

# Z výzkumu a praxe

## ZMĚNY BARVY PŘI CHEMICKÉ A FOTOCHEMICKÉ OXIDACI PIVA

Doc. Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Budějovický Budvar, n. p., Č. Budějovice

**Klíčová slova:** pivo, barva, změny, chemické a fotochemické oxidace

### 1. ÚVOD

Oxidační změny v pivu se projevují změnou jeho barvy. Zvýšená intenzita zbarvení piva se obvykle přisuzuje oxidaci polyfenolů a přeměně melanoidních látek.

V minulém roce jsme vyvinuli postup, umožňující významně zrychlit oxidaci piva. Přidavek peroxidisíranu amonného nebo draselného k pivu vyvolává změny, typické pro stárnutí piva. Barva piva se mění do červenohněda, narůstá zákal a pivo chutově stárne [1–3].

Při oxidaci piva peroxidisíranem draselným nebo amonným absorbance vzrůstá při vyšších vlnových délkách viditelného spektra, zatímco při nízkých vlnových délkách může dočasně klesat. Tento pokles se přiřítal oxidaci melanoidních látek, ačkoliv později se zjistilo, že podobně může reagovat i vodný výluh chmele [4].

V předchozích pokusech se většinou měřily změny absorbance vytřepaného piva za přístupu vzduchu a světla. Světlo i vzdušný kyslík mohou významně podporovat oxidaci biochemických sloučenin fotodynamickým efektem, přičemž přírodní barviva mohou působit jako fotosenzitizéry [5, 6].

Podrobně prozkoumanou fotochemickou reakcí v pivovarství je tvorba tzv. letinkové příchuti piva. Jako senzitizer při ní pravděpodobně působí riboflavin, přičemž se působením světla odštěpuje z molekuly izo- $\alpha$ -kyselin postranní izohexenylový radikál, na který se váže SH-skupina, pocházející ze sirných aminokyselin. Přitom vzniká 3-methyl-2-buten-1-thiol, udávající pivu nepřijemnou vůni a chuť [7].

### 2. MATERIÁL A METODY

#### 2.1 Chemikálie a roztoky

Peroxidisíran amonný, čistý, pocházel od firmy LACHEMA, Brno. Roztok 40% peroxidisíranu amonného se připravil rozpuštěním čisté látky v destilované vodě. Roztok se dával do piva v množství odpovídajícím výsledné koncentraci 0,1 %.

#### 2.2 Roztok melanoidinů

V 1 litru 0,02 M fosfátového ústojného roztoku (pH = 5,5) se rozpustilo 72 g maltosy, 18 g glukosy, 150 mg xylosy a 1,5 g glycinu a vařilo 100 min pod zpětným chladičem [8]. Po ochlazení činily absorbance výsledného roztoku při vlnových délkách 380 a 430 nm 0,233 a 0,056.

#### 2.3 Chmelový a čajový výluh

Jedním litrem vroucí destilované vody se

přelilo 2,5 g chmele nebo zeleného čaje (gun powder) a po vychladnutí zfiltrovalo. Absorbance chmelového výluhu při vlnových délkách 380 a 430 nm byly 0,760 a 0,093, absorbance čajového výluhu při těchto vlnových délkách činily 0,678 a 0,140.

#### 2.4 Analyzované materiály

Bílé víno (Müller Thurgau) pocházelo z maloobchodu. Jeho absorbance byla 0,421 (380 nm) a 0,118 (430 nm).

Světlé pivo s původním extraktem 12 % se zbavilo oxidu uhličitého třepáním za přístupu vzduchu (koncentrace rozpuštěného kyslíku 6–8 mg.l<sup>-1</sup>), nebo pod kvasným uzávěrem po předchozím vytěsnění vzduchu dusíkem (koncentrace rozpuštěného kyslíku 0,2–0,4 mg.l<sup>-1</sup>).

Provozní sladina (předek) nebo mladina se vytřeřaly za přístupu vzduchu (koncentrace rozpuštěného kyslíku 6–8 mg.l<sup>-1</sup>) nebo probublaly dusíkem (koncentrace rozpuštěného kyslíku 0,2–0,4 mg.l<sup>-1</sup>). Stejným způsobem se upravily roztoky melanoidinů a chmelový výluh.

#### 2.5 Fotochemická oxidace roztoků v kyvetách

Válcovité kyvety (Dr. B. Lange, SRN) s vnějším průměrem 1,3 cm se na vzduchu nebo pod proudem dusíku naplnily po okraj příslušným roztokem injekční stříkačkou a uzavřely speciální pryžovou zátkou. Polovina nádobek se již před plněním obalila hliníkovou fólií pro zamezení přístupu světla.

Kyvety se umístily v horizontální poloze v ultratermostatu tak, aby je překrývala 5 mm silná vrstva vody a ze vzdálenosti 20 mm se shora ozařovaly 50 W halogenovou žárovkou. Po zvolené 2 až 4 h expozici se obsah kyvet převedl do pravoúhlých kyvet s šířkou 1 cm a vzorky se proměřovaly při vybraných vlnových délkách.

#### 2.6 Absorpční spektra a absorbance

Absorpční spektra se měřila spektrofotometrem CADAS 100 (Dr. B. Lange,

SRN) s programem PSCAN v intervalu 10 nm. Při zkráceném záznamu spektra se snižovaly absorbance v intervalu 380 až 680 nm po 50 nm testem  $\lambda/t$ .

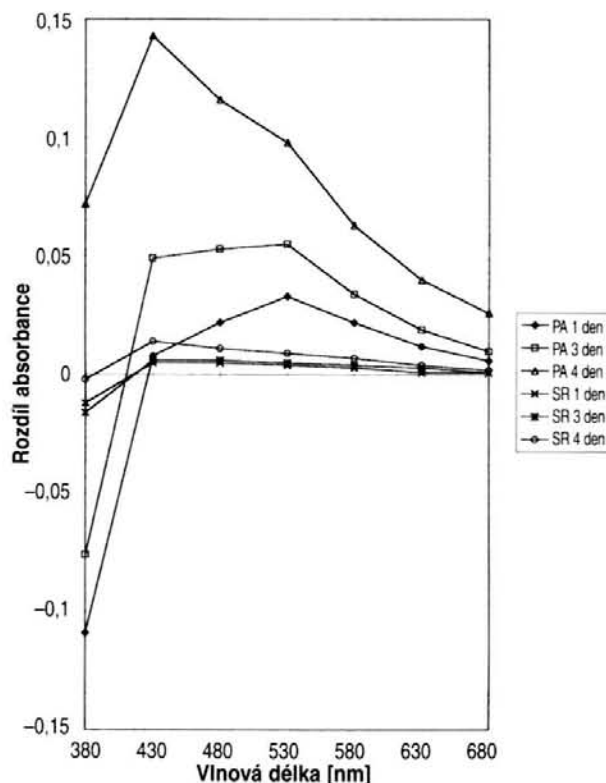
### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1 Chemická oxidace piva v hnědých láhvích

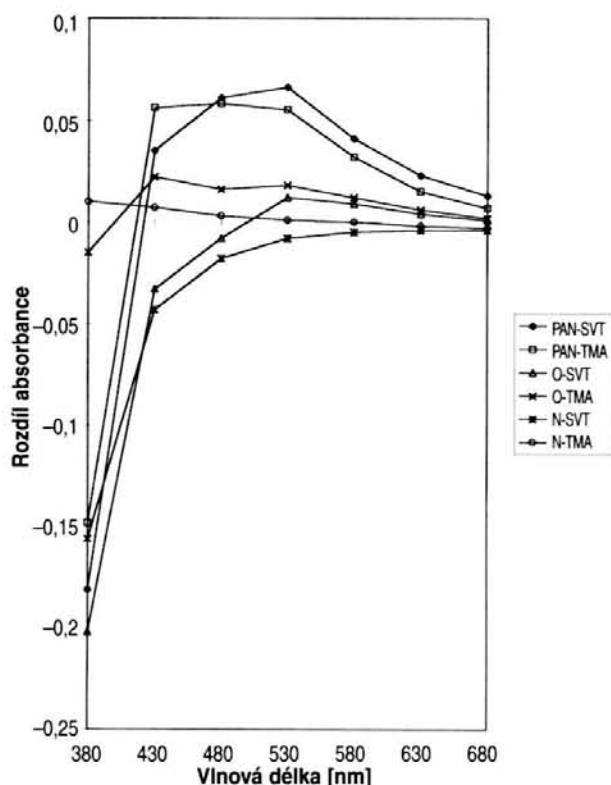
K 12% pivu v hnědých láhvích (koncentrace rozpuštěného kyslíku 0,2 mg.l<sup>-1</sup>) se přidal 40% peroxidisíran amonný ve výsledné koncentraci 0,1 % v pivu, láhve se doplnily po okraj pivem a uzavřely korunkou. Srovnávací vzorky se upravily stejným objemem destilované vody. Láhve se vystavily podzimmu dennímu světlu při zatažené obloze po 3 dny při 25 °C.

V pravidelných časových intervalech se láhve otevřely a po vytřeřání pod dusíkem se proměřily absorbance vzorků. Absorbance původního vzorku piva při vlnových délkách 380 a 430 nm byly 1,463 a 0,455. Změny absorbancí piv proti původnímu vzorku piva před osvětlením uvádí obr. 1.

Z průběhu absorbance je patrný její pokles při 380 nm, následovaný pozdějším vzestupem



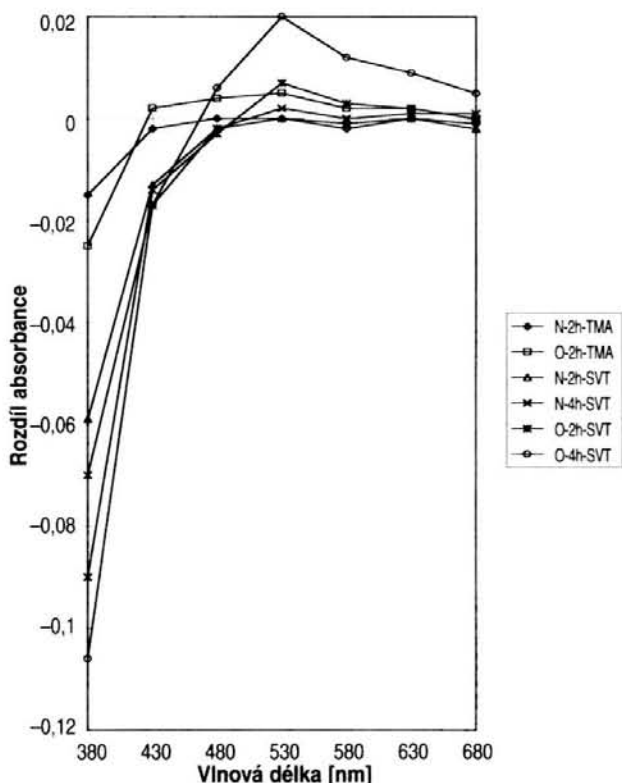
Obr. 1 Diferenční spektrofotometrie 12% piva v hnědých láhvích s přidavkem 0,1 % peroxidisíranu amonného [PA] a srovnávacích piv [SR] při 25 °C



Obr. 2 Diferenční spektrofotometrie 12% piva v čirých láhvích s přidávkou 0,1% peroxidisíranu amonného [PA], po úpravě vzduchem -O- nebo dusíkem -N- po 3 dnech na světle [SVT] a ve tmě [TMA] při 25 °C

absorbance u vzorků s přidávkou peroxidisíranu amonného. Při vyšších vlnových délkách absorbance vzrůstala již od počátku. Tento trend souhlasil s předchozím pozorováním [3]. Absorbance srovnávacích vzorků

znamenal výrazný počáteční pokles absorbance ve vzorcích s vyšším obsahem rozpuštěného kyslíku a vystavených světlu, nebo ve vzorcích s peroxidisíranem amonným. Pouze ve vzorcích s nízkým obsahem



Obr. 3 Diferenční spektrofotometrie 12% piva po úpravě vzduchem -O- nebo dusíkem -N-, ozařovaného světlem [SVT] a ve tmě [TMA] při 25 °C

se v oblasti vlnových délek 430 až 680 nm výrazně neměnily.

### 3.2 Oxidace piva v láhvích z čirého skla

Světlé pivo s původním extraktem 12 % se po úpravě na nízký a vysoký obsah rozpuštěného kyslíku podle odstavce 2.4 rozplnilo do lahví z čirého skla, pokrytých nebo nepokrytých hliníkovou fólií a láhve se uzavřely kloboučkovým uzávěrem.

Polovina láhví obsahovala peroxidisíran amonný ve výsledné koncentraci 0,1 % v pivu, k druhé polovině vzorků se přidalo stejné množství destilované vody. Láhve se vystavily dennímu světlu po 3 dny při 25 °C. Po expozici se proměřily absorbance vzorků. Absorbance původního vzorku piva při 380 a 430 nm byly 1,456 a 0,440. Změny absorbancí piv proti původnímu vzorku piva před osvětlením uvádí obr. 2.

V čirých láhvích se znamenal výrazný počáteční pokles absorbance ve vzorcích s vyšším obsahem rozpuštěného kyslíku a vystavených světlu, nebo ve vzorcích s peroxidisíranem amonným. Pouze ve vzorcích s nízkým obsahem

kyslíku a chráněných proti světlu se absorbance neměnily (obr. 2).

### 3.3 Fotochemická oxidace piva v kyvetách

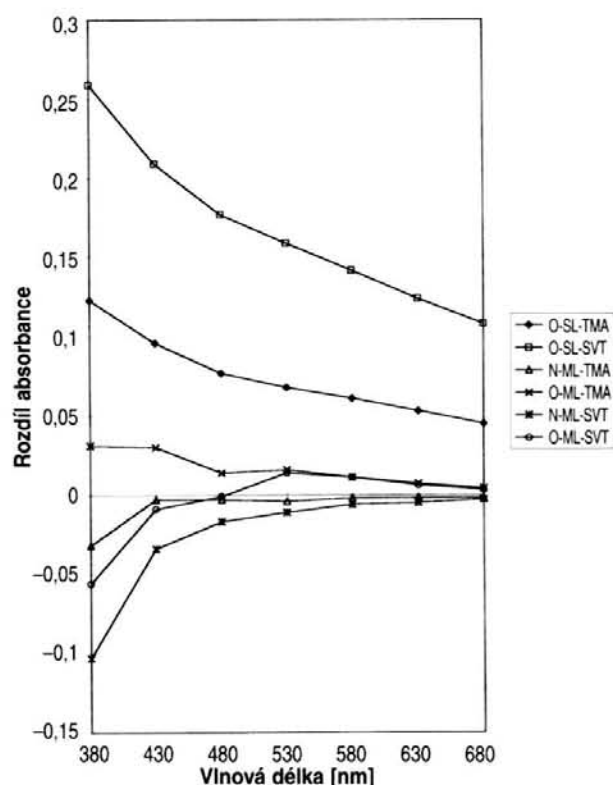
Světlé pivo s původním extraktem 12 % se po úpravě na nízký a vysoký obsah rozpuštěného kyslíku podle odstavce 2.4 ozařovalo 2 a 4 h halogenovou žárovkou při teplotě 25 °C. Absorbance původního vzorku piva při 380 a 430 nm byly 1,430 a 0,434. Srovnávací vzorky se plnily do kyvet chráněných hliníkovou fólií. Po expozici se proměřily absorbance vzorků podle odstavce 2.6 (obr. 3). Po fotochemické oxidaci se absorbance při 380 nm nejvíce snížila při současném působení světla a kyslíku.

Pouze vzorky ozařované žárovkou vykázaly výrazný pokles absorbancí, přičemž výraznější změny se vyskytly u vzorků s vysokým obsahem rozpuštěného kyslíku.

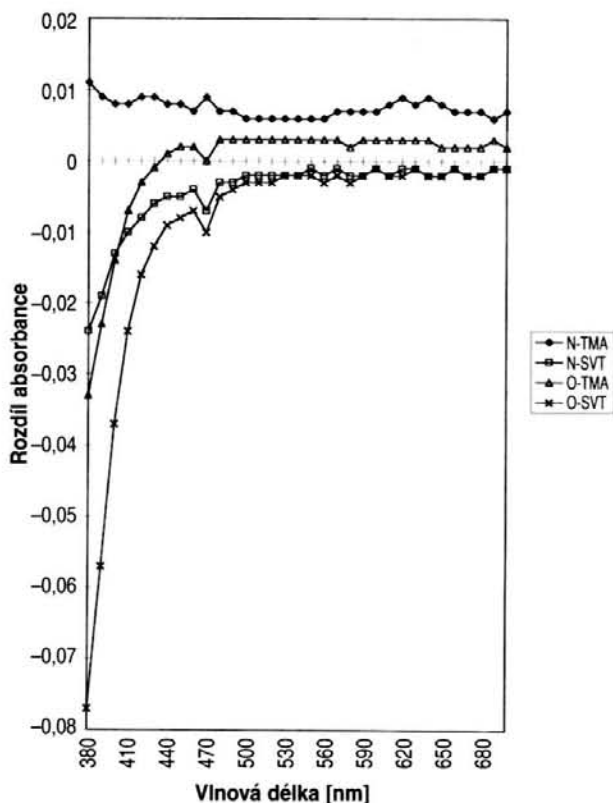
### 3.4 Fotochemická oxidace sladiny a mladiny v kyvetách

Sladina (14% předek), nebo mladina (12%) s nízkým a vysokým obsahem rozpuštěného kyslíku podle odstavce 2.4 se ozařovaly 3 h halogenovou žárovkou při teplotě 25 °C. Po ozařování v kyvetách chráněných a nechráněných hliníkovou fólií se proměřily absorbance vzorků. Diferenční měření absorbancí uvádí obr. 4.

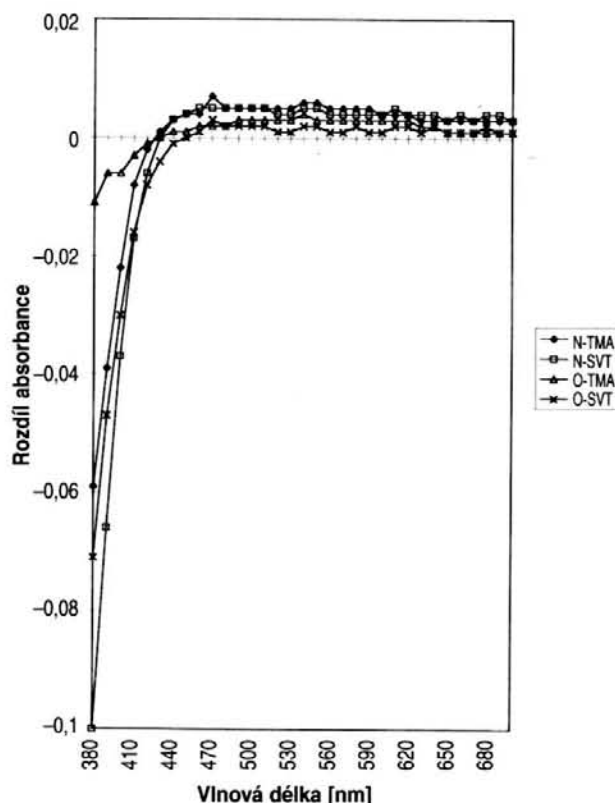
Výsledky potvrdily předchozí nálezy při oxidaci sladiny a mladiny peroxidisíranem amonným [4]. Pokles absorbance při 380 nm u mladiny s nízkým obsahem rozpuštěného kyslíku a vystavené světlu může souviset s relativně nižším nárůstem absorbance při oxidaci polyfenolových látek chmele.



Obr. 4 Diferenční spektrofotometrie sladiny [SL] a mladiny [ML], po úpravě vzduchem -O- nebo dusíkem -N- po 3 h ozařování [SVT] a ve tmě [TMA] při 25 °C



Obr. 5 Diferenční spektrofotometrie melanoidních látek, po úpravě vzduchem -O-, nebo dusíkem -N- po 2 h ozařování [SVT] a ve tmě [TMA] při 25 °C



Obr. 6 Diferenční spektrofotometrie chmelového výluhu po úpravě vzduchem -O-, nebo dusíkem -N- po 2 h ozařování [SVT] a ve tmě [TMA] při 25 °C

### 3.5 Fotochemická oxidace melanoidních látek v kyvetách

Roztok melanoidních látek s nízkým a vysokým obsahem rozpuštěného kyslíku podle odstavce 2.4 se ozařoval 2 h halogenovou žárovkou při teplotě 25 °C. Po ozařování v kyvetách chráněných a nechráněných hliníkovou fólií se diferenčně proměřilo absorpční spektrum (obr. 5).

Při oxidaci melanoidních látek se opět nejvíce snížila absorbance při 380 nm při současném působení světla a rozpuštěného kyslíku.

### 3.6 Fotochemická oxidace výluhu chmele v kyvetách

Chmelový výluh s nízkým a vysokým obsahem rozpuštěného kyslíku podle odstavce 2.4 se shora ozařoval 2 h halogenovou žárovkou při teplotě 25 °C. Po ozařování v kyvetách chráněných a nechráněných hliníkovou fólií se diferenčně proměřilo absorpční spektrum (obr. 6).

Také chmelový výluh podléhal silné fotooxidaci. Vliv ozaření byl dokonce výraznější než vysoký obsah rozpuštěného kyslíku.

### 3.7 Fotochemická oxidace čajového výluhu a bílého vína

Výluh zeleného čaje nebo bílé víno se po protřepání se vzduchem shora ozařovaly 3 h halogenovou žárovkou při teplotě 25 °C. Po ozařování v kyvetách chráněných a nechráněných hliníkovou fólií se proměřily absorbance vzorků. Diferenční měření absorbancí uvádí obr. 7.

Výluh zeleného čaje, který obsahuje pře-

vážně třísloviny, se po ozaření choval podobným způsobem jako sladina (obr. 4 a 7). Čajové i chmelové třísloviny mohou pravděpodobně podléhat fotooxidaci a zvyšovat absorbanci roztoku.

## 4. DISKUSE

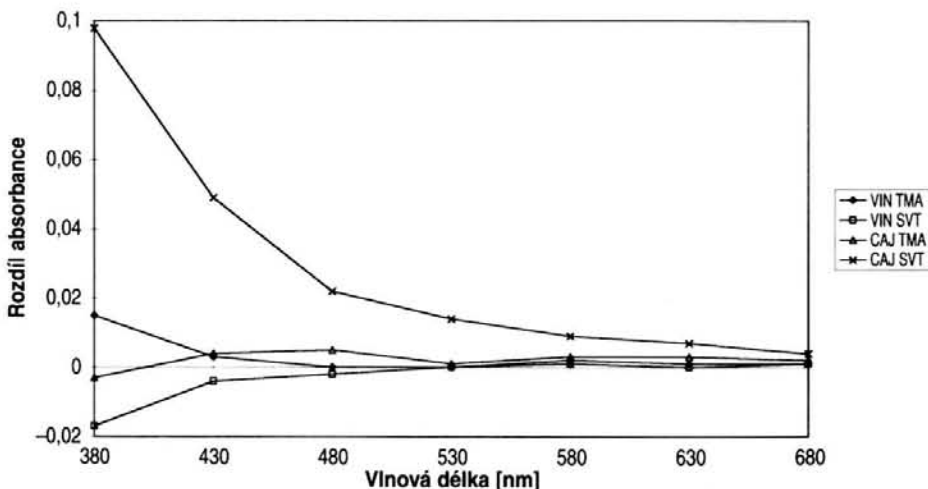
Autoři zabývající se studiem stárnutí piva se obvykle shodují v názoru, že pivo přednostně poškozují aktivní formy kyslíku, zejména hydroxylové radikály  $\text{OH}^\bullet$  [9]. Jejich vznik se obvykle přisuzuje Fentonově reakci za účasti kationtů kovů, především železa a mědi.

V živé přírodě je tvorba hydroxylových radikálů poměrně častá. Současně může vznikat superoxidový radikál ( $\text{O}_2^\bullet$ ), peroxid

vodíku a singletový kyslík [10]. Singletový kyslík vzniká často fotochemickými reakcemi, ačkoliv se může tvořit i chemickými procesy bez účasti světla.

V pivovarské literatuře se popisuje nepříznivý katalytický vliv světla na průběh oxidačních reakcí za změny sensorických vlastností piva při tvorbě tzv. letinkové příchuti. Jako možný mechanismus se uvádí fotodegradace hořkých kyselin za účasti sirných kyselin a fotosenzitizérů, např. riboflavinu. Podle navrženého mechanismu není nutná přítomnost volného kyslíku [7].

Naproti tomu obecné články, zabývající se fotochemickými reakcemi v přírodě, uvádějí dva mechanismy fotochemické oxidace. Fotosenzitizéry v excitovaném stavu



Obr. 7 Diferenční spektrofotometrie vína a zeleného čaje po úpravě vzduchem po 3 h ozařování na světle [SVT] a ve tmě [TMA] při 25 °C



mohou reagovat s kyslíkem za vzniku singletového kyslíku, nebo se substrátem za tvorby volných radikálů organických látek [6].

Výsledky získané v experimentální části práce prokázaly pozitivní vliv světla na průběh reakcí, typických pro stárnutí piva a projevujících se změnou barvy. Zajímavé je, že podobné změny absorbance se získaly při reakci piva s peroxidisíranem. Podle údajů v literatuře může singletový kyslík vznikat při reakci oxidačních činidel s organickými látkami.

Při chemické oxidaci peroxidisíranem amonným i fotochemické oxidaci mezi produktů výroby piva absorbance při nízkých vlnových délkách viditelného spektra u některých vzorků, např. u sladiny, vzrůstala, u jiných, např. melanoidních látek, klesala.

Podle předchozího zjištění souvisí vzestup absorbance pravděpodobně s oxidací polyfenolových látek, zatímco pokles odpovídá oxidaci melanoidinů nebo dosud blíže neidentifikovaných látek chmele.

Při oxidaci mladiny nebo piva se uplatňují obě popsané změny absorbancí. Výsledkem je typická křivka s počátečním poklesem a následným vzestupem absorbance [4].

Fotooxidace piva závisela na obsahu kyslíku a s rostoucí koncentrací rozpuštěného kyslíku byly změny absorbance výraznější. Z dosud získaných výsledků nelze jednoznačně soudit na přítomnost fotosenzitizérů. Objevily se i určité anomálie, neboť např. při ozařování chmelového výluhu absorbance poklesla nejvíce u vzorku s nízkým obsahem rozpuštěného kyslíku (*obr. 6*).

Při oxidaci dalších přírodních substrátů vína a čaje se získal podobný průběh absorbancí jako u piva a meziproduktů jeho výroby. Zelený čaj, který obsahuje velká množství tříslovin, vykazoval výrazný nárůst absorbance po ozaření, zatímco po ozaření vína absorbance při 380 nm opět z počátku poklesla. Víno přitom neobsahuje ani chmelové látky, ani větší množství melanoidinů, které se naopak tvoří např. při vaření mladiny.

V souvislosti s fotooxidací přírodních substrátů se literatura zmiňuje o fotosenzitizérech typu přírodních barviv, např. flavonoidních barviv [5, 6]. Tomuto směru výzkumu a jeho vztahu k pivovarským surovinám se však bude nutně teprve věnovat.

## LITERATURA

[1] ŠAVEL, J.–PROKOPOVÁ, M.–ZDVI-

HALOVÁ, D.: Kvas. prům., **41**, 1995, s. 374.

[2] ŠAVEL, J.–PROKOPOVÁ, M.–ZDVI-HALOVÁ, D.: Kvas. prům., **42**, 1996, s. 11.

[3] ŠAVEL, J.–PROKOPOVÁ, M.–ZDVI-HALOVÁ, D.: Kvas. prům., **42**, 1996, s. 93.

[4] ŠAVEL, J.–PROKOPOVÁ, M.–ZDVI-HALOVÁ, D.: Kvas. prům., **42**, 1996, s. 274.

[5] KOPECKÝ, J.–PANCÍŘ, J.: Organická fotochemie v obrazech. Vyd. 1, Academia, ČSAV, Praha 1987.

[6] MOSINGER, J.–MIČKA, Z.: Chem. Listy, **88**, 1994, s. 212.

[7] TEMPLAR, J.–ARRIGAN, K.–SIM-  
PSON, W. J.: Brewers Digest, **70**, 1995, č. 5, s. 18.

[8] HASHIMOTO, N.–ESHIMA, T.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **35**, 1977, s. 145.

[9] THUM, B.–MIEDANER, H.–NAR-  
ZISS, L.–BACK, W.: Proc. EBC  
Congr., 1995, s. 491.

[10] PROUSEK, J.: Chem. Listy, **89**, 1995, s. 11.

Lektoroval Doc. ing. J. Čepička, CSc.  
Do redakce došlo 6. 10. 1996