

PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY V PIVOVARSTVÍ

MARCEL KARABÍN, PAVEL DOSTÁLEK
a PAVEL HOFTA

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
karabinm@vscht.cz

Došlo 30.4.04, přepracováno 13.7.05, přijato 21.7.05.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, radikály, antioxidanty, chmel, pivo, mladina, sladina

Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení metod
 - 2.1. Chemické metody
 - 2.1.1. Metoda podle Kanedy
 - 2.1.2. Metoda 2,6-dichlorfenolindofenolová – metoda MEBAK 7.15.1
 - 2.1.3. Stanovení redukční síly (2,2'-bipyridyl)
 - 2.1.4. Stanovení čísla kyseliny thiobarbiturové
 - 2.1.5. Stanovení celkového antioxidačního stavu
 - 2.1.6. Metoda systému ABTS-TROLOX
 - 2.1.7. Metoda spoluoxidace β -karotenu v modelovém systému
 - 2.1.8. Inhibice lipoxygenasové aktivity
 - 2.2. Fyzikální metody
 - 2.2.1. Elektronová spinová rezonance (ESR)
 - 2.2.2. Stanovení redox potenciálu
 - 2.2.3. Chemiluminiscence
 - 2.2.4. Stanovení oxidačních změn pomocí ^{18}O
3. Závěr

1. Úvod

Během posledních deseti let se látky s antioxidačními účinky dostaly do popředí zájmu odborníků v řadě oborů potravinářství, zejména v souvislosti s jejich potvrzenými antikancerogenními účinky. V České republice, kde za minulý rok byla spotřeba piva 161 l na osobu¹ (nejvíce na světě), představuje pivo jeden z nejvýznamnějších zdrojů přírodních antioxidantů v potravě. Polyfenolové látky, jako nejširší skupina antioxidantů v pivovarství², hrají navíc významnou úlohu i v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování. Tento oxidační proces může vyústit v tvorbu celé řady senzoričky negativních látek. Za všechny jmenujme alespoň (*E*)-non-2-enal,

který je díky svému nízkému prahu vnímání ($0,1 \mu\text{g l}^{-1}$) látkou s velice negativními účinky na výsledný senzoričky profil produktu³. Na druhou stranu polyfenoly přítomné v pivu reagují s bílkovinami za vzniku nežádoucích komplexů, čímž snižují koloidní stabilitu piva. V důsledku těchto pozitivních i negativních vlivů na kvalitu je nyní aktuálním problémem pivovarského průmyslu nalezení cest ke stanovení antioxidačních vlastností a optimalizace obsahu těchto látek. V tomto článku si autoři kladou za cíl shrnout metody známé i z jiných oborů⁴, které jsou použitelné i pro pivovarskou praxi a podělit se o své zkušenosti s aplikacemi některých z nich v prostředí pivovarské analytiky.

2. Rozdělení metod

Metody stanovení antioxidačních účinků v pivovarských materiálech je možno rozdělit do dvou základních skupin: *i*) na metody chemické a *ii*) fyzikální⁵.

Chemické metody spočívají nejčastěji v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku naopak brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky. Je nutno podotknout, že srovnání hodnot poskytovaných jednotlivými metodami je velmi nesnadné, neboť jak antioxidantů, tak reaktivních látek způsobujících oxidační změny je celá řada a prakticky žádná z metod není schopna obsáhnout tento fakt v celé jeho šíři.

Fyzikální metody nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek. Namísto toho sledují změny fyzikálních vlastností, které tyto procesy provázejí.

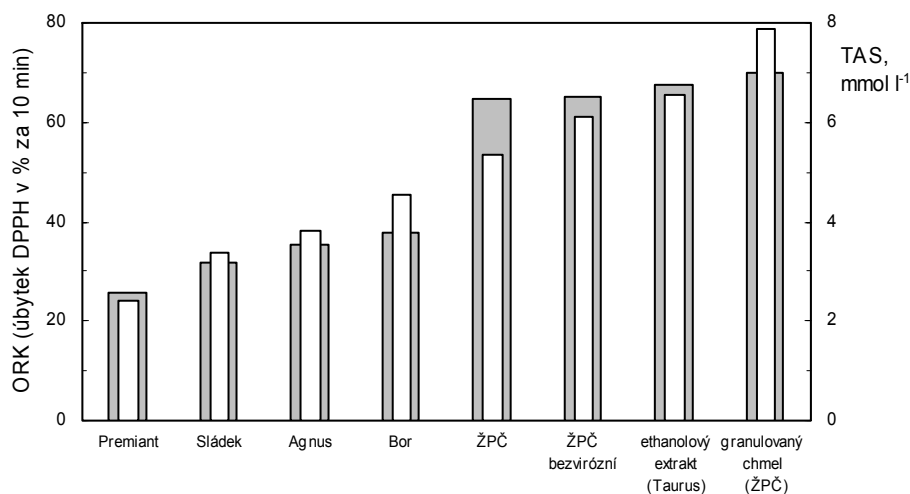
V dalším textu jsou metody řazeny podle jejich aplikační frekvence v pivovarství.

2.1. Chemické metody

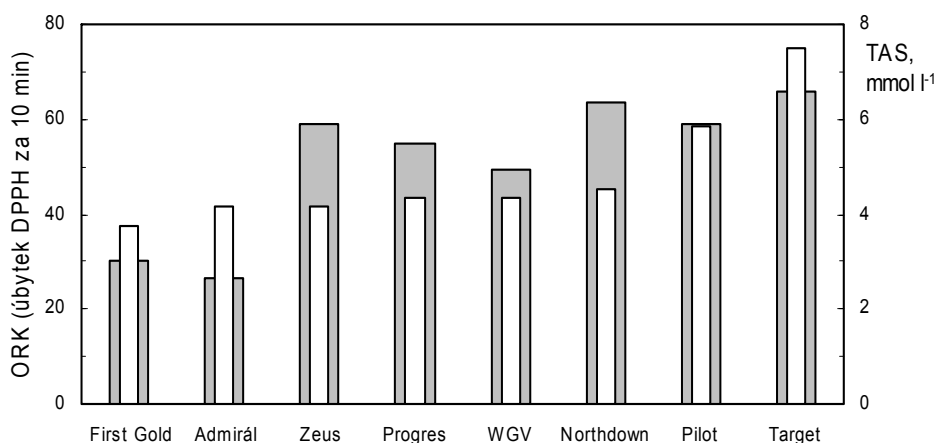
2.1.1. Metoda podle Kanedy⁶

DPPH, 1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl, je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku a přejít do formy stabilní diamagnetické molekuly. Intenzivní fialové zabarvení měřitelné při 520 nm je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu. Působením antioxidantů se intenzita jeho zabarvení snižuje a měří se v minutových intervalech po dobu 10 minut. Vzhledem k tomu, že je sledován úbytek látky, je možno použít i detekci HPLC, kdy je sledovanou veličinou plocha pásu odpovídající DPPH.

Použitelnost této metody v pivovarství byla autory úspěšně odzkoušena a bylo provedeno srovnání s metodou



Obr. 1. Srovnání výsledků metod zjišťování oxido-redukční kapacity dle Kanedy (ORK) a celkové antioxidační kapacity (TAS) u českých hlávkových chmelů a chmelových výrobků; ŽPČ – Žatecký poloraný červeňák; ■ ORK, □ TAS



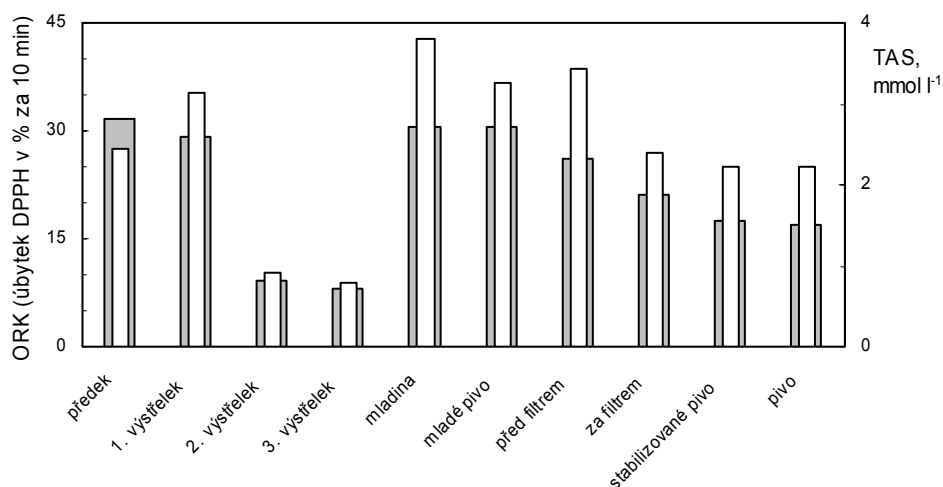
Obr. 2. Srovnání výsledků metod zjišťování oxido-redukční kapacity dle Kanedy (ORK) a celkové antioxidační kapacity (TAS) v zahraničních hlávkových chmelech; ■ ORK, □ TAS

stanovení celkového antioxidačního stavu (TAS – Total Antioxidation Status), uvedenou v kapitole 2.1.5.

Roztok DPPH ($1,86 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v ethanolu byl smíchán s acetátovým tlumivým roztokem (pH 4,3) v poměru 2:1. K 2,8 ml pracovního roztoku DPPH bylo přidáno 0,2 ml vzorku a ihned byla proměřena absorbance při 525 nm. Odbarvování indikátoru pak bylo měřeno v 1 cm skleněné kyvetě v minutových intervalech po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Výsledky se vyjadřují jako úbytek DPPH po 10 min v procentech.

Výsledky srovnání s metodou stanovení TAS pro různé materiály jsou uvedeny na obrázcích 1 až 3. Byly

stanoveny antioxidační vlastnosti výluhů 6 českých a 8 zahraničních chmelů a 2 druhů chmelových výrobků uvedenými metodami. Tyto výluhy byly připraveny prostým povařením 10 g vzorku v 400 ml vody pod zpětným chladičem na vodní lázni, následným doplněním na objem 500 ml a filtrací přes papírový a membránový filtr. Dále byly stanoveny i antioxidační vlastnosti jednotlivých mezi-produktů výroby piva. Je zřejmé, že obě metody poskytují srovnatelné výsledky. Uvedené hodnoty jsou průměrem z 5 stanovení, přičemž odchylka jednotlivých stanovení se u všech uváděných výsledků pohybovala v rozmezí 0,1 až 0,2 mmol l⁻¹ u metody TAS, resp. 5–8 % u metody dle



Obr. 3. Srovnání výsledků metod zjišťování oxido-redukční kapacity (ORK) a celkové antioxidační kapacity (TAS) v meziproduktech výroby 12 % světlého piva; ■ ORK, □ TAS

Kanedy. Mezi českými odrůdami žatecký poloraný červeňák dosahuje výrazně nejvyšších hodnot. Některé odrůdy zahraničních chmelů sice mohou v tomto směru žateckému chmelu konkurovat, zde je však nutno podotknout, že tyto chmely mají často výrazně vyšší obsah α -hořkých kyselin, při výrobě se jich proto dávkuje méně a v pivo se proto rozdíl v dosažených hodnotách antioxidačních aktivit vlivem dávkování dále zvyšují. Chmelové výrobky vykazují v podstatě stejné hodnoty antioxidačních vlastností jako hlávkový chmel. Mírné zvýšení lze vysvětlit zkoncentrováním aktivních látek v procesech výroby granulátu respektive ethanolvého extraktu, který je sice koncentrátem, ovšem připravuje se obvykle z odrůd s nižším obsahem polyfenolických látek a tudíž rozdíl v hodnotách neodpovídá míře zkoncentrování.

Na obr. 3 je možno sledovat změny antioxidačních vlastností v průběhu procesu výroby piva. Ve sladince jsou hodnoty vysoké, v důsledku přestupu sladových polyfenolů a reduktonů do sladiny. Oxidačními reakcemi v průběhu chmelovaru se antioxidační aktivita snižuje, ovšem přidávek dalších polyfenolických látek z chmele ji udržuje na hladině srovnatelné se sladinou. Tak je tomu i v procesu hlavního kvašení, kdy jsou do systému dodávány další látky s antioxidačními účinky spolu s kvasinkami. Filtrací je část látek sorbovaných na povrch kvasničné buňky odstraněna, nicméně i po poměrně prudkém poklesu antioxidační aktivity se tyto hodnoty drží na velmi vysoké úrovni.

2.1.2. Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová) – metoda MEBAK 7.15.1

Tato metoda⁷ je standardní metodou podporovanou MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission). Principem je reakce 2,6-dichlorfenol-

indofenolu s endiolovou skupinou polyfenolů za vzniku bezbarvých dioxosloučenin. Tato změna zbarvení je stanovitelná spektrofotometricky; v případech, kdy není možno optických metod použít (tmavá piva, kvasnicová piva), se používá kombinace s voltametrickou detekcí⁸. Výsledky jsou vyjadřovány jako ekvivalenty množství kyseliny L-askorbové, která slouží jako standard.

2.1.3. Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem

Tato metoda, rozpracovaná Chaponem⁹, je založena na reakci železitých iontů s 2,2'-bipyridylem. Vzniklý komplex je silným oxidačním činidlem a reakcí se širokou skupinou redukujících látek se mění z bezbarvé oxidované formy na červenou, redukovanou. Tuto změnu lze měřit spektrofotometricky při 510 nm po třiminutové prodlevě.

2.1.4. Stanovení čísla kyseliny thiobarbiturové (TBA)

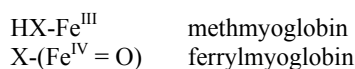
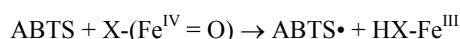
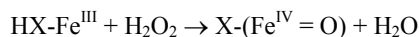
Kyselina thiobarbiturová poskytuje reakci s karbonylovými sloučeninami řady barevných produktů¹⁰. Reakcí s pivem vzniká převážně žluté zbarvení absorbující při 455 nm a červené absorbující při 530 nm. Zvýšením kyselosti, teploty a doby reakce se tvorba obou barevných produktů významně zvyšuje. Reakce se provádí smícháním roztoku TBA ve směsi isopropylalkoholu a vody s odplyněným pivem, následuje inkubace při 60 °C po dobu 30 min a následně se změří absorbance při 455 a 530 nm proti slepému pokusu. Výsledkem jsou dvě hodnoty absorbance, označované jako číslo kyseliny thiobarbiturové.

2.1.5. Stanovení celkového antioxidačního stavu

Tato metoda¹¹ byla doposud hojně využívána v medicínské praxi, zejména při stanovování antioxidačních vlastností v krvi a séru. Nejčastěji je používána ko-

měření souprava fy RANDOX, ovšem v poslední době byly vyvinuty nové postupy za použití automatických spektrofotometrů, poskytující srovnatelné výsledky spolu s řadou výhod¹².

Metoda za použití komerční soupravy spočívá v reakci methmyoglobinu s peroxidem vodíku za tvorby radikálu ferrylyoglobinu. Uvedený radikál reaguje s 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátem) (ABTS) v substrátu a vytváří radikál-kation ABTS⁺ modrozelené barvy. Antioxidanty v systému zabraňují tvorbě ABTS[•] v míře odpovídající jejich koncentraci. Reakce probíhá při 37 °C, měří se při vlnové délce 600 nm.



V 1 cm kyvetách byly přesně 1 min po smíchání a promíchání měřeny absorbance A_1 kontrolního vzorku (20 μl redukující vody a 1 ml chromogenu), standardu (20 μl 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny a 1 ml chromogenu). Poté bylo do všech kyvet přidáno 200 μl (250 $\mu\text{mol l}^{-1}$) peroxidu vodíku. Po promíchání je za 3 minuty opět měřena absorbance A_2 . Celková antioxidační kapacita TAS v mmol l^{-1} se vypočte ze vztahu:

$$\text{TAS} = \left[\frac{\text{koncentrace standardu}(\Delta A_{\text{kontrolní vzorek}} - \Delta A_{\text{standard}})}{(\Delta A_{\text{kontrolní vzorek}} - \Delta A_{\text{vzorek}})} \right] \times (\text{mmol l}^{-1} \text{ vzorku})$$

kde $\Delta A_{\text{kontrolní vzorek}} = \Delta A_{1 \text{ kontrolní vzorek}} - \Delta A_{2 \text{ kontrolní vzorek}}$
 $\Delta A_{\text{standarda}} = \Delta A_{1 \text{ standard}} - \Delta A_{2 \text{ standard}}$
 $\Delta A_{\text{vzorek}} = \Delta A_{1 \text{ vzorek}} - \Delta A_{2 \text{ vzorek}}$

2.1.6. Metoda ABTS-TROLOX

Základem metody¹³ je stejně jako u metody TAS generování radikálového kationtu ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)). Zde je však měřena relativní zhasací schopnost antioxidantů ve srovnání s 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovou kyselinou (TROLOX). Relativní antioxidační aktivita je definována jako koncentrace TROLOXu se stejnou antioxidační aktivitou, jako má 1 mM koncentrace stanovovaného vzorku. V praxi se jako zdroj peroxidového radikálu používá 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH), jehož směs s ABTS se inkubuje v acetátovém pufru o pH 4,3 při 45 °C po dobu 60 min. Po ochlazení a přidání vzorku, resp. pufru v případě slepého vzorku, se po 25 min měří absorbance při 734 nm. Tato tzv. hodnota TRAP (total reactive antioxidant potential) je v pivovarství považována za odpovídající indikátor antioxidačních účinků výhradně polyfenolických látek.

$$\text{TRAP (mM)} = \frac{(A_{\text{vzorku}} - A_{\text{slep}})}{(A_{\text{standard}} - A_{\text{slep}})} \times C_{\text{standard}}$$

2.1.7. Metoda spoluoxidace β -karotenu v linoleátovém modelovém systému

Tato metoda byla adaptována pro potřeby pivovarství Goupym¹⁴. β -Karoten je díky systému dvojných vazeb ve svém řetězci výborným pohlcovačem radikálů. Je přidáván do vzorku a spolu s ním podroben oxidaci. Měřenou veličinou je pokles absorbance β -karotenu při 470 nm za a bez přítomnosti antioxidantů ze vzorku. Antioxidační vlastnosti jsou vyjádřeny jako procenta inhibice oxidace β -karotenu.

2.1.8. Inhibice lipoxygenasové aktivity

Metoda inhibice lipoxygenasové aktivity¹⁵ se používá pro určení antioxidačních schopností zejména v ječmenných a sladových extraktech. Lipoxygenasová aktivita se běžně vyjadřuje v nanomolech spotřebovaného kyslíku za sekundu (nkat). Antioxidační kapacita bývá pak stejně jako v předchozím případě vyjadřována v procentech inhibice v porovnání se srovnávacím vzorkem. Další metody (stanovení hydroxylového a superoxidového radikálu¹⁶, autooxidace methylinoleátu¹⁷, metoda redukce jodu¹⁶) jsou používány spíše okrajově.

2.2. Fyzikální metody

2.2.1. Elektronová spinová rezonance (ESR)

Tato v poslední době velmi oblíbená metoda je schopna určit přítomnost iontů, které obsahují nepárové elektrony, a je proto vhodná pro stanovení volných kyslíkových radikálů, případně jejich komplexů s některými kovovými ionty. Uchida a Ono¹⁸ vyvinuli metodu pro stanovení endogenní antioxidační aktivity piva. Tato technika umožnila i predikci chuťové stability piva. Volné radikály byly detegovány během uměle navozeného oxidačního testu při 60 °C s 9,5 ml vzduchu v prostoru hrdla láhve. Použita byla metoda spinové pasti spolu s ESR. Jako spinová činidla byl použit *N-terc-butyl- α -fenylnitron* a 2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrol-1-oxid (DMPO). Byl prokázán fakt, že k tvorbě hydroxylového radikálu nedochází ihned po započítí testu, ale až po určitém časovém posunu. Tento čas pak může být využit jako indikátor endogenní antioxidační aktivity vzorku piva. Další sledovanou veličinou je t_{150} , což je odezva po 150 min, která je přímo úměrná koncentraci hydroxylových radikálů ve vzorku.

Pozdější práce¹⁹ se věnovaly využití metody pro stanovení antioxidačních vlastností jednotlivých skupin látek obsažených v pivu. Nepotvrdily však výrazné antioxidační vlastnosti látek ze skupiny polyfenolů, větší význam přikládají látkám na bázi síry.

Možnému využití kombinace ESR a některých chemických metod pro předpověď chuťové stability piv se věnoval Franz²⁰, který zjistil zajímavé korelace mezi senzorickým stárnutím a technologickými podmínkami při výrobě mladiny.

2.2.2. Stanovení redox potenciálu

Poprvé bylo stanovení redox potenciálu²¹ v pivovarském průmyslu použito již ve třicátých letech minulého století. Postupem času byla opuštěna cesta kolorimetrické detekce a výzkum se soustředil výhradně na elektrochemické stanovení rH (redox potenciálu vztaženému ke standardní vodíkové elektrodě). Postupem času byly určeny tři skupiny látek, které rozhodující měrou ovlivňují hodnotu redox potenciálu v pivovarském procesu.

- rozpuštěný kyslík (hodnota rH je lineárně závislá na jeho koncentraci),
- těžké kovy a jejich komplexy (zejména železo a měď),
- látky povahy reduktonů.

Bylo rovněž prokázáno, že měření potenciálu vyjadřují pouze okamžitý oxidačně-redukční vliv zmiňovaných látek ve vzorku, a že tedy tyto hodnoty nemohou být použity pro kvantifikaci obecných antioxidačních vlastností vzorku, neboť na něm se podílejí i další, elektrochemicky neaktivní látky. Další výzkum se proto omezil na optimalizaci používaných systémů s tím, že sledování redox potenciálů bude mít pouze informativní charakter a bude používáno jako způsob sledování obsahu rozpuštěného kyslíku.

2.2.3. Chemiluminiscence

Japonští autoři Kaneda²² a Kobayashi²³ zkoumali rovněž použití chemiluminiscence jako metody pro stanovení intenzity oxidace lipidů. Bylo vyzkoušeno více luminiscenčních činidel, z nichž se nejvíce osvědčil 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion (isoluminol) a 6-fenyl-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a] pyrazin-3-on, což je analog luciferinu. Bylo zjištěno, že rozhodující vliv na intenzitu oxidace lipidů má jednak teplota, kdy bylo dosaženo největší intenzity luminiscence při teplotách okolo 65 °C, jednak intenzita míchání. To odpovídá podmínkám, které jsou běžné při rmutování, které bylo již dříve považováno za kritický krok z hlediska oxidace lipidových složek při přípravě mladiny.

Jejich práce rozvinul Walters¹⁵, jehož postup je založen na reakci luminolu s peroxidem vodíku za přítomnosti zesilovače (1,1,4,7,7-diethylentriaminpentaoctová kyselina), která produkuje záblesk světla, stálý po dobu 30 s. Přítomnost antioxidantu pak způsobuje zhasnutí luminiscence a pokles intenzity signálu.

Srovnání antioxidačních vlastností metodou chemiluminiscence v pivo a víně se věnovali italští autoři²⁴, kteří zároveň ověřili pro tyto nápoje vztahy mezi antioxidačními vlastnostmi zjištěnými touto metodou a obsahem polyfenolických složek.

2.2.4. Stanovení oxidačních změn pomocí ¹⁸O

Řada autorů, jmenovitě Collin²⁵, Noel²⁶ a Lermusieau²⁷ se v posledních letech zabývalo možnostmi použití isotopu kyslíku ¹⁸O pro určení oxidačních změn probíhajících během skladování piva. Do prostoru hrdla lahve je vstříknuto určité množství isotopu, pivo v lahvi je podrobeno stárnutí po dobu několika měsíců při pokojové teplotě a potom je pivo analyzováno metodou GC-MS. Přítomností nebylo prokázáno zvýšené množství isotopu v molekulách

(E)-non-2-enalu, což indikuje, že většina karbonylových sloučenin nevzniká oxidačními změnami lipidových složek během skladování piva.

3. Závěr

Velký zájem, který se v posledních letech soustřeďuje na otázku antioxidačních vlastností různých látek jak v řadách laické veřejnosti, tak i potravinářských odborníků, má za následek nutnost vytvoření spolehlivých metod pro stanovení jak obsahu těchto látek, tak i účinků, které jejich přítomnost v potravinách navozuje. V pivovarské technologii je k těmto aspektům nutno přidat i fakt, že oxidační reakce v celém procesu výroby piva mají za následek zásadní ovlivnění organoleptických vlastností produktu. Proto patří pivovarští analytici k nejaktivnějším co do snahy optimalizovat dostupné metody pro jejich potřeby tak, aby byla získána metoda co nejdříve použitelná, rychlá a zároveň přesná. Uvedený přehled metod je výběrem těch, které již byly v pivovarství odzkoušeny a jsou ve větší či menší míře používány. Také jsou srovnávány hodnoty získané za použití dvou z těchto metod a spolu s tím jsou ověřovány i specifické vlastnosti chmele odrůdy žatecký poloraný červeňák. Pozornost byla také věnována změnám profilu antioxidační aktivity v průběhu procesu výroby piva s ohledem na kritické body, ve kterých dochází k největšímu oxidačnímu zatížení produktu.

Tato práce je součástí řešení výzkumného centra IM6215648902.

LITERATURA

1. Statistické přehledy 2003, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský Praha, 2004.
2. Čepička J., Karabín M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
3. Walters M. T., Heasman A. P., Hughes P. T.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 55, 83 (1997).
4. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Chem. Listy 98, 174 (2004).
5. Moll M: Monatsschr. Brauwiss. 54, 64 (2001).
6. Kaneda H., Kobayashi N., Takashio I., Tamaki I., Shinotsuka K.: Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am. 36, 41 (1999).
7. MEBAK vol. II, method 7.15.1, 307 (1979).
8. Ralph M. S., Neumann R., Wabner D.: Electroanalysis 14, 969 (1999).
9. Chapon L., Louis C., Chapon S.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 13, 307 (1971).
10. Grisby J. H., Palamand S. R.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 34, 49 (1976).
11. Trefil L., Racek J., Holeček V.: Randox – Seminář, Plzeň, Sborník přednášek 24 (2000).
12. Erel O.: Clin. Biochem. 37, 277 (2004).
13. Araki S., Kimura T., Shimizu C., Furusho S., Takashio M., Shinotsuka H.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 57, 34 (1999).

14. Goupy P., Hughes M., Boivin P., Amiot M. J.: *J. Sci. Food Agric.* 79, 1625 (1999).
15. Walters M. T., Hughes P. S., Bamforth C. W.: *Proc. Congr. – Inst. Brew. (Asia Pac. Sect.)* 24, 103 (1996).
16. Boivin P., Allain D., Clamagirant V., Maillard M. N., Cuvelier M. E., Berset C., Richard H., Nicolas J., Forget-Richard F.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 24 397 (1993).
17. Ohtsu K., Hashimoto N., Inoue T., Miyki S.: *Brew. Digest* 6, 18 (1986).
18. Uchida M., Ono M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 198 (1996).
19. Andersen L., Outtrup H., Skibsted H.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3106 (2000).
20. Franz O., Back W.: *Tech. Q. MBAA Commun.* 40, 20 (2003).
21. Buckee G. K., Mom M., Nye J. W. S., Hammond, R. V.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 26, 607 (1997).
22. Kaneda H., Kano Y., Kamimura M.: *J. Inst. Brew.* 97, 105 (1991).
23. Kobayashi N., Kaneda H., Kano Y., Koshino S.: *J. Inst. Brew.* 99, 143 (1993).
24. Girotti S., Bolelli L., Fini F., Budini R., Arfelli G.: *Ital. J. Food Sci.* 14, 113 (2002).
25. Collin S., Noel S., Bonte S., Metais N., Bodart E., Peladan F., Dupire S.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 26, 535 (1997).
26. Noel S., Liegeois C., Lermusieau G., Collin S.: *J. Inst. Brew.* 105, 269 (1999).
27. Lermusieau G., Noel S., Liégeois C., Collin S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57, 29 (1999).

M. Karabín, P. Dostálek, and P. Hofta (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Application of Methods for Estimation of Antioxidant Activity in Brewing**

In recent years many methods for determination of antioxidant activity in malting and brewing have been described. Brewing raw materials such as barley, malt, hop and hop products, and wort are complex in their composition, and in type and amount of antioxidants. This paper describes chemical and physical methods of analysis of antioxidants and determination of their activity in hop and in brewing.