

JEDNODUCHÉ METODY TESTOVÁNÍ ANTIOXIDANTŮ A PROOXIDANTŮ PIVA

Doc.Ing. JAN ŠAVEL, Csc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Budějovický Budvar, n. p., Č.Budějovice

Klíčová slova: pivo, antioxidanty, prooxidanty, stárnutí piva, metody testování

1. ÚVOD

Stárnutí piva se stává jedním z klíčových problémů pivovarského výzkumu a technologie. V současnosti se všeobecně uznává platnost radikálové teorie, podle níž se při stárnutí uplatňují zejména radikály organických i anorganických sloučenin, nebo sloučeniny, které podporují průběh radikálových procesů. Zvláštní význam přitom mají sloučeniny kyslíku, popř. jeho excitované stavy. V literatuře se rozlišuje mezi kyslíkovými volnými radikály (oxygen free radicals – OFRs) a širší kategorií, která se nazývá aktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS) [1].

Obecná platnost těchto dějů přitahuje pozornost lékařského, biochemického a potravinářského výzkumu. Ukázalo se, že aktivní formy kyslíku sice poškozují lidský organismus v průběhu mnoha závažných onemocnění, ale že se také mohou podílet na obranných reakcích organismu, např. proti mikrobiální infekci. Každoroční ztráty potravinářských výrobků po ukončení jejich trvanlivosti dosahují extrémních částek a představují množství zbytečně vynaložené práce i úsilí.

Nežádoucím oxidačním dějům mohou alespoň částečně zabránit antioxidanty, které mohou zahrnovat látky přírodního původu i připravené uměle. Prokázalo se, že tyto sloučeniny mohou snížit výskyt civilizačních chorob, omezit škodlivé vlivy znečištěného prostředí a potlačit vlivy nadměrného příjmu živočišných tuků a kouření [2]. V pivovarské literatuře se průzkumem antioxidantů zabývali Walters et al., kteří měřili obsah karbonylových sloučenin při stárnutí piva s přidanými antioxidanty přírodního původu [3]. Kromě antioxidantů se v pivu mohou vyskytovat i látky, podporující průběh oxidačních dějů, tzv. prooxidanty, např. některé polyfenoly [4].

V předchozích sděleních jsme prokázali, že škodlivé působení oxidace při stárnutí lze výrazně zrychlit působením vhodných oxidačních činidel, např. peroxodisíranů [5]. Reakci peroxodisíranů s aminokyselinami a vyššími alkoholy se podařilo připravit těkavé sloučeniny aldehydické povahy, z nichž některé silně absorbovaly v ultrafialové oblasti, zejména v rozsahu vlnových délek 200–240 nm [6].

V minulém roce uveřejnili Klein et al. metodu, hodnotící stárnutí piva po přehánění vodní párou podle plochy pod absorpční křivkou v rozmezí 240–310 nm [7]. Hodnota tzv. absorpčního integrálu (AI) úzce souvisela s hodnotami smyslového hodnocení piva při stárnutí.

Lze očekávat, že velké citlivosti některých aminokyselin a vyšších alkoholů k oxidačním vlivům by se mohlo využít k testování antioxidantů a prooxidačních vlastností různých látek.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie a roztoky

Peroxodisíran draselný, 2-furfural (MERCK, SRN), furfurylalkohol, 5-methyl-2-furfural, benzaldehyd, kyselina ferulová, (+) katechin hydrát, DL-methionin, DL-fenylalanin, L-cystein (FLUKA, Švýcarsko), 2-acetylfuran, fenylacetaldehyd (ALDRICH) benzylalkohol (LACHEMA, BRNO), ethanol 96,5 % rafinovaný, jemný (Lihovar Chrudim, ČR). Roztoky všech látek se připravovaly rozpouštěním v destilované vodě.

2.2 Roztoky antioxidantů

Chmelový a čajový výluh se připravily podle dříve popsaného postupu [8], roztok provozní sladiny obsahoval 12 % extraktu. Před stanovením antioxidantních vlastností se tyto roztoky desetkrát zředily destilovanou vodou. Jako další potenciální an-

tioxidanty se testovaly roztoky kyseliny ferulové ($c = 200 \text{ mg.l}^{-1}$), cysteinu ($c = 20 \text{ mg.l}^{-1}$), (+) katechinu ($c = 200 \text{ mg.l}^{-1}$), kyseliny askorbové ($c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$) a ethanolu ($c = 10 \%$), které se již přidávaly dále neředěné.

2.3 Destilační test antioxidantních vlastností

K 50 ml roztoku fenylalaninu nebo 2-fenylethanolu ($c = 100 \text{ mg.l}^{-1}$) se přidalo 50 ml roztoku antioxidantu a 0,2 ml roztoku peroxodisíranu draselného ($c = 5 \%$) a směs se přeháněla vodní párou. Z původních 100 ml se během 10 min přehnalo 50 ml destilátu a po doplnění na 100 ml destilovanou vodou se posoudila vůně obou vzorků a změřilo se absorpční spektrum proti destilované vodě. V srovnávacím pokusu se místo roztoku antioxidantu přidala destilovaná voda.

2.4 Čichový test antioxidantních vlastností

K 10 ml roztoku methioninu nebo fenylalaninu ($c = 200 \text{ mg.l}^{-1}$) se přidalo 10 ml roztoku antioxidantu a 0,4 ml roztoku peroxodisíranu draselného ($c = 0,5 \%$). Směs ve zkumavce se po uzavření zátkou zahřívala 1,5 h při 60°C a po ochlazení na 20°C se posoudila vůně vzorku ve srovnání se slepým pokusem s přidavkem destilované vody.

2.5 Zákalový test antioxidantních vlastností

K 100 ml roztoku fenylalaninu nebo 2-fenylethanolu ($c = 100 \text{ mg.l}^{-1}$) se přidalo 100 ml roztoku antioxidantu a 0,5 ml roztoku peroxodisíranu amonného ($c = 40 \%$), roztok se zahříval 3 h při 60°C na vodní lázni a po ochlazení na 20°C se změřil zákal. Ve slepém pokusu se místo roztoku antioxidantu přidala destilovaná voda.

2.6 Přehánění vodní párou

Vzorky meziproduktů, vytřepaného piva i čistých látek se přeháněly vodní párou. Ze 100 ml vzorku se během 10 min přehnal 50 ml destilátu a po doplnění destilovanou vodou na 100 ml se proměřilo absorpční spektrum proti destilované vodě.

2.7 Přístroje a zařízení

Hodnoty absorbancí a absorpční spektra se měřila spektrofotometrem CADAS 100 (Dr.B.Lange, SRN) v 1 cm křemenné kyvetě s programy TEST a PCSCAN s intervalem měření 1 nm. Zákal se měřil zákalometrem LTP 6B (Dr.B.Lange, SRN).

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

V předchozím sdělení jsme prokázali, že absorpční pás těkavých produktů piva mezi 240 až 310 nm, používaný v práci Kleina et al. [7], může zahrnovat nejen absorbanci furfuralu s maximem při 280 nm, ale také benzaldehydu s maximem při 250 nm [6]. Pro kvantifikaci těchto výsledků jsme změřili absorpční spektra při různé koncentraci čistých látek (obr. 1, tab. 1).

K současnému stanovení furfuralu a benzaldehydu lze teoreticky využít změření vzorku při 250 a 280 nm, neboť platí lineární vztahy:

$$A_{250}/d = (\epsilon_{250})_F \cdot c_F + (\epsilon_{250})_B \cdot c_B$$

$$A_{280}/d = (\epsilon_{280})_F \cdot c_F + (\epsilon_{280})_B \cdot c_B$$

kde A_{250} , A_{280} jsou absorbance při 250 a 280 nm, ϵ_{250} , ϵ_{280} – absorpční koeficienty furfuralu nebo benzaldehydu (F = furfural,

B = benzaldehyd), c_F , c_B – koncentrace furfuralu, nebo benzaldehydu a d – tloušťka vrstvy.

Protože furfural se obecně považuje za indikátor tepelného poškození a benzaldehyd souvisí s oxidačním poškozením, rozšiřují se možnosti posouzení změn při stárnutí piva. Z obr. 2 je zřejmé, že absorpční pásy benzaldehydu a furfuralu se mohou překrývat a vytvářet tak složený absorpční pás mezi 240 až 310 nm.

Kromě složeného absorpčního pásma mezi 240 až 310 nm je pro těkavé produkty piva i sladiny typický silný absorpční pás mezi 200 až 240 nm. V této oblasti silně absorbují některé aromatické i heterocyklické aminokyseliny, které jsou sice netěkavé, ale jejich oxidací je možné opět získat silně absorbující těkavé produkty [6]. Jako možné oxidační produkty fenylalaninu lze očekávat benzaldehyd a fenylacetaldehyd, popř. příslušné alkoholy fenylethanol a benzylalkohol, vznikající při hlavním kvašení.

Absorpční spektra těchto sloučenin uvádějí obr. 2 a 3. Pro porovnání se uvádějí i spektra furfurylalkoholu a furfuralu. Z obrázků lze odhadnout polohu absorpčních maxim a absorpční koeficienty aldehydů a alkoholů okolo 200 nm. Vzhledem k tvaru absorpční křivky fenylacetaldehydu (obr. 3) doporučujeme měřit absorbanci při 208 nm.

Výrazný absorpční pás v okolí 200 nm může zahrnovat 2-fenylethanol i fenylacetaldehyd. V této oblasti rovněž absorbují

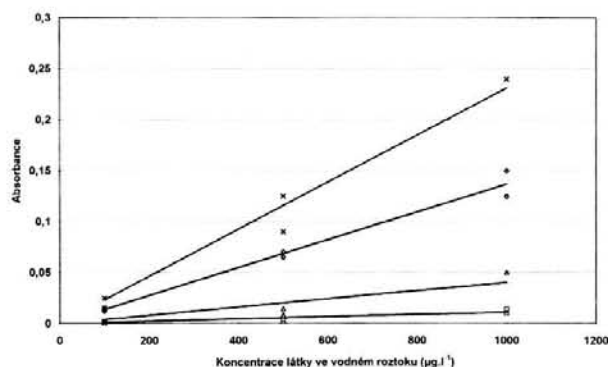
Tab. 1 Odhad hodnot absorpčních koeficientů čistých látek

Sloučenina	Vlnová délka (nm)	Absorpční koeficient	
		molární ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)	hmotnostní ($\text{g}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)
2-fenylethanol	208	8430	69
Fenylacetaldehyd	208	9977	83
Benzaldehyd	208	21224	200
Benzaldehyd	250	14857	140
Benzaldehyd	280	1167	11
2-furfural	250	3844	40
2-furfural	280	22197	231

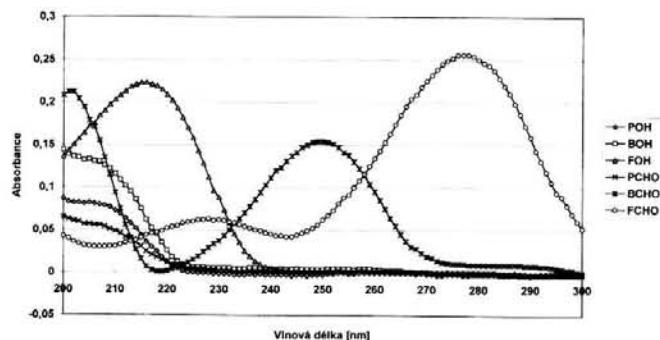
benzaldehyd, benzylalkohol, furfural a furfurylalkohol, v pivu se ovšem výrazněji uplatňují zejména 2-fenylethanol, furfural a benzaldehyd. Ačkoliv se výsledné absorpční křivky těkavých produktů piva a meziproduktů skládají z příspěvků různých sloučenin, lze alespoň přibližně usuzovat na podíl těkavých látek nejvíce zastoupených v destilátu po přehánění vodní párou.

Při zanedbání ostatních příspěvků je teoreticky možné vypočítat obsah benzaldehydu a furfuralu změřením absorbancí při 250, 280 nm a odečtením očekávané hodnoty pro benzaldehyd při 208 nm stanovit absorbanci zahrnující příspěvky 2-fenylethanolu a fenylacetaldehydu. Protože spektra 2-fenylethanolu a fenylacetaldehydu jsou podobná, není již další rozlišení možné, ale přesto lze stanovením absorbancí při 208, 250 a 280 nm získat cenné informace o stárnutí piva a oxidaci mladiny.

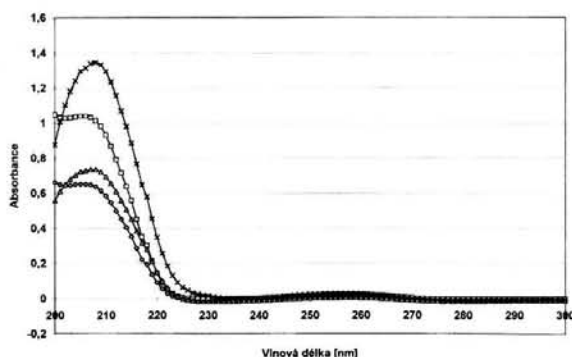
Podle literárních údajů se v hotovém pivu



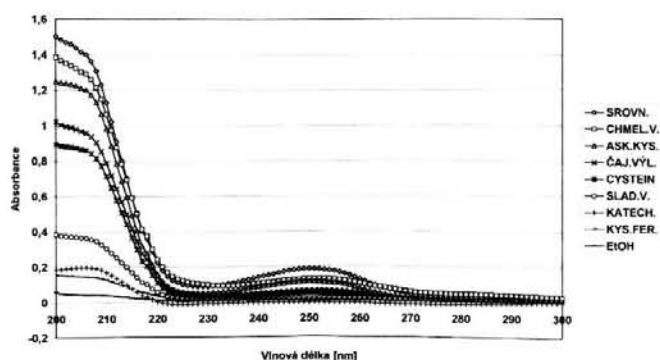
Obr. 1 Závislost absorbance při 250 a 280 nm vodných roztoků benzaldehydu (B) a 2-furfuralu (F) na jejich koncentraci.



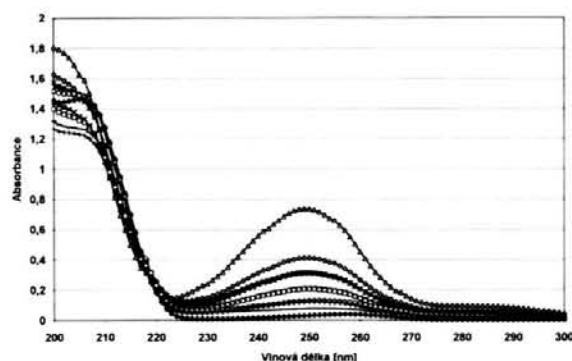
Obr. 2 Absorpční spektra vodných roztoků alkoholů a aldehydů ($c = 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). P-fenyl, B-benzyl, F-furfuryl.



Obr. 3 Absorpční spektra vodných roztoků 2-fenylethanolu a fenylacetaldehydu ($c = 10$ a $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)



Obr. 4 Vliv přidavku antioxidantů na změnu absorpčního spektra při oxidaci fenylalaninu



Obr. 5 Vliv přidavku antioxidantů na změnu absorpčního spektra při oxidaci 2-fenylethanolu (2-FOH)

vyskytuje 2-fenylethanol ($8\text{--}35\text{ mg.l}^{-1}$), a furfurylalkohol ($0,2\text{--}8\text{ mg.l}^{-1}$) [9]. Z aromatických aldehydů se v čerstvém a starém pivu vyskytuje fenylacetaldehyd ($45\text{--}250\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), benzaldehyd ($4\text{--}50\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$) a furfural ($40\text{--}3000\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$). V pivu s vysokým obsahem vzduchu se po 4 týdnech při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ vyskytoval benzaldehyd až v množství 13 mg.l^{-1} , furfural 45 mg.l^{-1} a fenylacetaldehyd až 1 mg.l^{-1} [10].

Mladina obsahuje benzylalkohol ($10\text{--}30\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), 2-fenylethanol ($100\text{--}300\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), benzaldehyd ($6\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), fenylacetaldehyd ($5\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), furfurylalkohol ($200\text{--}2780\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$) a furfural ($150\text{--}300\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$) [9].

V úvahu přicházejí i deriváty furanu, např. 5-methyl-2-furaldehyd s absorpčním koeficientem $\epsilon_{280} = 250\text{ g}^{-1}\text{.l.cm}^{-1}$ a 2-acetylfuran s absorpčním koeficientem $\epsilon_{280} = 150\text{ g}^{-1}\text{.l.cm}^{-1}$, jak jsme stanovili proměněním roztoků těchto látek v destilované vodě.

Hodnoty absorpčních, získaných při měření destilátů těkavých látek z čerstvého stočeného 12 % piva v 1 cm kyvetě, se podle našich zkušeností pohybují při 208 nm okolo 1 absorpční jednotky (AU), při 250 a 280 nm okolo 0,05 AU.

Podle Kleina byla absorbance destilátů čerstvých pív měřena v 5 cm kyvetě při 250 nm asi 0,5 AU, při 280 nm asi 0,3 AU. Stárnutím se tyto hodnoty zvýšily asi o 0,2 AU [7].

Podle tabulky 1 odpovídá hodnotě 1 AU při 208 nm koncentrace $14,4\text{ mg.l}^{-1}$ 2-fenylethanolu, hodnotě 0,05 AU při 250 nm koncentrace $357\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ benzaldehydu a hodnotě 0,05 AU při 280 nm koncentrace $216\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ furfuralu, což velmi přibližně odpovídá údajům literatury, přihlídneme-li se ke skládání absorpčních pásů v úvahu přicházejících sloučenin.

Rozdíly jsou také pravděpodobně způsobeny nepřesným měřením nízkých absorpčních při 250 a 280 nm a rozdílnou výtěžností jednotlivých látek při přehánění vodní párou.

Z těchto výsledků je patrné, že látky uváděné v tabulce 1 se mohou podílet na tvaru absorpčního spektra těkavých produktů piva a že jejich detailní stanovení je možné pouze separační technikou, např. plynovou chromatografií. Přímý výpočet podle rovnic v odstavci 3 není proto pravděpodobně dostatečně přesný u stočených pív, ale mohlo by se ho pravděpodobně využít k odhadu

koncentrace složek po oxidaci fenylalaninu nebo 2-fenylethanolu peroxodisíranem draselným.

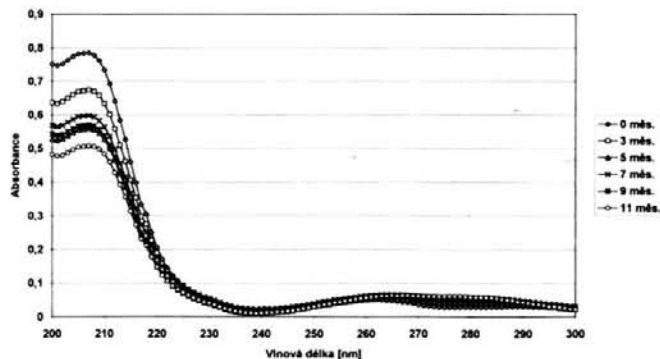
V destilačním testu podle odstavce 2.3 přídavek potencionálních antioxidantů ovlivňoval množství a druh těkavých produktů fenylalaninu a 2-fenylethanolu, jak vyplývá ze změn absorpčních spekter těkavých produktů oxidace (obr. 4 a 5). Z obr. 4 je patrný rozdílný stupeň potlačení tvorby těkavých produktů při oxidaci fenylalaninu, charakterizovaný polohou maxim při 208 a 250 nm.

Tvorbu těkavých produktů nejméně potlačoval chmelový výluh, pak ve vzestupném pořadí následovaly kyselina askorbová, čajový výluh, cystein, sladina, katechin, kyselina ferulová a ethanol. Zvláště výrazný je účinek ethanolu, zde je však nutné přihlížet také k jeho vysoké koncentraci.

Tyto závěry se poměrně dobře shodují s výsledky čichového testu (odst. 2.4), v němž silnou květinovou vůni po oxidaci fenylalaninu téměř potlačovaly kyselina ferulová, sladina, katechin a ethanol, méně chmelový výluh a kyselina askorbová. Podobné výsledky se získaly s methioninem, kde antioxidanty potlačovaly tvorbu silné vůně po sirných sloučeninách (zkažené zelí). Při oxidaci fenylalaninu nebo methioninu s přídavkem cysteinu v obou případech rušila tvorba cizí vůně po sirovodíku, související patrně s oxidací cysteinu.

Při oxidaci 2-fenylethanolu nebylo pořadí antioxidantů již tak jednoznačné a kyselina askorbová naopak vykazovala silné prooxidační vlastnosti podle hodnot absorbance při 208 a 250 nm (obr. 5). Katechin, kyselina ferulová a ethanol patřily podobně jako při oxidaci fenylalaninu mezi silné antioxidanty.

Přes poměrně dobrou shodu výsledků u většiny antioxidantů, získaných při oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu, nelze vyloučit ani další mechanismus těchto reakcí, spočívající v rozdílném stupni oxidace



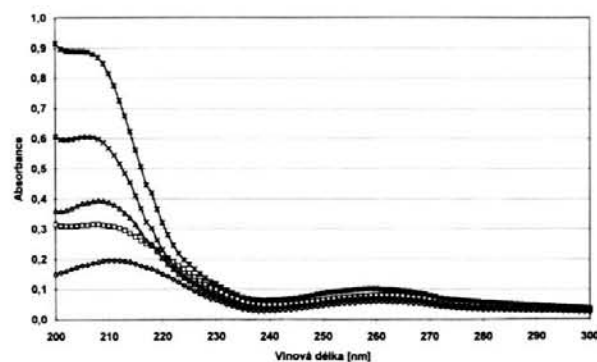
Obr. 6 Absorpční spektra destilátů 12% pív, skladovaných 0–11 měsíců při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$

již vytvořených těkavých produktů přes meziprodukty, např. benzaldehyd až na senzoričky inaktivní sloučeniny. Potlačení tvorby vůně i těkavých sloučenin, absorbujících v UV světle by se pak mohlo vysvětlit přeoxydací těkavých sloučenin. Tento mechanismus lze např. zaznamenat při oxidaci fenylalaninu i 2-fenylethanolu vyšší koncentrací peroxodisíranu draselného.

Tyto závěry se ověřovaly záznamem absorpčních spekter různých starých pív (obr. 6). Legenda obrázku udává dobu uložení rozdílných vzorků 12% pív při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, stočených v různé době a hodnocených proto s různou dobou skladování 0 až 11 měsíců. Se stářím piva sice většinou klesala absorbance při 208 nm a stoupala absorbance při 280 nm, ale tento trend nelze pokládat za obecný, neboť jednotlivá piva se mohla rovněž lišit počátečním obsahem 2-fenylethanolu i fenylalaninu. Proto bude nutné zaznamenat změny spekter při stárnutí u stejných vzorků pív. Je všeobecně známo, že při stárnutí piva vzniká 2-furfural, silně absorbující okolo 280 nm [7].

Absorbance destilátů těkavých látek při 250 a 280 nm může také sloužit jako jednoduchá míra tvorby aromatických těkavých látek při kvašení (obr. 7). V průběhu kvašení se primárně vznikající těkavé aldehydy redukuji na alkoholy, což se projevuje posunem absorpčních maxim jednotlivých složek. Tvorba silně absorbujících sloučenin při kvašení souvisí s přeměnou aromatických aminokyselin a lze je např. prokázat i ve viných destilátech.

Rozdílný stupeň antioxidačních vlastností se zaznamenal také podle tvorby zákalu



Obr. 7 Změny absorpčních spekter těkavých sloučenin při hlavním kvašení

Tab. 2 Vliv antioxidantů na tvorbu zákalu při oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu

Přidaný antioxidant	Zákal (j EBC)	
	Fenylalanin	2-Fenylethanol
Srovnávací roztok	4,75	21,7
Zředěný chmelový výluh	4,08	3,83
Roztok kys. askorbové	16,9	19,3
Zředěný čajový výluh	0,75	1,68
Roztok cysteinu	14,8	21,3
Zředěná sladina	1,84	3,26
Roztok katechinu	10,3	5,02
Roztok kyseliny ferulové	64,3	32,0
Roztok ethanolu	0,21	0,23

při oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu (odst. 2.5, tab. 2). V obou případech sladina, chmelový a čajový výluh i ethanol snižovaly tvorbu zákalu, naopak kyselina ferulová tvorbu zákalu podporovala. Kyselina askorbová, cystein i katechin podporovaly tvorbu zákalu alespoň v jednom ze zákalových testů při oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu.

Rovněž při hodnocení výsledků tohoto testu je nutné zvážit možnost přeoxidace zákalu. Fenylalanin se totiž oxiduje postupně, nejdříve za tvorby květinové vůně, potom za vzniku zákalu za postupného poklesu intenzity vůně a nakonec za vyčištění roztoku a vymizení vůně přeoxidací a tvorby oxidu uhličitého [6].

Podle dosud nepublikovaných výsledků se podobným způsobem oxiduje i 2-fenylethanol. Z výsledků vyplývá, že stupeň oxidace aminokyselin i vyšších alkoholů, představovaných v práci fenylalaninem a 2-fenylethanolem závisí na druhu oxidované látky, oxidačního činidla a přítomnosti prooxidantu nebo antioxidantu.

4. ZÁVĚR

Absorpční spektrum destilátu piva, nebo meziproduktů po přehánění vodní párou může v UV oblasti poskytovat užitečné informace o oxidačním poškození piva

a tvorbě aromatických těkavých látek během výroby piva. Silně absorbující těkavé sloučeniny vznikající oxidací fenylalaninu a 2-fenylethanolu se pravděpodobně tvoří také při hlavním kvašení a při stárnutí piva..

Tvorbu těkavých sloučenin, absorbujících v UV oblasti a vznikajících oxidací fenylalaninu a 2-fenylethanolu, lze ovlivnit přidáním dalších látek. Těto skutečnosti lze využít k studiu prooxidačních i antioxidačních vlastností různých látek. Navržený destilační (odst. 2.3) a zákalový (odst.2.5) test měří stupeň tvorby oxidačních produktů z fenylalaninu a 2-fenylethanolu při oxidaci peroxidisíranu za současného působení potenciálních antioxidantů. Při oxidaci fenylalaninu všechny potenciální antioxidanty potlačovaly tvorbu těkavých oxidačních produktů, hodnoceno podle poklesu absorbance při 208 nm (obr. 4).

Při oxidaci 2-fenylethanolu potlačovala sice většina antioxidantů jeho oxidaci, kyselina askorbová však působila jako prooxidant (obr. 5). Podobně i v zákalovém testu podporovala tvorbu zákalu kys. ferulová při oxidaci fenylalaninu a 2-fenylethanolu (tab. 2). Stupeň inhibice oxidačních reakcí závisel na druhu antioxidantu. Podobné výsledky poskytoval i čichový test (odst. 2.4), založený na tvorbě senzoricky aktivních látek z aminokyselin fenylalaninu a methioninu.

Při stárnutí piva se výrazně uplatňují prooxidanty i antioxidanty, jejichž vzájemné zastoupení určuje výsledné, postupně se měnící složení stárnoucího piva. Záleží na přítomnosti ostatních látek a koncentraci aktivních forem kyslíku, zda určitá sloučenina působí jako antioxidant, nebo prooxidant. Dále je nutné uvážit rozdílnou koncentraci aromatických prekurzorů těkavých látek.

Jednoduchý test na antioxidační vlast-

nosti se zakládá na tvorbě senzoricky aktivních sloučenin oxidací aminokyselin a na potlačení této reakce antioxidanty. Ve viditelné oblasti lze použít měření stupně potlačení zákalu.

Všechny zmíněné reakce mohou přispět k studiu a poznání mechanismů stárnutí piva i jiných potravin. Silné absorbance těkavých látek v UV oblasti lze použít i k měření jejich tvorby při hlavním kvašení a tím i kvality piva a jiných alkoholických nápojů, např. vína a lihovin.

LITERATURA

- [1] PUNCHARD, N.A., KELLY, J.F.: Free radicals – a practical approach. Oxford University Press, New York 1996.
- [2] CADENAS, E., PACKER, L.: Handbook of antioxidants. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- [3] WALTERS, M.T., HEASMAN, A. P., HUGHES, P.S.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **55**, 1997, s. 83, 91.
- [4] IRWIN, A.J., BARKER, R.L., PIPASTS, P.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **49**, 1991, s. 140.
- [5] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., ZDVIHALOVÁ, D.: Kvasny Prum. **41**, 1995, s. 374.
- [6] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny Prum. **44**, 1998, s. 40.
- [7] KLEIN, H., KRAMMER, R., NATTER, M.: Proc. Eur. Brew. Congr. 1997, s. 553.
- [8] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny Prum. **43**, 1997, s. 67.
- [9] MOLL, M.: Beers and coolers. Andover, Hampshire 1994, Anglie.
- [10] MIEDANER, H., NARZISS, L., EICHORN, P.: Proc. Eur. Brew. Congr. 1991, s. 401.

Lektoroval doc.Ing. Jaroslav Čepička, CSc.
Do redakce došlo 2. března 1998