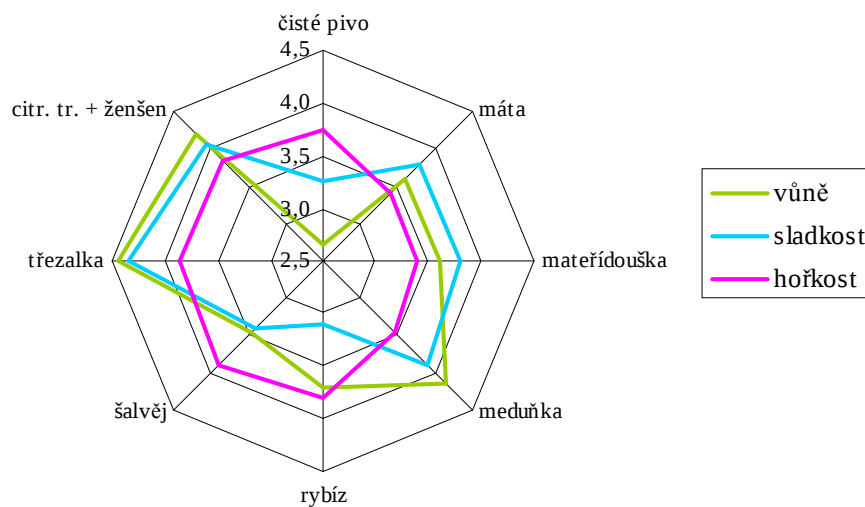
Příloha č. 9: Graf příjemnosti vybraných parametrů – Bernard
(stupeň 1 – velmi dobrý, 8 – velmi špatný)

Bernard - příjemnost parametrů



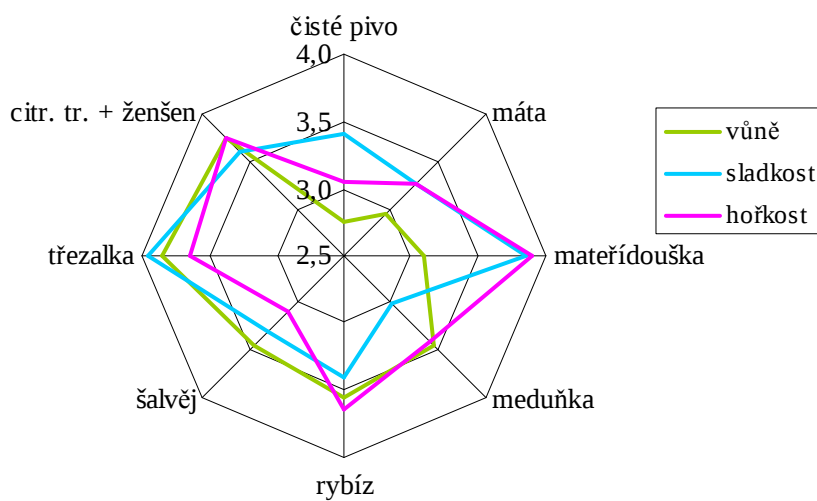
Příloha č. 10: Graf intenzity vybraných parametrů – Bernard
(stupeň 1 – velmi výrazný, 4 – optimální, 8 – není cítit)

Bernard - intenzita parametrů



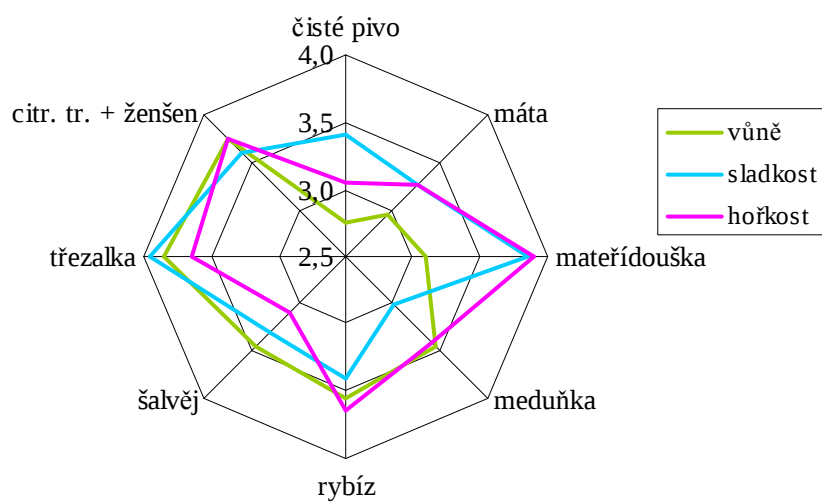
Příloha č. 11: Graf příjemnosti vybraných parametrů – Lobkowicz
(stupeň 1 – velmi dobrý, 8 – velmi špatný)

Lobkowicz - příjemnost parametrů



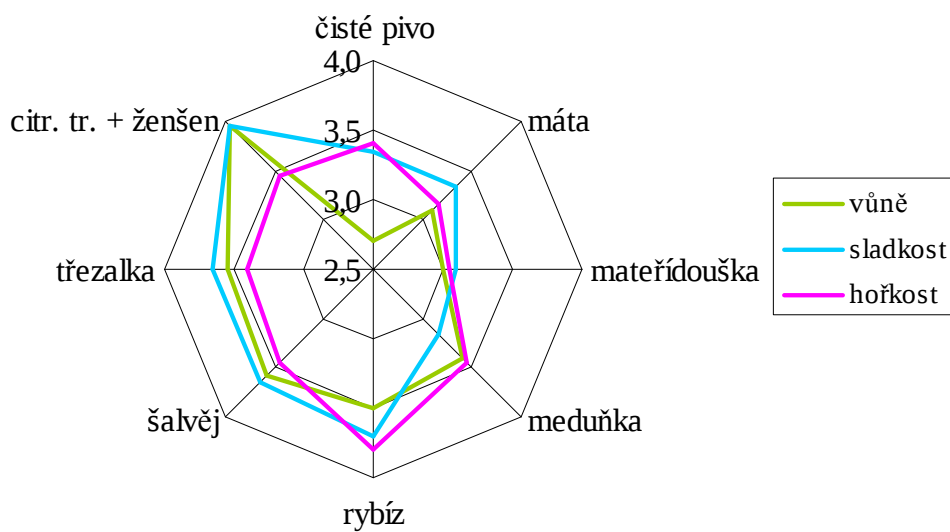
Příloha č. 12: Graf intenzity vybraných parametrů
(stupeň 1 – velmi výrazný, 4 – optimální, 8 – není cítit)

Lobkowicz - příjemnost parametrů



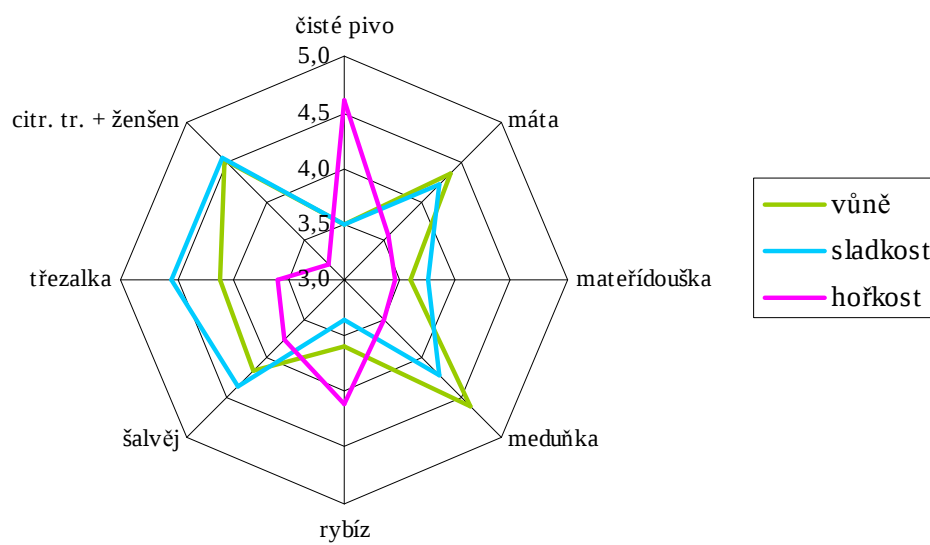
Příloha č. 13: Graf příjemnosti vybraných parametrů
(stupeň 1 – velmi dobrý, 8 – velmi špatný)

Staropramen - příjemnost parametrů



Příloha č. 14: Graf intenzity vybraných parametrů
(stupeň 1 – velmi výrazný, 4 – optimální, 8 – není cítit)

Staropramen - intenzita parametrů



Senzorická analýza „Nealkoholické pivo s bylinnými příchutěmi“

Pohlaví ♂ ♀

Jak často pijete pivo?krát za týden / měsíc / čtvrt roku / půl roku / rok (doplňte číslici a zvolený interval zakroužkujte)

Do následujících prázdných políček doplňujte čísla dle tabulky umístěné dole.

Staropramen	VŮNĚ		CHUŤ						HODNOCENÍ	
	intenzita	příjemnost	hořkost			sladkost			koupil/a byste?	seřazení příchutí
			intenzita	doznívání	příjemnost	intenzita	příjemnost			
čisté pivo									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 1									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 2									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 3									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 4									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 5									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 6									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8
bylinná příchut' 7									ano / ne	1 2 3 4 5 6 7 8

Párová zkouška

Křížkem ohodnoťte, u které varianty je daný parametr intenzivnější.

bylinná příchut' 1	varianta A	varianta B
vůně		
hořkost		
sladkost		
chuť		
celkové hodnocení	lepší / horší	lepší / horší

bylinná příchut' 2	varianta A	varianta B
vůně		
hořkost		
sladkost		
chuť		
celkové hodnocení	lepší / horší	lepší / horší

	INTENZITA	PŘÍJEMNOST
1	velmi výrazný	velmi dobrý
2	výrazný	dobrý
3	mírně výrazný	spíše dobrý
4	optimální	střední / nevím
5	mírně nevýrazný	spíše špatný
6	nevýrazný	špatný
7	není cítit	velmi špatný