

Studium jednoduchých polyfenolových látek v pivech různé provenience

Simple polyphenolic compounds in beers of different origins

VLADIMÍR KELLNER¹, PAVEL ČEJKA¹, GABRIELA MARINOVA², VALENTIN BAČVAROV², MARIE JURKOVÁ¹, JIŘÍ ČULÍK¹, TOMÁŠ HORÁK¹, JOSEF DVOŘÁK¹, DANUŠA HAŠKOVÁ¹

¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting Plc., Brewing Institute, Lipová 15, 120 44 Prague 2, Czech Republic

² IBHI Sofia (Institut po kriobiologia i hranitelni tehnologii) / IBHI Sofia (Institut po kriobiologia i hranitelni tehnologii)

e-mail: kellner@beerresearch.cz

Kellner, V. – Čejka, P. – Marinova, G. – Bačvarov, V. – Jurková, M. – Čulík, J. – Horák, T. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Studium jednoduchých polyfenolových látek v pivech různé provenience. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 5, s. 234–238.

Práce byla zaměřena na porovnání obsahu jednoduchých fenolových látek v pivech různé provenience: české, bulharské a dalších zemí. V první části práce bylo zjištěno, že složení bulharských ležáků je spíše podobné zahraničním ležákům než českým, jak o tom svědčí nízký rozdíl prokvašení, nízká barva, hořké látky, barva a rovněž nižší obsah celkových polyfenolů. Z toho vyplývá, že i z tohoto hlediska je složení českého piva výjimečné. V další části práce byla věnována pozornost obsahu jednoduchých polyfenolů. Ten v různých typech piv značně kolísá a zatím nebyl nalezen žádný vztah např. ke stupňovitosti, obsahu celkových polyfenolů, anthokyanogenů atd. Je to zřejmě způsobeno tím, že hladina těchto jednoduchých polyfenolů je značně ovlivněna skladbou surovin, varním postupem a pravděpodobně také stabilizačním postupem. Dále bylo zjištěno, že výsledky skupinových metod stanovení celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavanoidů nejsou ovlivněny přítomností těchto jednoduchých fenolických sloučenin nebo jen v zanedbatelné míře, a to vzhledem k nízké koncentraci těchto látek v pivu.

Kellner, V. – Čejka, P. – Marinova, G. – Bačvarov, V. – Jurková, M. – Čulík, J. – Horák, T. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Simple polyphenolic compounds in beers of different origins. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 5, p. 234–238.

The aim of the study was comparison of content of simple polyphenolic compounds in beer of various origin: Czech, Bulgarian and other countries. In the first part of this study it was demonstrated that the composition of Bulgarian lager beers resemble more foreign lager beers than Czech lager beers as evident from colour, the lower attenuation difference, content of bitter compounds and total polyphenols. Obviously the composition of Czech beer is unique.

The following part of the study shows the contents of simple polyphenols. The content of simple polyphenols in beers varies considerably. Up to now no relationship such as to the degree of attenuation, the content of total polyphenols or the content of anthocyanogens was found. The probable explanation is that the content of these simple polyphenols is considerably influenced by the composition of raw materials, the brewing method and apparently also by the stabilization method. Furthermore it was proven that the results of the determinations according to conventional group methods for total polyphenols, anthocyanogens and flavanoids are not, or only negligibly influenced by the presence of simple polyphenols due to their low concentrations in beer.

Kellner, V. – Čejka, P. – Marinova, G. – Bačvarov, V. – Jurková, M. – Čulík, J. – Horák, T. – Dvořák, J. – Hašková, D.: Studium einfachen Polyphenol Stoffen in den verschiedenen Bieren. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 5, S. 234–238.

Der Artikel befasst sich mit dem Vergleich des Gehalts an einfachen Polyphenol Stoffen in den Bieren verschiedener Herkunft, aus Tschechien, aus Bulgarien und aus den anderen Ländern. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde es festgestellt, dass die Zusammensetzung der bulgarischen Biere näher zu dem westeuropäischen Lagerbier als zum tschechischen Bier ist, was durch die Bieranalyse unterstärkt wird, z.B. ein niedrigerer Unterschied zwischen dem scheinbaren und dem wirklichen Vergärungsgrad, helle Bierfarbe, niedrigerer Gehalt an Bitterstoffe und an gesamte Polyphenolen. Aus diesem Punkt geht hervor, dass die Zusammensetzung des tschechischen Bieres ungewöhnlich ist. Im weiteren Teil des Artikels wurde die Aufmerksamkeit dem Gehalt an einfachen Polyphenol Stoffen gewidmet. In den verschiedenen Bieren dieser Gehalt wesentlich variiert und bisher keine Beziehung z.B. zur Grädigkeit und zum Gehalt an gesamten Polyphenolen, Anthokyanogenen usw. gefunden wurde. Dies ist vermutlich verursacht durch die Tatsache, dass der Gehalt an einfachen Polyphenol Stoffen durch die Rohstoffzusammensetzung, durch den Brauprozess und wahrscheinlich auch durch Stabilisationsverfahren wesentlich beeinflusst wird. Weiterhin wurde es festgestellt, dass die Ergebnisse von Gruppenmethoden der Ermittlungen des Gehalts an gesamten Polyphenolen, Anthokyanogenen und Flavanoiden durch die Anwesenheit von einfachen phenolischen Verbindungen wegen niedrigen Konzentration von diesen Stoffen im Bier nicht oder sehr wenig beeinflusst sind.

Klíčová slova: polyfenoly, fenolové sloučeniny, HPLC, coulometrická detekce, CoulArray detektor, pivo

Keywords: polyphenols, phenolic compounds, HPLC, coulometric detection, CoulArray detector, beer

1 ÚVOD

Na základě našeho dřívějšího výzkumu se nám podařilo zcela exaktně odlišit česká piva od zahraničních piv plzeňského typu (Pilsner, Pils, Pilsener apod.). Bylo zjištěno, že jedním ze základních charakteristických znaků piva českého typu je přítomnost neprokvašeného extraktu (tj. česká piva se konzumují ve stadiu dokvašování). Naprostá většina českých piv obsahuje neprokvašený extrakt v rozmezí asi 3–12 %. Na druhé straně drtivá většina piv zahraničních je prokvašena úplně nebo téměř úplně (pod 1 %). Dále mají česká piva vyšší barvu, o něco vyšší pH a obsahují více hořkých látek. Naše piva mají také více celkových polyfenolů. Vyšší barva a vyšší obsah polyfenolů jsou důsledkem použití technologického postupu ve varně (tzv. dvourmutového dekokčního postupu), který se v českých pivovarech na

1 INTRODUCTION

Based on our previous research studies we succeeded in exact differentiating Czech from foreign Pilsener beers (Pilsner, Pils, Pilsener etc). It was found that one of the characteristic features of the Czech beer is the presence of unfermented extract. (That means Czech beers are consumed in the stage of secondary fermentation.) The majority of Czech beers contain unfermented extract, with amounts from 3 to 12 %. On the contrary, the majority of foreign beers are fully or almost fully fermented (the content of unfermented extract is lower than 1 %). In addition the Czech beers have a more intensive colour, a little higher pH and they contain more bitter compounds. Czech beers also contain more total polyphenols. The intensive colour and the higher content of polyphenols result from the use of a specific technology in the brewhouse –

rozdíl od zahraničí nejvíce používá. Ze sensorických charakteristik se pivo českého typu vyznačuje zejména vyšší plností chuti, hořkostí, delším dozíváním hořkosti a nižším výskytem cizích vůní a chutí [1]. Zejména tyto vlastnosti lze považovat za ideální z hlediska schopnosti piva pobízet k dalšímu napití. Úspěch českého piva pramení ze skutečnosti, že vyhovuje velmi dobře lidské fyziologii.

Vyšší obsah polyfenolů v českých pivech je velmi významným prvkem, který naše piva odlišuje od piv zahraničních, proto je předmětem našeho dalšího podrobného zkoumání v rámci výzkumného záměru MSM6019369701 „Výzkum sladařských a pivovarských surovin a technologií“. Z tohoto pohledu jsme rozšířili náš výzkum i na jednotlivé fenolové sloučeniny.

Polyfenoly se do piva dostávají ze surovin, tj. z ječmene, respektive ze sladu, chmele a chmelových preparátů jako přirozené přírodní složky, které mají vliv jak na jeho sensorické vlastnosti, tak i na celkovou trvanlivost výrobku. Jejich hlavními představiteli jsou flavonoidy, patří sem také deriváty kumarinu, chinony, ubichinony, deriváty chlorogenové kyseliny, volné fenolové kyseliny a další. Rozdělení a chemickou strukturu podrobně popsali Čepička a Karabín [2]. Přehledovou práci o polyfenolech publikoval Derdelinckx [3].

Přírodní polyfenoly jsou látky, které se obecně vyskytují v kůře, listech, kořenech a plodech rostlin. Jsou to látky s antioxidačními vlastnostmi. Díky tomu je jejich přítomnost v pivu velmi významná ze zdravotního hlediska. Antioxidanty jsou vlastně jakýmsi lapači radikálů a eliminují tak jejich škodlivé působení v lidském organismu [4].

Polyfenolům v pivu jsou přisuzovány účinky antioxidační, antimutagenní, antikarcinogenní, antimikrobiální, antitrombotické, antiflogistické, imunomodulační, dále regulují krevní tlak a hladinu krevní glukosy. Polyfenolové antioxidanty chrání před aterosklerózou, zvyšují rezistenci LDL proti oxidaci. Mají vazorelaxační a antikoagulační účinek [4, 5].

V pivech se vyskytují deriváty benzoové kyseliny a skořicové kyseliny, 4-hydroxyfenyloctová kyselina, salicylová kyselina, vanilin, chlorogenová kyselina, různé flavonoidy a další látky [6, 7].

V rámci mezinárodní spolupráce mezi VÚPS a bulharským partnerem jsme v rámci výzkumného záměru MSM6019369701 provedli porovnání obsahu jednotlivých polyfenolů v našich pivech s pivem na bulharském trhu. Pro porovnání jsou výsledky ještě doplněny analýzami zahraničních piv západoevropské provenience.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Analytické metody

Analýza polyfenolů probíhala v chromatografickém systému HPLC s binárním gradientem s využitím vysoce citlivého elektrochemického CoulArray detektoru s osmi grafitovými elektrodami v řadě s nastavenými potenciály 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mV vzestupně. Elektrochemicky aktivní látky eluované z chromatografické kolony procházely postupně řadou elektrod, kde při dosažení potenciálu charakteristického pro každý analyt, byly oxidovány. Byl měřen procházející proud, event. náboj, který byl úměrný koncentraci procházejícího analytu. Nejvyšší odezva (dominantní pik) při určitém nastaveném potenciálu byla použita pro kalibraci a stanovení každého analytu v jeho retenčním čase.

Pro separaci polyfenolů byla použita chromatografická kolona Synergi Hydro-RP 250x4 mm s velikostí částic sorbentu 4 µm. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a teplota kolony 35 °C.

Mobilní fáze byly tvořeny 0,005 M octanem amonným (čistota pro MS) a acetonitrilem (čistota pro gradient). Mobilní fáze A obsahovala 5 % acetonitrilu, mobilní fáze B obsahovala 50 % acetonitrilu, pH obou fází bylo upraveno na hodnotu 3 kyselinou mravenčí (čistota pro MS). Na kolonu bylo dávkováno 10 ml vzorku odplyněného piva zředěného mobilní fází A v poměru 1:1.

Pro analýzu byl použit gradient (tab. 1):

the two-mash decoction method. This technology is preferably used in Czech breweries but not in foreign breweries. Regarding the sensory characteristics Czech beers are especially characterized by higher palatability, bitterness, longer fading of bitterness and lower incidence of foreign odour and off-flavour [1]. In particular these attributes could be considered as ideal in terms of the ability to encourage beer consumption. The success of Czech beer stems from the fact that it complies very well with the human physiology.

As the higher content of polyphenols in Czech beers is a very important characteristic which distinguishes it from foreign beers, it became the topic of a further investigation in the framework of the Research Project MSM6019369701 "Research of Malting and Brewing Raw Materials and Technologies". Consequently our research was focused on the individual polyphenolic compounds.

The sources of polyphenols in beer are raw materials as barley or malt, hops and hop pellets. They are natural components, which influence both the sensory properties and the total stability of the beer. The most important polyphenols are flavanoids, derivatives of coumarin, chinons, ubichinons, derivatives of chlorogenic acid, free phenolic acids and some others. The division and structures are described by Čepička and Karabín [2]. The overview of the polyphenols was published by Derdelinckx [3].

In general the natural polyphenols occur in the cortex, the leaves, the roots, and the fruits of plants. Their presence in beer is significant from the health point of view due to their anti-oxidative effects. Antioxidants are a type of radical trap, thereby eliminating their harmful effects in human body [4].

Polyphenols in beer have anti-oxidative, anti-mutagenic, anti-carcinogenic, anti-microbial, anti-thrombotic, anti-inflammatory and immunomodulatory effects and they regulate blood pressure and blood glucose. Polyphenolic antioxidants protect against arteriosclerosis and enhance the resistance of LDL (Low Density Lipoprotein) against oxidation. They cause blood-vessel relaxation and have anti-coagulative properties [4, 5].

Beer contains derivatives of benzoic and cinnamic acids, 4-hydroxyphenyl acetic acid, salicylic acid, vanillin, chlorogenic acid, different flavanoids and other substances [6, 7].

In the international co-operation between Research Institute of Brewing and Malting (RIBM) and the Bulgarian partner, and in the framework of the Research Project MSM6019369701, the comparisons of the contents of individual polyphenols in Czech beers and beers available on the Bulgarian market were studied. The results were completed with analyses of foreign beers of Western European origin.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Analytical methods

The identification and determination of the polyphenols of interest was performed using a HPLC system with a binary gradient, equipped with a high sensitivity CoulArray detector with eight graphite electrodes in an ascending row with set potentials of 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 900 mV. Electrochemically active substances are eluted on a chromatographic column and then flow past the row of electrodes. When they reach the characteristic potential for the individual analyte they are oxidized. The resulting electric current respectively the electric charge, which is proportional to the concentration, was measured. The highest response (dominant peak) at each set potential was used for both, the calibration and the identification of the individual analytes with the corresponding retention time.

For the separation of the polyphenols the chromatographic column Synergi Hydro-RP 240 x 4.0 mm with a 4 µm film thickness was used. The column temperature was 35 °C and an isocratic mobile phase flow rate of 0.8 ml/min was applied. The mobile phase was composed of ammonium acetate (5 mmol/l) and acetonitrile. All reagents were

Tab. 1 Gradient mobilní fáze / Mobile phase gradient

Čas / Time (min)	Mobilní fáze A / Mobile phase A (%)	Mobilní fáze B / Mobile phase B (%)
0–5	100	0
5–18	100–87	0–13
18–77	87–79	13–21
77–120	79–5	21–95
120–125	5–0	95–100

Tab. 2 Charakteristika jednotlivých skupin ležáků z hlediska vybraných parametrů / *Characteristics of individual groups of lager beers in terms of chosen parameters*

	Tuzemské ležáky <i>Domestic lagers</i>	Bulharské ležáky <i>Bulgarian lagers</i>	Zahraniční ležáky <i>Foreign lagers</i>
Rozdíl prokvašení <i>Attenuation difference (%)</i>	6.5	1.3	0.8
Barva (j. EBC) <i>Colour (EBC units)</i>	11.9	8.5	8.9
Hořké látky (j. EBC) <i>Bitter substances (EBC units)</i>	27.2	23.9	23.3
pH	4.52	4.33	4.40
Polyfenoly / <i>Polyphenols (mg/l)</i>	152	120	104
Diacetyl / <i>Diacetyl (μg/l)</i>	60	73	28

Analýza byla ukončena v 125. minutě. Od 126 do 127 min proběhlo elektrochemické čištění cel při 100 % B. Od 127 do 145 min byla kolona ekvilibrována fází A (100 %).

Chemické rozbory pív včetně analýzy celkových polyfenolů, antihokyanogenů a flavanoidů byly provedeny podle Analytiky EBC [8].

2.2 Použité vzorky pív

Ke stanovení jednoduchých polyfenolových látek bylo použito celkem 16 tuzemských ležáků, 12 tuzemských výčepních pív, 5 bulharských výčepních pív, 6 bulharských ležáků a 12 zahraničních ležáků

of analytical reagent grade quality unless otherwise specified. The mobile phase A contained 5% of acetonitrile. The mobile phase B contained 50% of acetonitrile. Both phases have pH 3 adjusted with formic acid. The sample size was 10 ml of degassed beer diluted with the mobile phase A in the proportion 1 : 1.

For the analysis a mobile phase gradient was used (Tab. 1).

The analysis was terminated after 125 minutes. Then from 126 to 127 minutes the electrochemical cells were cleaned with mobile phase B (100%). Afterwards, from 127 to 145 minute the column was equilibrated with mobile phase A (100%).

All chemical beer analyses including the determination of total po-

Tab. 3 Obsah jednoduchých polyfenolů v českých, bulharských a jiných zahraničních pivech / *The content of simple polyphenols in Czech, Bulgarian and others foreign beers*

Polyfenolová látka / <i>Polyphenolic compound</i> (mg/l)	Tuzemské ležáky / <i>Domestic lager</i> beers	Zahraniční ležáky / <i>Foreign lager</i> beers	Bulharské ležáky / <i>Bulgarian lager</i> beers	Tuzemské výčepní pivo/ Domestic draft beers	Bulharské výčepní pivo/ Bulgarian draft beers
Gallová kyselina <i>Gallic acid</i>	0.104	0.052	0.076	0.106	0.119
Protokatechová kyselina <i>Protocatechuic acid</i>	0.170	0.118	0.106	0.116	0.108
p-Hydroxybenzoová kyselina <i>p-Hydroxybenzoic acid</i>	6.15	7.64	22.28	7.66	21.25
4-Hydroxyfenyloctová kyselina <i>4-Hydroxyphenylacetic acid</i>	1.04	0.48	0.24	0.51	0.41
Katechin / <i>Catechin</i>	1.50	1.41	1.72	1.72	1.49
Chlorogenová kyselina <i>Chlorogenic acid</i>	0.212	0.113	0.093	0.191	0.199
Kávoá kyselina <i>Caffeic acid</i>	0.153	0.063	0.151	0.150	0.179
Syringová kyselina <i>Syringic acid</i>	0.154	0.120	0.189	0.152	0.190
Epikatechin <i>Epicatechin</i>	0.425	0.270	0.330	0.463	0.362
Vanilová kyselina <i>Vanillic acid</i>	0.921	0.544	0.872	0.568	0.996
Vanilin / <i>Vanillin</i>	0.030	0.050	0.030	0.142	0.048
p-Kumarová kyselina <i>p-Coumaric acid</i>	0.987	0.421	0.842	0.686	0.819
Umbeliferon <i>Umbelliferone</i>	0.267	0.269	0.246	0.344	0.863
Skopoletin / <i>Scopoletin</i>	0.446	0.318	0.319	0.234	0.324
Ferulová kyselina <i>Ferulic acid</i>	3.75	1.65	2.66	2.75	2.77
Sinapová kyselina <i>Sinapic acid</i>	0.603	0.321	0.546	0.566	0.402
Rutin / <i>Rutin</i>	1.254	0.719	0.159	0.606	0.324
4-Hydroxykumarin <i>4-Hydroxycoumarin</i>	9.85	3.14	2.84	–	–
Naringin / <i>Naringin</i>	3.88	3.63	4.14	4.62	2.67
Myricetin / <i>Myricetin</i>	0.148	0.150	0.044	0.388	0.089
Kvercetin / <i>Quercetin</i>	0.104	0.188	0.052	0.108	0.051
Apigenin / <i>Apigenin</i>	1.37	0.56	0.36	0.73	0.32

západní provenience. Piva byla vybrána tak, aby zahrnovala reprezentativní vzorek dané kategorie.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Charakteristika bulharských piv

U všech vybraných piv byl proveden základní chemický rozbor, dosažitelné prokvašení, barva, hořké látky, pH, celkové polyfenoly a vicinální diketony. Vzhledem k značnému souboru získaných dat byly pro piva typu ležák v jednotlivých kategoriích vypočteny pro vybrané parametry průměry (tab. 2).

Jak je z tab. 2 patrné, složení bulharských ležáků je spíše podobné zahraničním ležákům než českým, jak o tom svědčí nízký rozdíl prokvašení, nízká barva, hořké látky i barva a rovněž nižší obsah celkových polyfenolů.

3.2 Obsah jednoduchých polyfenolových látek v dodaných pivech

Ve všech dodaných pivech byly stanoveny jednoduché polyfenolové látky. Vzhledem ke značnému rozsahu byly výsledky pro jednotlivé kategorie piv zprůměrovány (tab. 3).

Lze konstatovat, že ve většině jednoduchých polyfenolů neexistují velké rozdíly mezi jednotlivými typy piv. Výjimkou je např. vyšší hodnota hydroxykumarové kyseliny v bulharských pivech; důvodem může být např. specifická skladba surovin.

Pokud jde o porovnání našich výsledků se zahraniční literaturou [11, 12], jsou vcelku v dobré shodě. Poněkud vyšší hodnoty oproti našim výsledkům naměřili autoři [11] v případě kyseliny gallové, chlorogenové a protocatechové.

3.3 Vliv obsahu jednoduchých polyfenolů na výsledek uzančnických metod stanovení polyfenolových látek

Aby bylo možné posoudit, jak se projeví obsah jednoduchých po-

lyphenols, anthocyanogens and flavanoids were carried out according to the EBC Analytica [8].

2.2 Beers studied

For the analyses of simple polyphenolic compounds a total of 16 domestic lager beers, 12 domestic draft beers, 5 Bulgarian draft beers, 6 Bulgarian lager beers and 12 foreign lager beers from Western Europe were used. The beers have been selected to include a representative sample for each category.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characteristics of Bulgarian beers

All basic chemical beer analyses such as alcohol, original gravity, attenuation limit, colour, content of bitter acids, pH, total polyphenols and content of vicinal diketones were performed for beer samples studied. The results given in Tab. 2 are the average values for some significant parameters.

The composition of Bulgarian lager beers in terms of lower attenuation difference, lower pH, colour and a lower content of bitter substances and polyphenols (as given in Table 2) show that they are more similar to foreign lager beers than to Czech lager beers.

3.2 Content of simple polyphenolic compounds in the beers studied

The simple polyphenolic compounds were determined for all the beer samples. Because of the multitude of dates the results shown in Tab. 3 were averaged for each beer category.

It could be noted that no big differences among the contents of the majority of simple polyphenols were found except for higher values of hydroxycoumaric acid in Bulgarian beers. This could possibly result from the specific composition of the raw materials.

Tab. 4 Vliv přídavku vybraných jednoduchých polyfenolových látek v množství 100 mg do l piva na výsledky uzančnických skupinových metod / The impact of a simple polyphenol when added to beer in a concentration of 100 mg/l on the results determined by means of conventional group methods

	Látka / Compound	Celkové polyfenoly / Total polyphenols	Anthokyanogeny / Anthocyanogens	Flavanoidy / Flavanoids
		mg/l	mg/l	mg/l
	Bez přídavku polyfenolů / Without polyphenol addition	144	37.1	11.8
1	Gallová kyselina / <i>Gallic acid</i>	505*	36.4	11.7
2	Vanilová kyselina / <i>Vanillic acid</i>	146	37.7	12.2
3	Naringin / <i>Naringin</i>	148	39.2	12.1
4	Eskulin / <i>Esculin</i>	146	37.7	11.9
5	Ferulová kyselina / <i>Ferulic acid</i>	147	36.3	11.8
6	4-Hydroxybenzoová kyselina/ 4-Hydroxybenzoic acid	147	36.7	11.9
7	4-Hydroxykumarin / 4-Hydroxycoumarin	144	35.3	11.8
8	Kvercetin / <i>Quercetin</i>	303	36.9	11.7
9	Epikatechin / <i>Epicatechin</i>	328	38.2**	102.5***
10	Katechin / <i>Catechin</i>	333	36.5**	102.5***
11	Kumarová kyselina / Coumaric acid	146	36.9	12.0

Poznámky:

* látka č. 1 – celkové polyfenoly: barva červenohnědá, výrazně zkreslující, při aplikaci nižšího přídavku gallové kyseliny do piva se zbarvení progresivně zvyšuje (přídavek 50 mg/l: odpovídá 449 mg/l celkových polyfenolů, přídavek 25 mg/l: odpovídá 367 mg/l celkových polyfenolů)

** látky č. 9 a 10 – anthokyanogeny: neodpovídající medově růžová barva

*** látky č. 9 a 10 – flavanoidy: vzorek musel být naředěn 5 x, absorpance neředěného vzorku byla příliš vysoká

Notes:

*Compound No. 1 - total polyphenols: red-brown colour, greatly distorting, with the application of lower addition levels of gallic acid the colouration of beer increases progressively (addition of 50 mg/l corresponds to 449 mg/l of total polyphenols; addition of 25 mg/l corresponds to 367 mg/l of total polyphenols)

**Compounds No. 9 and 10 - anthocyanogens: inadequate honey pink colour

***Compounds No. 9 and 10 - flavanoids: the sample had to be diluted 5 times, due to too high absorbance of the undiluted sample.

lyfenolových látek ve výsledku běžných uzančních metod, byl proveden následující pokus. Bylo vybráno celkem 11 typických jednoduchých polyfenolů, které byly přidány v množství 100 mg/l do piva, a v těchto vzorcích byly stanoveny celkové polyfenoly, anthokyanogeny a flavanoly. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

Z tabulky je patrné, že některé jednoduché polyfenoly přítomné v pivu mohou ovlivnit výsledky uzančních skupinových metod, ale ne nijak významně. Např. gallová kyselina se silně zbarvuje přidáním činidla při stanovení celkových polyfenolů, vzhledem k jejímu nízkému množství v pivu (kolem 0,1 mg/l) se to v jejím obsahu téměř neprojeví. Zvýšení obsahu flavanoidů v případě katechinu a epikatechinu je logické, neboť právě katechin slouží jako standard této metody. Obsah anthokyanogenů nebyl významně ovlivněn žádnou z těchto látek.

4 ZÁVĚR

V první části práce bylo zjištěno, že složení bulharských ležáků je spíše podobné zahraničním ležákům než českým, jak o tom svědčí nízký rozdíl prokvašení, nízká barva, hořké látky i barva a rovněž nižší obsah celkových polyfenolů. Z toho vyplývá, že i z tohoto hlediska je složení českého piva výjimečné.

V další části práce byla věnována pozornost obsahu jednoduchých polyfenolů. Ten v různých typech piv značně kolísá a zatím nebyl nalezen žádný vztah např. ke stupňovitosti, obsahu celkových polyfenolů, anthokyanogenů atd. Je to zřejmě způsobeno tím, že hladina těchto jednoduchých polyfenolů je značně ovlivněna skladbou surovin, varním postupem a pravděpodobně také stabilizačním postupem.

Dále bylo zjištěno, že výsledky skupinových metod stanovení celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavanoidů nejsou ovlivněny přítomností těchto jednoduchých fenolických sloučenin nebo jen v zanedbatelné míře, a to vzhledem k nízké koncentraci těchto látek v pivu.

Poděkování

Práce byla podporována výzkumným záměrem MSM6019369701 „Výzkum sladařských a pivovarských surovin a technologií“ (MŠMT ČR). Byla součástí mezinárodní spolupráce VÚPS, a. s., Praha a IBHI Sofia (Institut po kriobiologia i hranitelni tehnologii, Zemědělská akademie Bulharska).

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 6. 12. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 25. 2. 2010

In comparison to results from other studies [11, 12] a reasonably good agreement was found. Slightly higher values were measured for gallic acid, chlorogenic acid, and protocatechuic acid [11].

3.3 The impact of simple polyphenols on the results obtained by using conventional methods for the determination of polyphenolic compounds

To assess the impact of simple polyphenol compounds on the determination of the total polyphenols by means of conventional methods the following experiment was performed.

A total of 11 representative simple polyphenols was chosen and then added to beer up to a final concentration of 100 mg/l. In these beer samples total polyphenols, anthocyanogens, and flavanoids were determined. The results are given in the Tab. 4.

The results given in the Tab. 4 show that some simple polyphenols present in beer influence the results determined by means of conventional group methods, but not significantly. For example gallic acid strongly stains the reagent added during the determination of total polyphenols. However, because of its low concentration in beer (about 0.1 mg/l) the impact on the results determined is negligible. The higher results for the determination of catechin and epicatechin are clear since catechin is used as a standard substance in this method. The determination of anthocyanogens wasn't significantly influenced by any of these compounds.

4 CONCLUSION

In the first part of this study it was demonstrated that the composition of Bulgarian lager beers resemble more foreign lager beers than Czech lager beers as evident from colour, the lower attenuation difference, content of bitter compounds and total polyphenols. Obviously the composition of Czech beer is unique.

The following part of the study shows the contents of simple polyphenols. The content of simple polyphenols in beers varies considerably. Up to now no relationship such as to the degree of attenuation, the content of total polyphenols or the content of anthocyanogens was found. The probable explanation is that the content of these simple polyphenols is considerably influenced by the composition of raw materials, the brewing method and apparently also by the stabilization method.

Furthermore it was proven that the results of the determinations according to conventional group methods for total polyphenols, anthocyanogens and flavanoids are not, or only negligibly influenced by the presence of simple polyphenols due to their low concentrations in beer.

Acknowledgments

This study was accomplished in framework of The Research Project MSM6019369701 "Research of Malting and Brewing Raw Materials and Technologies" with the financial support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. It was a part of an international collaboration of RIBM Plc., Prague and IBHI Sofia (Institut po kriobiologia i hranitelni tehnologii, Academy of Agriculture, Bulgaria).

Translated by Eva Paterson

LITERATURA / REFERENCES

- Čejka, P., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M.: Charakterizace piva českého typu. *Kvasny Prum.* **50**, 2004, 3–11.
- Čepička, J., Karabín, M.: Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty. *Chem. Listy* **96**, 2002, 90–95.
- Derdelinckx, G.: Polyphenols in Wort and Beer: State of the Art in 2008: Where and Why? *Cerevisia* **4**, 2008, 174–187.
- Kellner, V., Čejka, P., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M.: Pozitivní přínosy piva ke zdraví spotřebitele. *Kvasny Prum.* **48**, 2002, 244–248.
- Piendl, A., Biendl, M.: Physiological significance of polyphenols and hop bitters in beer. *Brauwelt Int.* **18**, 2000, 310–317.
- Kellner, V., Jurková, M., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P.: Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsner type. *Brewing Science* 2007, Jan./Feb., 5–10.
- Kellner, V., Mikyška, A., Prokeš, J., Hašková, D., Čejka, P., Čulík, J.: The influence of malt polyphenols and individual phenolic substances on beer quality and colloidal and sensory stability. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congress, Prague, May 2005*, contr. 61.
- Analytica EBC, European Brewery Convention, 5. vydání, Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 2008.
- Jandera, P., Grynová, L., Škopová, G.: Analýza přirozených antioxidantů v pivech gradientovou HPLC s multielektrodovým elektrochemickým detektorem CoulArray. *CHEMagazín* **12**, 2002, 8–10.
- Jandera, P., Škeříková, V., Řehová, L., Hájek, T., Baldriánová, L., Škopová, G., Kellner, V., Horna, A.: RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using CoulArray detector. *J. Sep. Sci.* **28**, 2005, 1005–1022.
- Floridi, S., Montanami, L., Marconi, O., Fantozzi, P.: Determination of free phenolic acid in wort and beer by coulometric array detection. *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 2003, 1548–1554.
- Achilli, G., Cellerino, G. P., Gamace, P. H.: Identification and determination of phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode system. *J. Chromatogr.* **632**, 1993, 111–117.