

## VLIV TECHNOLOGIE KVAŠENÍ, FILTRACE A KOLOIDNÍ STABILIZACE NA OBSAH FYTOESTROGENŮ V PIVU

### EFFECT OF TECHNOLOGY OF FERMENTATION, FILTRATION AND COLLOIDAL STABILIZATION ON PHYTOESTROGEN CONTENT IN BEER

ALEXANDR MIKYŠKA, DANUŠA HAŠKOVÁ, RENATA MIKULÍKOVÁ

VÚPS, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2, e-mail: mikyska@beerresearch.cz

**Mikyška, A. – Hašková, D. – Mikulíková R.: Vliv technologie kvašení, filtrace a koloidní stabilizace na obsah fytoestrogenů v pivu.** Kvasny Prum. 51, 2005, č. 7–8, s. 240–247.

Fytoestrogeny ze skupiny isoflavonoidů jsou rostlinné fytohormony s estrogení aktivitou, které simulují biologické účinky přirozeného 17- $\beta$ -estradiolu a mají i další příznivé zdravotní účinky. Příjem fytoestrogenů v pivu s nízkým obsahem alkoholu může představovat účinný prostředek ke zmírnění klimakterických symptomů, k prevenci osteoporózy a kardiovaskulárních chorob u žen. V modelových varnách a kvasných pokusech byl zkoumán vliv technologie kvašení, filtrace a koloidní stabilizace na obsah fytoestrogenů v pivu. Fytoestrogeny daidzein, genistein, formononetin a biochanin A byly stanoveny vypracovanou metodou pomocí HPLC-MS.

Bylo zjištěno, že v praxi běžně používané technologie kvašení a zrání piva (dvofázové technologie spilka-sklep, CKT-sklep, jednofázové kvašení v CKT) jsou z hlediska ztrát fytoestrogenů mezi mladinou a pivem srovnatelné. Nejistily se prakticky významné rozdíly v účinku hlavních filtračních materiálů, křemeliny a filtračních desek na bázi celulózy, na obsah fytoestrogenů ve filtrátu. Pasterace neovlivňuje obsah fytoestrogenů v pivu. Pro koloidní stabilizaci piva je z hlediska zachování obsahu fytoestrogenů použitelný stabilizační zásah sorbentem bílkovin. Stabilizace sorbentem polyfenolů nebo kombinací obou typů sorbentů je nevhodná z důvodu vysokých ztrát fytoestrogenů, které činily zhruba 25 až 35 % oproti nestabilizovanému pivu. Ztráty fytoestrogenů mezi mladinou a pivem jsou značné. Úbytek sumy sledovaných markerů fytoestrogenů činil přibližně 45–60 %.

**Mikyška, A. – Hašková, D. – Mikulíková R.: Effect of technology of fermentation, filtration and colloidal stabilization on phytoestrogen content in beer.** Kvasny Prum. 51, 2005, No. 7–8, p. 240–247.

Phytoestrogens from the group of isoflavonoids are plant phytohormones with estrogenic activity that simulate biological effects of natural 17- $\beta$ -estradiol and have further favourable impacts on human health. Intake of phytoestrogens in low-alcohol beer can be an efficacious remedy for alleviation of climacteric symptoms, for prevention of osteoporosis and cardiovascular diseases in women. Effect of technology of fermentation, filtration and colloidal stabilization on phytoestrogen content in beer was examined in model brewing and fermentation processes. Phytoestrogens daidzein, genistein, formononetin and biochanin A were assessed by the developed method using HPLC-MS.

It was found out that in practice commonly used technologies of fermentation and beer maturation (two-phase technology fermenting cellar – cellar, CCT – cellar, single-phase fermentation in CCT) were comparable in terms of phytoestrogen losses between wort and beer. No significant differences in effect of the principal filtration materials, kieselgur and filtration plates on cellulose basis, on phytoestrogens in filtrate were detected. Pasteurization does not affect phytoestrogen content in beer. For colloidal beer stabilization and for phytoestrogen content preservation, stabilization treatment with a sorbent of proteins is applicable. Stabilization with polyphenols sorbent or combination of both types of sorbents is not suitable due to high phytoestrogen losses, that amounted to ca 25 to 35 % compared to non-stabilized beer. Phytoestrogens losses between wort and beer are substantial. Decrease in the sum of the upper mentioned markers of phytoestrogens was approximately 45 to 60 %.

**Mikyška, A. – Hašková, D. – Mikulíková R.: Der technologische Einfluss der Gärung, Filtration und kollektoral Stabilisation auf den Phytoestrogengehalt im Bier.** Kvasny Prum. 51, 2005, Nr. 7–8, S. 240–247.

Die Phytoestrogens aus der Gruppe Isoflavonoids sind eine pflanzliche Phytohormons mit einer Estrogenaktivität, die die biologische Wirkungen des natürlichem 17- $\beta$ -Estradiols simulieren und we-

isen auch andere günstige gesundheitliche Effekte auf. Eine Phytoestrogensannahme durch Alkoholarmesbiertrinken kann als ein wirkungsvolles Mittel zur Milderung von Klimakterischensymptoms, als Prevention der Osteoporose und kardiovaskularen Krankheiten bei den Frauen betrachtet werden. Während der Versuche am Pilotplantsudhaus, Pilotgär- und -lagerkeller wurde der Einfluß der Gärungs- und Reifungstechnologie, der Filtration und kollektoral Stabilisation auf den Phytoestrogensgehalt im Bier getestet. Die Phytoestrogenverluste, Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A wurden durch eine ausgearbeitete Methode mittels HPLC – MS festgestellt.

Es wurde weiter festgestellt, dass die in der Praxis übliche angewandte Gärungs- und Reifungstechnologie (d.h., zweiphasige Technologie Gärkeller – Lagerkeller, ZKT – Lagerkeller oder als auch die einphasige Gärung und Lagerung im einen ZKT) vergleichbar sind. Keine wesentliche Unterschiede vom Einfluss der Anwendung von Hauptfiltermaterials, Kieselguhr, Zellmassenfilterplatten auf den Phytoestrogengehalt im Filtrat konnten nachgewiesen werden. Die Pasteurisation wies keinen Einfluß auf den Phytoestrogensgehalt im Bier auf. Um die Erhaltung des Phytoestrogensgehalt im Bier zu sichern, sollten nur die Eiweissorbente für die kollektoral Stabilisation des Bieres angewandt werden. Die Anwendung der Polyphenolssorbente oder eine Kombination von Eiweiss- und Polyphenolssorbenten zur Bierstabilisation kann zu den Phytoestrogensverlusten im Bier führen (die Phytoestrogensverluste können im Vergleich mit einem unstabilisierten Bier sogar den Wert von 25% bis zu 35% reichen). Die Phytoestrogensverluste im Prozess Würze – Bier sind bedeutend, während der Versuchsarbeit die verfolgte Abnahme von Phytoestrogensmarkern wurde im Bereich etwa 45–60 %.

**Микишка, А., – Гашкова, Д. – Микуликова, Р.: Влияние технологии брожения, фильтрации и коллоидной стабилизации на содержание фитоэстрогенов в пиве.** Kvasny Prum. 51, 2005, No. 7–8, стр. 240–247.

Фитоэстрогены группы изофлавоноидов являются растительными фитогормонами с эстрогенной активностью, имитирующие биологическое влияние натурального 17-бета-эстрадиола, имеющие дальнейшие положительные влияния на здоровье. Прием фитоэстрогенов в пиве с низким содержанием алкоголя может представлять действенное средство к ослаблению признаков климактерии, к превенции остеопорозы и кардиососудистых заболеваний у женщин. Было исследовано влияние технологии брожения, фильтрации и коллоидной стабилизации на содержание фитоэстрогенов в пиве. Фитоэстрогены даидзеин, генистеин, формононетин и биоханин А были определены при помощи разработанного HPLC-MS метода.

Было определено, что на практике обыкновенно используемые технологии брожения и созревания пива (в двух фазах: брожение-выдержка в подвале, ЦКТ-подвал, однофазное брожение в ЦКТ) сравнимы с точки зрения уменьшения фитоэстрогенов в сусле и пиве. Не были определены значительные разницы что касается влияния главных фильтрующих материалов, диатомита и фильтрующих плит на базе целлюлозы на содержание фитоэстрогенов во фильтрате. Пастерирование не влияет на содержание фитоэстрогенов в пиве. Для коллоидной стабилизации пива с точки зрения соблюдения фитоэстрогенов в пиве является применимым сорбент белков. Стабилизация сорбентом полифенолов или комбинация обеих непригодна из-за высокой потери фитоэстрогенов, представляющих приблизительно 25–35 процентов по сравнению с нестабилизированным пивом. Потери фитоэстрогенов между суслом и пивом значительны. Понижение суммы исследуемых маркеров фитоэстрогенов представляло приблизительно 45–60 процентов.

**Klíčová slova:** *fytoestrogeny, pivo, technologie kvašení, koloidní stabilizace*

**Keywords:** *phytoestrogens, beer, technology of fermentation, colloidal stabilization*

## 1 ÚVOD

Mnohé rostliny tvoří sekundární metabolity, takzvané fytoestrogeny. Tyto látky, jakkoli nemají strukturu steroidů, simulují biologické účinky přirozeného 17- $\beta$ -estradiolu [2]. Některé z nejdůležitějších fytoestrogenů jsou isoflavonoidy (daidzein, genistein a jejich prekursor formononetin a biochanin A), které se řadí do širší skupiny polyfenolů. Kromě tohoto účinku bylo prokázáno in vitro, že genistein a daidzein inhibují růst a proliferaci buněk různých nádorů, například nádorů prostaty, plic, tlustého střeva a krve [3]. Protektivní účinek isoflavonoidů byl zjištěn také in vivo [4, 5, 6]. Isoflavonoidy rovněž mají různé další zajímavé biochemické a farmakologické vlastnosti, zahrnující antioxidační, antivirální, antibakteriální, fungistatické a spasmolytické aktivity [7]. Soja a další luštěniny jsou obzvláště bohatým zdrojem fytoestrogenů [7]. Pomocí citlivé a selektivní biologické metody stanovení bylo zjištěno, že chmel je bohatým zdrojem látek s estrogení aktivitou [8]. Fytoestrogeny daidzein a genistein byly nalezeny v ječmeni [9] a pivu [9, 10]. Výsledky ukázaly velmi rozdílný obsah fytoestrogenů v pivech, lišící se o jeden řád [9]. V posledních zhruba pěti letech je značná pozornost věnována prenylflavonoidům obsaženým ve chmelu, u 8-prenylaringeninů byla in vitro nalezena estrogení aktivita řádově vyšší než u daidzeinu a genisteinu [11].

Nízký příjem isoflavonoidů v potravě, charakteristický pro evropskou a severoamerickou populaci, je spojován s vyšším výskytem mnoha chorob oproti asijské populaci. Japonské ženy mají v porovnání se západními společnostmi velmi nízký výskyt menopauzálních symptomů. To může být vysvětleno konzumací soji [12]. Stravovací návyky, obvyklé v Evropě a USA, jsou odlišné. Pivo je jako zdroj mnoha látek důležitých z hlediska výživy souhlasně přijímáno značnou částí evropské populace.

V odborné literatuře byly publikovány výsledky o pozitivním vlivu estrogenních látek rostlinného původu na ženský organismus [13]. Prokázán je i zdravotně protektivní vliv piva [14, 15, 16]. Je ovšem nutno vzít v úvahu aspekty pravidelné konzumace relativně velkých množství piva [17, 18, 19, 20, 21]. Je akceptována střídavá konzumace piva s nízkým obsahem alkoholu spojená s pozitivním zdravotním vlivem některých komponent, zvláště sacharidů, minerálů a vitamínů a příjmu nízkého množství alkoholu, které přispívá k lepší cirkulaci krve a k prevenci kardiovaskulárních chorob. Příjem fytoestrogenů v takovém pivu může představovat účinný prostředek ke zmírnění menopauzálních a postmenopauzálních symptomů, k prevenci osteoporózy a kardiovaskulárních chorob.

Cílem předkládaného výzkumu bylo zjistit vliv kvasného procesu, koloidní stabilizace, filtrace a pasterace na obsah fytoestrogenů v pivu s důrazem na pivo se sníženým obsahem alkoholu. Práce byla zaměřena na čtyři „klasické“ fytoestrogeny daidzein, genistein, formononetin a biochanin A. Standardy prenylflavonoidů byly v době řešení obtížně dostupné.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Analýzy

Analýzy mladin a piv byly provedeny podle Pivovarsko-sladařské analytiky [1]. Pro stanovení fytoestrogenů byla ve VÚPS vypracována níže popsaná metoda.

#### 2.1.1 Metoda stanovení fytoestrogenů ve sladu, chmelu, sladíně a mladině

*Princip:*

Fytoestrogeny (daidzein, genistein, formononetin a biochanin A) jsou po enzymovém rozštěpení glykosidických vazeb izolovány technikou SPE. Izolát fytoestrogenů je rozdělen pomocí HPLC s detekcí hmotnostní spektrometrií.

*Chemikálie a roztoky:*

Methanol (Fluka-Sigma-Aldrich), 99,9%, aceton p.a. (ML Chemical), 99,5%, směs ethylacetát-acetonitril (1:1), destilovaná voda, acetátový pufr,  $\beta$ -glukuronidasa EC.3.2.1.31.

*Laboratorní zařízení a sklo:*

Ultrazvuková lázeň, chlazená centrifuga, analytické váhy, rotační vakuová odparka, vakuové SPE zařízení, kolona DSC 18, stlačený

## 1 INTRODUCTION

A number of plants form secondary metabolites with estrogenic activity, so-called phytoestrogens. These substances though not having the structure of steroids simulate biological effects of natural 17- $\beta$ -estradiol [2]. Some of the most important phytoestrogens are isoflavonoids (daidzein, genistein and their precursors formononetin and biochanin A) which belong to a wider group of polyphenols. Besides this effect, it was proved in vitro that genistein and daidzein inhibit growth and proliferation of cells of various tumours, for example tumours of the prostate, lungs, large intestine and blood [3]. Protective effect of isoflavonoids was determined also in vivo [4, 5, 6]. Isoflavonoids also have various other interesting biochemical and pharmacological properties including anti-oxidation, antiviral, antibacterial, fungistatic and spasmolytic activity [7]. Soy bean and other legumes are a very rich source of phytoestrogens [7]. By the means of sensitive and selective biological methods hops were determined to be a rich source of substances with estrogenic activity [8]. Phytoestrogens daidzein and genistein were detected in barley [9] and beer [9, 10]. Results revealed a very different content of phytoestrogens in beers, differing by one order [9]. In the last five years considerable attention has been paid to hops prenylflavonoids, it was proved in vitro that 8-prenylaringenin shows more significant estrogenic activity than daidzein and genistein [11].

Low intake of isoflavonoids in food, typical for the European and North American population, is connected with higher incidence of a number of diseases versus the Asian population. Japanese women compared to the Western communities have very low incidence of menopause symptoms. This can be explained by consumption of soy bean [12]. Nutritional habits common in Europe and the USA are different. Beer as a source of many substances important from the dietary point of view is accepted by a considerable part of the European population.

The results of the positive effect of estrogenic substances of a plant origin on the female organism have already been published [13]. Protective effect of beer on health has been proved too [14, 15, 16]. However, aspects of regular consumption of relatively high quantities of beer have to be considered [17, 18, 19, 20, 21]. Moderate low-alcohol beer consumption is accepted, it is connected with positive effect of some components, first of all saccharides, minerals and vitamins, on health and intake of low quantity of alcohol that helps better blood circulation and prevention of cardiovascular diseases. Intake of phytoestrogens in such beer can be an efficient remedy for alleviation of menopause and post-menopause symptoms, prevention of osteoporosis and cardiovascular diseases.

The aim of the submitted research was to determine the effect of the fermentation process, colloidal stabilization, filtration and pasteurization on phytoestrogen content in beer, with special attention to beer with lower alcohol content. This work was focussed on four “classical” phytoestrogens, daidzein, genistein, formononetin a biochanin A. Standards of prenylflavonoids were hard to obtain in a period of solving this project.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Analyses

Analyses of hopped worts and beers were carried out according to the Brewing and Malting Analytica [1]. The below described method for determination of phytoestrogens was developed in the RIBM.

#### 2.1.1 Method for determination of phytoestrogens in malt, hop, hopped wort and wort

*Principle:*

Phytoestrogens (daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A) are isolated after enzymatic degradation of glycosidic linkages with SPE technique. Isolate of phytoestrogens is split with HPLC with mass spectrometry detection.

*Chemicals and solutions:*

Methanol (Fluka-Sigma-Aldrich), 99,9%, acetone p.a. (ML Chemical), 99,5%, mixture of ethylacetate-acetonitril (1:1), distilled water, acetate buffer,  $\beta$ -glucuronidase EC.3.2.1.31

dusík (čistota 5.0), infuzní lahve, centrifugační zkumavky (50 ml), odměrné válce 100 ml, 20 ml, varné baňky se zábrusem (150 ml), skleněné vialky (2 ml).

#### Příprava vzorku:

Kalicí látky se odstraní odstředěním 8000 min<sup>-1</sup>, 15 min, 5 °C, pivo se zbaví oxidu uhličitého v ultrazvukové lázni. K 1 ml vzorku se přidá 200 µl acetátového pufru a 5 mg β-glukoronidasy, směs se nechá inkubovat přes noc při 37 °C.

Provede se přečištění vzorku na SPE koloně (DSC 18) následujícím postupem: kolonka se aktivuje 1 ml methanolu, promyje 1 ml 5% methanolu, přidá se 1 ml vzorku, promyje 800 µl 5% methanolu a vzorek se eluuje 500 µl směsí ethylacetát-acetonitril (1:1). Eluovaný vzorek se jímá do skleněné vialky.

Získaný přečištěný vzorek se odpaří do sucha v atmosféře N<sub>2</sub>. Takto přečištěné vzorky jsou připraveny k HPLC-MS analýze.

#### Stanovení fytoestrogenů HPLC/MS

Podmínky stanovení jsou následující: Kolona XTerra C18, 150x2.1 mm, 5 µm. Průtok 0,250 ml/min. Gradientová eluce v systému acetonitril, voda, 10% kyselina mravenčí. Standardy fytoestrogenů genistein, daidzein, formononetin, biochanin A.

## 2.2 Technologické pokusy

### 2.2.1 Laboratorní stabilizační pokusy

V laboratorním měřítku byly aplikovány v praxi pivovarů velmi frekvencované stabilizační prostředky Polyclar 10 (sorbet polyfenolů) a Stabifix W (sorbet bílkovin). Bylo použito komerční, koloidně nestabilizované 12% světlé pivo. Stabilizátory byly aplikovány postupem vypracovaným v minulých letech ve VÚPS. Do 0,5 l piva se aplikuje zvolená dávka stabilizačního prostředku a za stálého míchání na magnetické míchačce nechá působit po dobu 30 minut. Po odstředění se provede analýza piva a stanoví se úbytek polyfenolů a bílkovin oproti srovnávacímu pivu. Polyclar 10 byl aplikován v dávkách 15 a 30 g/hl, Stabifix W v dávkách 50 a 100 g/hl, dále byla provedena kombinovaná stabilizace Polyclar+Stabifix W v dávkách 15+50 g/hl.

### 2.2.2 Čtvrtprovozní varní a kvasné pokusy

Kvasné pokusy se dvěma nízkoprokvašujícími kmeny č. 25 a č. 45 a kmenem č. 95 sbírky VUPS proběhly v objemu 30 l. Byla použita jednotná mladina z 8% celosladové poloprovozní várky. Vždy dva kvasné válce byly zakvašeny jedním kmenem kvasinek. Hlavní kvašení proběhlo při maximální teplotě 10 °C. Dokvašování proběhlo v ležáckých nádobách při teplotě 3 °C po dobu tří týdnů. Piva byla zfiltrována deskovým filtrem a stočena do lahví pod ochranou oxidu uhličitého. Část piva byla při filtraci koloidně stabilizována Polyclarem 10 (20 g/hl), Stabifixem W (75g/hl) a kombinací obou prostředků (Polyclar 10 + Stabifix W 15 + 50 g/hl) a využita pro zjištění vlivu koloidní stabilizace na obsah fytoestrogenů ve stabilizovaném pivu.

Dále byly ve čtvrtprovozním měřítku připraveny 8% celosladové várky s rozdílným obsahem fytoestrogenů v mladině. Pivo bylo připraveno s použitím kmene č. 95 za výše uvedených podmínek. Várky se lišily chmelením.

### 2.2.3 Poloprovozní kvasné pokusy

Poloprovozní kvasné pokusy byly zaměřeny na vliv technologie kvašení a zrání piva, filtračního materiálu a pasterace piva na obsah fytoestrogenů v pivu. Jednotná mladina z 8% celosladové várky byla pro kvašení rozdělena na tři podíly o objemu 2 hl. Testovány byly hlavní v praxi používané technologie kvašení a zrání – klasická dvoufázová technologie hlavního kvašení v otevřené spilce a dokvašování v ležáckém tanku, dvoufázová technologie hlavního kvašení v cylindro-kónickém tanku (CKT) a dokvašování v ležáckém sklepě a jednofázová technologie kvašení a zrání v CKT. Doba a teplota ležení byla jednotná, tři týdny při teplotě 3 °C. Část piva byla variantně filtrována deskovým nebo křemelinovým filtrem a stočena do lahví. Část lahví byla pasterována v ponorném pasteru na 25 pasteračních jednotek.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Vliv kvašení na obsah fytoestrogenů v pivu

Je známo, že obsah polyfenolových a fenolických látek klesá v průběhu kvasného procesu v důsledku snížení rozpustnosti s poklesem pH a reakcí s dalšími složkami extraktu. Výrazný pokles byl zjištěn

#### Laboratory equipment and glass:

Ultrasonic bath, cooled centrifuge, analytical scales, rotary vacuum evaporator, vacuum SPE equipment, column DSC 18, depressed Nitrogen (purity 5.0), infusion bottles, centrifugation tubes (50 ml), measuring cylinders 100 ml, 20 ml, ground boiling flasks (150 ml), glass vials (2 ml).

#### Sample preparation:

Samples were centrifuged 8000 min<sup>-1</sup>, 15 min, 5 °C, beer is cleared of carbon dioxide in the ultrasonic bath. 200 µl of acetate buffer and 5 mg of β-glucuronidase are added to 1 ml of the sample, mixture incubates overnight at 37 °C.

The sample is purified on the SPE column (DSC 18) using the following method: column is activated with 1 ml of methanol, washed with 1 ml of 5% methanol, 1 ml of sample is added, washed with 800 µl of 5% methanol and sample is eluted with 500 µl of ethylacetate-acetonitril mixture (1:1). The eluted sample is transferred into the glass vial.

The acquired purified sample is evaporated to dryness in N<sub>2</sub> atmosphere. The purified samples are prepared for HPLC-MS analysis.

#### Determination of phytoestrogens by HPLC/MS:

The conditions for determination are as follows: Column XTerra C18, 150x2.1 mm, 5µm. Flow 0.250 ml/min. Gradient elution in the system of acetonitril, water, 10% formic acid. Standards of phytoestrogens genistein, daidzein, formononetin, biochanin A.

## 2.2 Technological experiments

### 2.2.1 Laboratory stabilization experiments

Stabilization preparations Polyclar 10 (sorbet of polyphenols) and Stabifix W (sorbet of proteins) frequently applied in breweries were used on the laboratory scale. Commercial non stabilized 12% beer was used. Stabilizers were applied using the method developed in the previous years in the RIBM. The chosen dosage of the stabilization agent is applied into 0.5 l of beer and while constantly blended on the magnetic stirrer it is treated for 30 minutes. After centrifugation, beer analysis is carried out and decline in polyphenols and proteins is assessed versus to comparing beer. Polyclar 10 was applied in dosages of 15 and 30 g/hl, Stabifix W in dosages of 50 and 100 g/hl, in addition, combined stabilization with Polyclar+Stabifix W in dosages 15+50 g/hl was carried out.

### 2.2.2 Semi-pilot plant brewing and fermentation trials

Fermentation trials with two poorly attenuating strains no. 25 and no. 45 and strain no. 95 of the RIBM's collection were performed in the volume of 30 l. Uniform wort from 8% all-malt pilot plant brews was used. Always two fermentation barrels were pitched by one yeast strain. Primary fermentation was conducted at maximal temperature of 10 °C. Secondary fermentation was conducted in storage tanks at 3 °C for 3 weeks. Beers were filtered through plate filters and bottled under the protection of carbon dioxide. During filtration, part of beer was colloiddally stabilized with Polyclar 10 (20 g/hl), Stabifix W (75g/hl), and their combination (Polyclar 10+Stabifix W 15+50 g/hl) and the effect of the colloidal stabilization on phytoestrogen content in stabilized beer was determined.

In addition, 8% all-malt brews with different phytoestrogen content in wort were prepared on semi-pilot plant brewing beer was prepared using the strain No. 95 according to the above mentioned conditions. Brews were different in hopping.

### 2.2.3 Pilot plant fermentation trials

Pilot plant fermentation trials were focused on the effect of technology of fermentation and beer maturation, filtration material and beer pasteurization on phytoestrogen content in beer. For fermentation, uniform wort from 8% all-malt brewing was split into three portions with the volume of 2 hl. The principal processes of fermentation and beer maturation used in practice were tested – classical two-phase technology of the primary fermentation in the open fermentation cellar and secondary fermentation in the storage tank, two-phase technology of primary fermentation in cylinder-conic tank (CCT) and secondary fermentation in storage tank and single-phase technology of fermentation and maturation in CCT. Storage time and temperature were uniform, three weeks at temperature of 3 °C. Part of beer was filtered through a plate or kieselguhr filter and bottled. Part of bottles was pasteurized in a box pasteurizer for 25 pasteurization units.



Tab. 1 Výsledky rozboru pív kvašených různými kmeny kvasinek / Results of analyse of beers fermented by different yeast strains

Kmen č. / Strain No.	jednotka / unit	25	45	95
Extrakt zdánlivý / Real extract	% hm./ % w.	2,01	2,63	2,97
Extrakt skutečný / Apparent extract	% hm./ % w.	3,12	3,69	3,93
Alkohol / Alcohol	% hm./ % w.	2,34	2,21	2,01
	% hm./ % w.	2,98	2,83	2,57
Původní koncentrace / Original gravity	% hm./ % w.	7,75	8,06	7,90
Prokvašení zdánlivé / Apparent attenuation	% rel.	74,15	67,55	62,45
Prokvašení skutečné / Real attenuation	% rel.	60,8	55,45	51,35
Barva / Colour	EBCU	5,80	6,40	5,00
pH		4,56	4,79	4,81
Hořké látky / Bitter substances	BU	15	15	19
Bílkovin. dusík CBB / Protein nitrogen CBB	mg/100 ml	47,8	55,5	37,6
Pěnivost NIBEM / Foam NIBEM	s/30 mm	239	237	229
Celkové polyfenoly / Total polyphenols	mg/l	129	111	85
Anthokyanogeny / Anthocyanogens	mg/l	25,0	28,7	14,8
Flavonoidy / Flavonoids	mg/l	8,70	9,10	7,20
Předpověď koloidní trvanlivosti / Shelf life prediction	měsíce/months	3,0	1,5	6,0
Diacetyl (mladé pivo) / Diacetyl (young beer)	mg/kg	0,36	0,46	0,39
Vyšší alkoholy / Higher alcohols	mg/l	63,2	38,1	44,0
Estery / Esters	mg/l	9,45	7,51	9,51
Poměr Alkoholů/Estery / Ratio Alcohols/Esters		6,7:1	5,1:1	4,6:1
Senzorická kvalita / Sensorial quality*	Body/Score			
Čerstvé pivo / Fresh beer		5,59	5,47	5,28
Po 2 měsících skladování / After 2 months storage		6,25	5,82	5,23
Po 4 měsících skladování / After 4 months storage		7,56	7,50	7,06

\* stupnice 1–9 bodů / scale 1–9 points

například i pro isoxanthohumol, isoflavonoid s protirakovinným účinkem [22, 23, 24]. Byly provedeny kvasné pokusy se dvěma nízkoprokvašujícími kmeny sbírky VÚPS a kmenem č. 95, nejrozšířenějším kmenem v provozu tuzemských pivovarů. Kmeny č. 25 a č. 45 byly vytipovány s ohledem na požadované vlastnosti (nízké prokvašení, dobrá sedimentace, nízká tvorba diacetylů) na základě laboratorních pokusů s širším spektrem sbírkových kmenů.

Jak je patrné z výsledků v tab. 1, u testovaných kmenů se neprojevila při zkvašování 8% celoskladové mladiny nižší míra prokvašení v porovnání s kmenem č. 95. Senzorická kvalita pív byla na průměrné úrovni, nebyla výrazně odlišná, mírný trend k lepší kvalitě piva byl zaznamenán u kmene č. 95. U kmene č. 25 byla zaznamenána nežádoucí zvýšená tvorba vyšších alkoholů. Senzorická stabilita pív hodnocená po 2 a 4 měsících skladování klesala v pořadí kmen č. 25, č. 45 a č. 95. Rovněž skutečná koloidní trvanlivost byla nejlepší u pív kvašených kmenem č. 95. Vyloučení tríslobilkovinových komplexů, dokumentované obsahem anthokyanogenů a celkových polyfenolů, bylo při aplikaci kmenů č. 45 a zejména č. 25 podstatně horší.

Ztráty sumy stanovených markerů fytoestrogenů (daidzein, genistein, formononethin a biochanin A) mezi mladinou a pivem byly

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Effect of fermentation on phytoestrogen content in beer

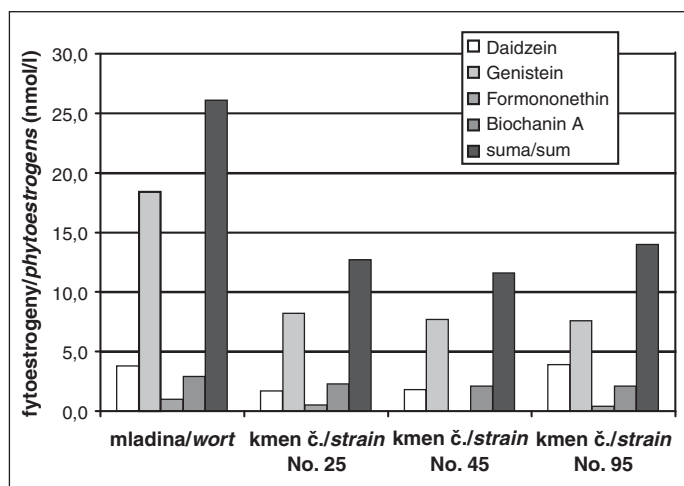
It is known that content of polyphenolic and phenolic substances declines during the fermentation process as a result of decline in solubility with a fall in pH and reaction with other extract components. Significant decline was found for example also for Xanthohumol, isoflavonoid with anticarcinogenic effect [22, 23, 24]. Fermentation trials with two poorly attenuating strains of the RIBM's collection and strain No. 95, the most commonly used strain in inland breweries, were performed. Strains No. 25, No. 45 were used with respect to the required properties (low attenuation, good sedimentation, low diacetyl production) based on the laboratory trials with a wider spectrum of collection strains.

As evident from Table 1, lower attenuation was not proved in the tested strains at fermentation of 8% all-malt wort when compared to the strain No. 95. Sensory quality of fermented beers was on the average level, it was not significantly different, moderate tendency towards better beer quality was recorded in the strain No. 95. In the strain no. 25, undesirable increased generation of higher alcohols was recorded. Sensory stability of beers evaluated after 2 and 4 months of storage declined in the following order: strain No. 25, strain No. 45 and strain No. 95. Real colloidal shelf life was also the best in beers fermented by the strain No.95. Separation of tannin-protein complexes documented by the content of anthocyanogenes and total polyphenols was substantially worse after application of strains No. 45 and mainly No. 25.

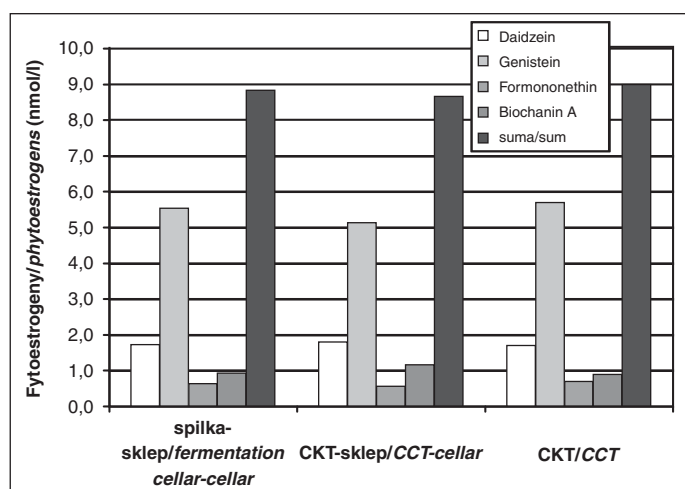
Losses of the sum of determined phytoestrogen markers (daidzein, genistein, formononethin, and biochanin A) between wort and beer were the lowest in the strain No. 95 (decline by 46 %); in strains No. 25 (51 %) and No. 45 (55 %) the losses were rather higher (Figure 1). Approximately a half of the wort phytoestrogen content was lost from wort to the final product, bottled beer.

In the pilot plant brewing trials, three in practice commonly used technologies of fermentation and maturation were compared, classical two-phase technology fermentation cellar-cellar, two-phase CCT technology-cellar and single-phase fermentation and maturation in CCT.

The determined decline in the sum of the measured phytoestrogen markers between wort and the final product, filtered beer, was in the experiments 60 to 61 % on the average. No significant differences were found among the tested technologies of fermentation and maturation, differences in summary content of phytoestrogens



Obr. 1 / Figure 1 Vliv kmene kvasinek na obsah fytoestrogenů v pivu / Influence of yeast strain on phytoestrogens content in beer



Obr. 2 / Figure 2 Vliv technologie kvašení na obsah fytoestrogenů v pivo / Influence of fermentation technology on phytoestrogens content in beer

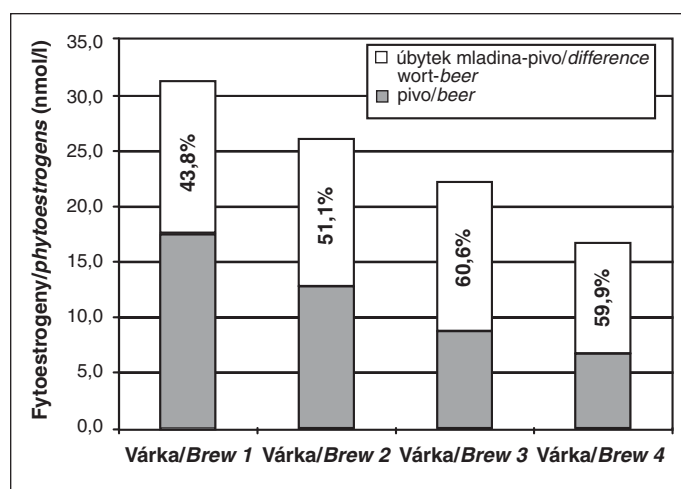
nejnižší u kmene č. 95 (pokles o 46 %), u kmenů č. 25 (51 %) a č. 45 (55 %) byly ztráty poněkud vyšší (obr. 1). Zhruba polovina obsahu fytoestrogenů mladiny byla ztracena od mladiny do finálního výrobku, stočeného piva.

V poloprodučních varních pokusech byly porovnány tři technologie kvašení a zrání používané v praxi, klasická dvoufázová technologie spilka-sklep, dvoufázová technologie CKT-sklep a jednofázové kvašení a zrání v CKT.

Stanovený úbytek sumy měřených markerů fytoestrogenů mezi mladinou a finálním výrobkem, filtrovaným pivem, byl v diskutovaných pokusech v průměru 60 až 61 %. Mezi testovanými technologiemi kvašení a zrání nebyly zjištěny markantní rozdíly, difference v sumárním obsahu fytoestrogenů v pivu se v průměru pohybovaly v rámci analytické chyby. Významné rozdíly mezi technologiemi nebyly zjištěny ani pro jednotlivé markery. Nejvyšší úbytky (zhruba 80 %) byly stanoveny u daidzeinu, úbytky genisteinu (zhruba 50 %), formononethinu (zhruba 40–50 %) a biochaninu A (zhruba 50–60 %) byly nižší (obr. 2).

Významné rozdíly v senzorické a analytické kvalitě piv připravených testovanými technologiemi nebyly zjištěny s výjimkou známých mírně vyšších ztrát hořkých látek u klasické technologie spilka-sklep.

Ve varních pokusech provedených při řešení projektu v roce 2004 byla k dispozici škála koncentrací fytoestrogenů v mladině. Balance úbytku měřených markerů fytoestrogenů mezi mladinou a pivem čtvrtprovozních várek s různým chmelením ukázala trend k nižší míře ztrát fytoestrogenů mezi mladinou a pivem u mladin s vyšším obsahem těchto látek. Koncentrace v mladině byla v rozmezí zhruba 17–31 nmol/l, ztráty do finálního výrobku byly v rozmezí zhruba 44–60 % (obr. 3). Zastoupení jednotlivých sledovaných fytoestrogenů v různých mladinách se lišilo, míra úbytku kolísala, nebyl zjištěn přednostní úbytek ani jednoho z markerů (tab. 2).



Obr. 3 / Figure 3 Ztráty fytoestrogenů mezi mladinou a pivem / Decrease of phytoestrogens content between wort and beer (suma markerů / sum of markers – Daidzein, Genistein, Formononethin, Biochanin A)

in beer varied on the average within analytical error. Significant differences among technologies were not found for individual markers either. The biggest falls (approximately 80 %) were determined in daidzein, falls in genistein (approximately 50 %), formononethin (approximately 40 to 50 %) and biochanin A (approximately 50 to 60%) were lower (Figure 2).

Significant differences in sensory and analytical quality of beers prepared using the tested technologies were not found with the exception of known mildly higher losses of bitter substances in the classical technology fermentation cellar-cellar.

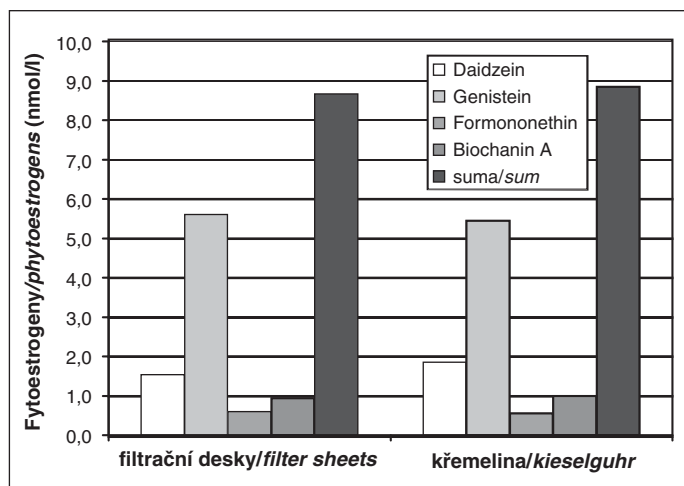
In the brewing trials carried out during solution of the project in 2004, range of concentrations of phytoestrogens in wort was available. Balance of loss of the measured phytoestrogen markers between wort and beer revealed the tendency towards lower phytoestrogen losses between wort and beer in worts with higher content of these substances. Concentration in wort was approximately 17 to 31 nmol/l, losses into the final product were within approximately 44 % to 60 % (Figure 3). Distribution of the individual followed phytoestrogens in various worts differed, rate of losses fluctuated, preference loss was not determined in any of the markers (Table 2).

### 3.2 Effect of selection of filtration preparation and pasteurization on phytoestrogen content in beer

It is known that filtration materials trap a certain fraction of polyphenol substances of beer. In pilot plant two filtration processes that are dominantly used in the brewing industry today, were compared: filtration with kieselguhr and filter plates on the basis of cellulose. In practice common conditions as kieselguhr dosage or specific area of filter plates on the volume of filtered beer were used.

Tab. 2 Ztráty fytoestrogenů mezi mladinou a pivem / Decrease of phytoestrogen content between wort and beer

Fytoestrogeny	Phytoestrogens (nmol/l)	Daidzein	Genistein	Formononethin	Biochanin A	Suma / sum
Várka / Brew 1	mladina / wort	4,0	20,7	1,0	5,6	31,3
	pivo / beer	3,9	11,5	0,4	1,8	17,6
	úbytek / difference (% rel.)	–2,5	–44,4	–60,0	–67,9	–43,8
Várka / Brew 2	mladina / wort	3,8	18,4	1,0	2,9	26,1
	pivo / beer	2,5	7,8	0,3	2,2	12,8
	úbytek / difference (% rel.)	–35,1	–57,4	–70,0	–25,3	–51,1
Várka / Brew 3	mladina / wort	7,9	10,9	1,1	2,3	22,2
	pivo / beer	1,7	5,5	0,6	1,0	8,7
	úbytek / difference (% rel.)	–79,0	–49,2	–47,3	–58,3	–60,6
Várka / Brew 4	mladina / wort	8,7	4,4	1,1	2,5	16,7
	pivo / beer	1,8	2,2	0,8	1,9	6,7
	úbytek / difference (% rel.)	–79,3	–50,0	–27,3	–24,0	–59,9



Obr. 4 / Figure 4 Vliv filtračního prostředku na obsah fytoestrogenů v pivo / Influence of filter aid on phytoestrogens content in beer

### 3.2 Vliv volby filtračního prostředku a pasterace na obsah fytoestrogenů v pivo

Je známo, že filtrační materiály zachycují určitý podíl polyfenolových látek piva. Na poloprovozním zařízení byly porovnávány dva v pivovarství v současné době dominantní filtrační postupy, filtrace křemelinou a filtračními deskami na bázi celulózy. Byly použity v praxi běžné podmínky z hlediska dávky křemelinou respektive měrné plochy filtračních desek na objem zfiltrovaného piva.

Nebyly zjištěny podstatné rozdíly v průměrném sumárním obsahu měřených markerů fytoestrogenů mezi pivy filtrovanými křemelinou či filtračními deskami, difference byly v rámci chyby měření. Rovněž obsah jednotlivých markerů nebyl odlišný, velmi mírný trend k vyššímu úbytku daidzeinu byl zaznamenán pro filtraci deskami (obr. 4).

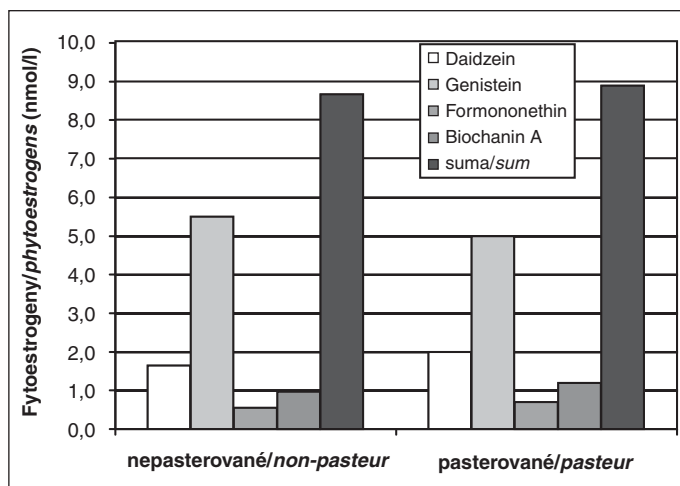
Případný vliv pasterace na obsah fytoestrogenů v pivo byl zkoumán v rámci poloprovozních varních pokusů, kdy část stočených piv byla pasterována na 25 pasteračních jednotek. Pasterace piva neměla žádný měřitelný efekt na obsah stanovených markerů fytoestrogenů (obr. 5).

### 3.3 Vliv koloidní stabilizace na obsah fytoestrogenů v pivo

Pro koloidní stabilizaci jsou v současnosti nejrozšířenější sorbenty polyfenolových látek na bázi PVPP (nejběžnější je Polyclar), sorbenty bílkovin na bázi křemičitých gelů (typický zástupce Stabifix W) nebo kombinace obou typů stabilizátorů.

Vliv technologie koloidní stabilizace piva byl zjišťován v laboratorních modelových pokusech (běžná provozní dávka a maximální dávka doporučená výrobcem) na komerčním pivo a následně ve čtvrtprovozních varních pokusech na jednotné 8% mladíně za použití v provozu běžných dávek stabilizátorů.

Sorpční (stabilizační) účinek sorbentů aplikovaných v laboratoři je



Obr. 5 / Figure 5 Vliv pasterace na obsah fytoestrogenů v pivo / Influence of pasteurisation on phytoestrogens content in beer

Significant differences in the average sum of content of measured markers of phytoestrogens between beers filtered by kieselguhr or filter plates were not found, differences were within the error of measurement. Content of individual markers was not different, very moderate tendency towards higher fall in daidzein was recorded for plate filtration (Figure 4).

Possible effect of pasteurization on phytoestrogen content in beer was examined within pilot plant brewing experiments when part of bottled beers was pasteurized to 25 pasteurization units. Beer pasteurization did not have any measurable effect on content of determined phytoestrogen markers (Figure 5).

### 3.3 Effect of colloidal stabilization on phytoestrogen content in beer

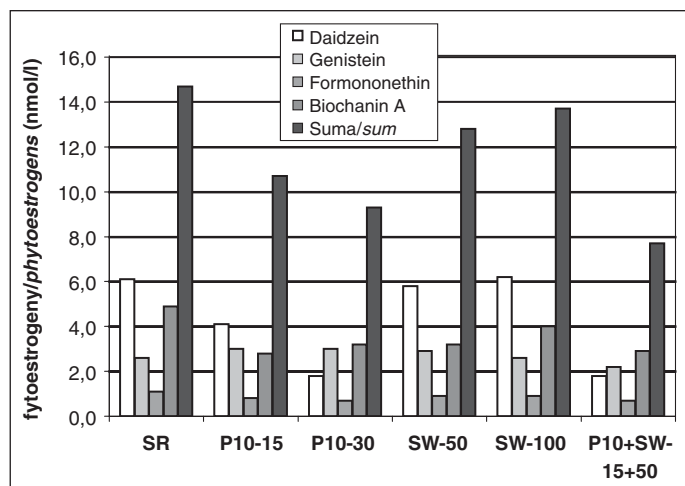
For colloidal stabilization sorbents of polyphenol substances on the basis of PVPP (Polyclar is the most common), sorbents of proteins on the basis of kieselguhr gels (typical representative Stabifix W) or combination of both types of stabilizers have been widely used today.

Effect of technology of colloidal stabilization of beer was determined in the laboratory model trials (common working dosage and maximum dosage recommended by a producer) on commercial beer and subsequently during semi-pilot brewing trials on uniform 8% wort using common dosages of stabilizers.

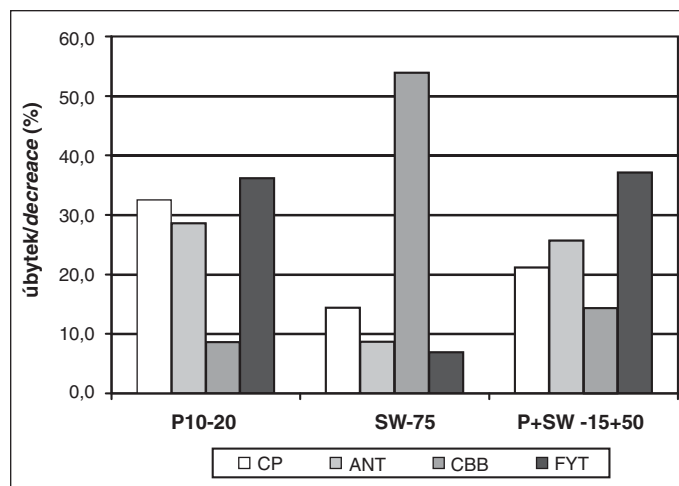
Sorption (stabilization) effect of sorbents applied in the laboratory is evident from Table 3. Significant sorption of phytoestrogens was determined for Polyclar 10, fall in sum of measured markers of phytoestrogens made approximately 27 or 37 % of content in non-stabilized beer and it apparently depended on the sorbent dosage. During application of protein sorbent Stabifix W, we recorded a certain fall in sum content of the measured markers of phytoestrogens that in

Tab. 3 Laboratorní testování vlivu stabilizačních prostředků na obsah fytoestrogenů v pivo / Laboratory trials of an influence of stabilisation aids on phytoestrogens content in beer (P10 – Polyclar 10, SW – Stabifix W)

Označení vzorku / Sample code		SR	P10 15 g/hl	P10 30 g/hl	SW 50 g/hl	SW 100 g/hl	P10+SW 15+50 g/hl
Celkové polyfenoly / Total polyphenols	(mg/l)	156	120	108	138	139	116
	(% rel.)		23,1	30,8	11,5	10,9	25,6
Anthokyanogeny / Anthocyanogens	(mg/l)	48,8	34	31	53,8	44,9	35,7
	(% rel.)		30,3	36,5	-10,2	8	26,8
Flavonoidy / Flavonoids	(mg/l)	19,1	14,4	12,2	18,2	18,2	13,5
	(% rel.)		24,6	36,1	4,7	4,7	29,3
Síranový test / Ammonium sulphate test	(ml/10ml)	1,45	1,65	1,35	2,1	2,5	1,75
	(% rel.)		-13,8	6,9	-44,8	-72,4	-20,7
Bílkovin. dusík CBB / Protein nitrogen CBB	(mg/100ml)	30,6	27,4	29,5	9,5	10,2	10,0
	(% rel.)		10,3	3,6	69,1	66,8	67,3
Fytoestrogeny (suma) / Phytoestrogens (sum)	(nmol/l)	14,7	10,7	9,3	12,8	13,7	7,7
	(% rel.)		-27,2	-36,7	-12,9	-6,8	-47,6



Obr. 6 / Figure 6 Vliv koloidní stabilizace na obsah fytoestrogenů v pivu – laboratorní pokusy / Influence of colloidal stabilisation on phytoestrogens content in beer – laboratory trials  
P10 – Polyclar 10, dávka / dose 15 g/hl, 30 g/hl  
SW – Stabifix W, dávka / dose 50 g/hl, 100 g/hl



Obr. 7 / Figure 7 Vliv koloidní stabilizace na obsah fytoestrogenů v pivu – poloproduční pokusy / Influence of colloidal stabilisation on phytoestrogens content in beer – scale trials  
P10–20 – Polyclar 10, dávka / dose 20 g/hl, SW-75 – Stabifix W, dávka / dose 75 g/hl, P+SW+15+50 – Polyclar 10 + Stabifix W, dávky / doses 15 + 75 g/hl)  
CP – celkové polyfenoly / total polyphenols, ANT – anthokyanogeny / anthocyanogens, CBB – bílkovinný dusík / protein nitrogen, FYT – fytoestrogeny / phytoestrogens

patrný z tab. 3. Významná sorpce fytoestrogenů byla zjištěna pro Polyclar 10, úbytek sumy měřených markerů fytoestrogenů činil přibližně 27 resp. 37 % obsahu v nestabilizovaném pivu a byl zjevně závislý na dávce sorbentu. Při aplikaci sorbentu bílkovin Stabifix W byl zaznamenán určitý úbytek sumárního obsahu měřených markerů fytoestrogenů, který v případě nižší použité dávky přesáhl chybu měření, která činí  $\pm 5$  %. Nejvyšší ztráty fytoestrogenů (48 %) byly zjištěny pro kombinaci obou prostředků (tab. 3, obr. 6).

Varní pokusy potvrdily negativní vliv sorbentu polyfenolů na obsah fytoestrogenů ve finálním výrobku, i zde byly stanoveny ztráty ve výši zhruba 37 %. Vliv sorbentu bílkovin byl pod hranicí analytické chyby. V případě kombinované stabilizace oběma sorbenty se negativně projevil vliv sorbentu polyfenolů Polyclar 10 (obr. 7).

V laboratorních pokusech byla zaznamenána nejvyšší míra sorpce u daidzeinu (úbytek 33 % resp. 71 % v závislosti na dávce) a biochaninu, které tvořily převážnou část fytoestrogenů v použitém pivu. Ve varních pokusech byl nejvíce sorbován genistein (úbytek 52,4 %), majoritní komponenta těchto piv. Zastoupení fytoestrogenů v mladíně závisí na použitých surovinách. Fytoestrogeny v pivu jsou zčásti vázány na cukry, pro míru sorpce je pravděpodobně významné zastoupení glykosidů. Námi vypracovanou metodou jsou stanoveny volné i vázané fytoestrogeny.

Úbytek obsahu sumy sledovaných markerů fytoestrogenů mezi mladinou a pivem byl u nestabilizovaných piv zhruba 45 % až 55 %, při aplikaci Polyclaru tento úbytek dosáhl téměř 70 %. Pro koloidní stabilizaci piva se zvýšeným obsahem fytoestrogenů je stabilizace sorbentem polyfenolů nebo kombinací obou typů sorbentů nevhodná z důvodu vysokých ztrát fytoestrogenů.

#### 4 ZÁVĚR

- Neprokázaly se významné rozdíly mezi testovanými technologiemi kvašení a zrání piva (dvoufázové technologie spílka-sklep, CKT-sklep, jednofázové kvašení v CKT) na obsah vybraných fytoestrogenů v pivu. Tyto v praxi běžně používané technologie jsou z hlediska ztrát fytoestrogenů mezi mladinou a pivem srovnatelné.
- V provedených testech nebyly nalezeny kmeny s vlastnostmi výhodnějšími z hlediska ztrát fytoestrogenů při kvašení a kvality piva s nízkým obsahem alkoholu oproti nejrozšířenějšímu kmenu č. 95. Žádoucí nižší prokvašení piva je možno podpořit jinými operacemi, volbou méně rozluštěného sladu a technologií rmutování omezující sacharolýzu.
- Pro výrobu piva bohatého na fytoestrogeny je možno alternativně použít obě v současnosti dominantní technologie filtrace, filtrace křemelinou i filtračními deskami na bázi celulózy. Nejistoty se prakticky významně rozdíly v účinku filtračních materiálů na obsah fytoestrogenů ve filtrátu. Pasterace neovlivňuje obsah fytoestrogenů v pivu.
- Pro koloidní stabilizaci piva je z hlediska zachování obsahu fyto-

case of a lower dosage exceeded measurement error ( $\pm 5$  %). The highest phytoestrogen losses (48 %) were detected for combination of both preparations (Tab. 3, Figure 6).

The brewing experiments confirmed negative effect of sorbent of polyphenols on phytoestrogen content in the final product, here losses in the amount of approximately 37 % were determined as well. Effect of protein sorbent was under the limit of analytical error. In combined stabilization using both sorbents, sorbent of polyphenols Polyclar 10 exhibited negative effect (Figure 7).

In the laboratory experiments, the highest sorption rate was recorded in daidzein (fall of 33 % or 71 % in dependence on dosage) and biochanin that formed the prevailing part of phytoestrogens. In beer used in the brewing trials genistein, major component of these beers, was the most sorbed (fall of 52.4 %). Phytoestrogen distribution in wort depends on the material used. Phytoestrogens in beer bind partly to sugars, distribution of glycosides may be important for sorption rate. The method developed by us free as well as bound phytoestrogens can be determined.

Fall in content of sum of the followed phytoestrogen markers between wort and beer was in non-stabilized beers approximately 45 % to 55 %, after Polyclar application this fall attained nearly 70 %. Stabilization with sorbent of polyphenol or combination of both types of sorbents is unsuitable for colloidal stabilization of beer with increased phytoestrogen content due to high losses of phytoestrogens.

#### 4 CONCLUSIONS

- Significant differences between the tested technologies of fermentation and beer maturation (two-phase technologies: fermentation cellar-cellar, CCT-cellar, single-phase fermentation in CCT) affecting phytoestrogen content in beer were not proved. These in practice commonly used technologies are comparable in terms of phytoestrogen losses between wort and beer.
- In the conducted tests, strains with properties more suitable in terms of phytoestrogen losses during fermentation and quality of beer with low alcohol content were not found versus the most widely spread strain no. 95. The desirable lower attenuation of beer can be supported by other operations, i.e. choice of less modified malt and technology of mashing reducing saccharolysis.
- For production of beer rich in phytoestrogens, both currently dominant technologies of filtration, filtration with kieselguhr and filter plates on the basis of cellulose, can be alternatively used. No significant differences in the effect of filtration materials on phytoestrogen content in the filtrate were determined. Pasteurization does not affect phytoestrogen content in beer.
- Stabilization treatment with protein sorbent can be used for colloidal stabilization of beer for preserving phytoestrogen content. Sta-



estrogenů použitelný stabilizační zásah sorbentem bílkovin. Stabilizace sorbentem polyfenolů nebo kombinací obou typů sorbentů je nevhodná z důvodu vysokých ztrát fytoestrogenů, které činily zhruba 25–35 % oproti nestabilizovanému pivu.

- Ztráty fytoestrogenů mezi mladinou a pivem jsou značné. Úbytek sumy sledovaných markerů fytoestrogenů činil přibližně 45–55 %, při koloidní stabilizaci sorbentem polyfenolů dosáhl až zhruba 70 %.

**Výsledky byly získány v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QF 3229.**

#### Literatura / Literature

- [1] Kolektiv autorů: Pivovarsko-sladařská analytika, Merkanta, Praha, 2001.
- [2] Juniewicz, P. E. et al.: Identification of phytoestrogens in the urine of dogs. *J. Steroid. Biochem.* **31**, 1988, 987–994.
- [3] Adlercreutz, H. et al.: Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* **125**, 1995, 757–770.
- [4] Jing, Z. K., Nakaya, K., Han, R.: Differentiation of promyelocytic leukemia cells HL-60 induced by danzein in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* **13**, 1993, 1049–1054.
- [5] Lamartiniere, C. A. et al.: Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis (London)* **16**, 1995, 2833–2840.
- [6] Murtil, W. B. et al.: Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis (London)* **17**, 1996, 1451–1457.
- [7] Adlercreutz, H.: Scand. Western diet and Western diseases: Some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *J. Clin. Lab. Invest.* **50**, 1990, (Suppl. 201), 3–23.
- [8] De Keukeleire, D. et al.: Hop-derived phytoestrogens in beer? *Proc. Europ. Brew. Conv. Congr.*, 1997, 239–246.
- [9] Lapcik, L. et al.: Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* **63**, 1998, 14–20.
- [10] Rosenblum, E. R. et al.: Isolation and identification of phytoestrogens from beer. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**, 1992, 843–845.
- [11] Kuřec, M., Hofta, P., Dostálek, P.: Složky chmele s estrogenními účinky a jejich využití. *Kvasny Prum.* **51**, 2005 (v tisku / in print)
- [12] Lock, M.: Contested meanings of the menopause. *Lancet* **337**, 1991, 1270–1272
- [13] Rosenblum, E. R. et al.: Assessment of the activity of phytoestrogens isolated of bourbon and beer. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 1993, 207–2109.
- [14] Swanson, C. A. et al.: Moderate alcohol consumption and risk of endometrial cancer. *Epidemiology* **4**, 1993, 530–536.
- [15] Simon, J., Rosolova, H.: Alkohol a zdraví. *Čas. lék. čes.* **133**, 1994, 330–334.
- [16] Baxter, D.: Beer is good for you-discuss. *Brewer* **82**, 1996, 63–69.
- [17] Rimm, E. B. et al.: Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary disease. *Br. Med. J.* **312**, 1996, 731–736.
- [18] Parazzini, F. et al.: Alcohol and endometrial cancer risk. *Nutrition and Cancer.* **23**, 1995, 56–62.
- [19] Gapstur, S. M. et al.: Alcohol consumption and postmenopausal endometrial carcinoma. *Cancer causes and contr.*, 1993, 323–329.
- [20] Kato, I., Tomina, G. A. S., Terao, C.: Alcohol consumption and cancers of hormone-related organs of females. *Jap. J. Clin. Oncol.* **19**, 1989, 202–207.
- [21] Kune, G. A., Kune, S., Watson, L. E.: Oral contraceptive use does not protect against large bowel cancer. *Contraception* **41**, 1990, 19–26.
- [22] Foster, A., Koberlein, A.: Der Verbleib von Xanthohumol aus Hopfen während der Bierbereitung. *Brauwelt* **138**, 1998, 1633–1637.

bilization with polyphenol sorbent or combination of both types is unsuitable due to high phytoestrogen losses that reached approximately 25 to 35 % compared to non-stabilized beer.

- Phytoestrogen losses between wort and beer are considerable. Fall in sum of the followed phytoestrogen markers was approximately 45 to 55 %, at colloidal stabilization with sorbent of polyphenols it reached ca 70 %.

**The results were acquired within solution of the research project NAZV QF 3229.**

- [23] Foster, A., Koberlein, A.: Der Verbleib von Xanthohumol aus Hopfen während der Bierbereitung. *Brauwelt* **138**, 1998, 1677–1681.
- [24] Stevens, J. F., Taylor, A. W., Clawson, J. E., Deizer, M. L.: Fate of Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1999, 2421–2428.

Lektoroval Ing. Pavel Dostálek, CSc.  
Do redakce došlo 10. 5. 2005



# ano

Rozhodující roli při zadávání zakázky přirozeně hrálo naše přání, mít dodávku na klíč. Za to, jak ale byla zvládnuta skutečná realizace a soulad všech jednotlivých kroků, musíme firmě KRONES složit kompliment. Počínaje výrobní technologií, přes plnění a balení až po logistiku, vše ruku v ruce s promyšlenou procesní automatizací a informační technologií, vždy zde byl pro nás jediný partner, KRONES.

Když je dodávka takřikajíc „z jedné ruky“, pak vás neudiví konečný výborný výsledek. Proto rádi říkáme nahlas: ano KRONES.