

AEROBNÍ A ANAEROBNÍ STÁRNUTÍ PIVA

AEROBIC AND ANAEROBIC BEER AGEING

JAN ŠAVEL, Budějovický Budvar, n.p., Karoliny Světlé 4, 370 21 České Budějovice

Klíčová slova: stárnutí piva, Fentonova reakce, aktivátory, barviva, fenylalanin, kyselina askorbová

Keywords: beer ageing, Fenton reaction, activators, colouring matter, phenylalanine, ascorbic acid

1 ÚVOD

Stárnutí piva je složitý proces, jehož popis uvádějí časopisecké články i knižní monografie [1]. Tento proces zahrnuje nežádoucí změny všech vlastností důležitých pro uživatele, tj. změny barvy, čirosti, pěnivosti, chuti a vůně. Podobně se starší i novější literatura věnuje průzkumu vlivu kyslíku na stárnutí piva. Přítomnost kyslíku v pivu se přitom považuje za hlavní příčinu jeho stárnutí.

Moderní fyzikálně-chemické metody využívají indukce kyslíkových radikálů (OFRs – Oxygen Free Radicals) a jejich detekce elektronovou spinovou (paramagnetickou) rezonanční spektroskopií (ESR, EPR) [2]. Metoda v původní verzi zahrnovala ohřev piva nasyceného vzdušným kyslíkem při 60 °C a záchyt radikálů speciálním činidlem, což ovšem spíše odpovídalo reakcím piva při pasteuraci než jeho stárnutí při skladovací teplotě.

Také všechny pivovarské analýzy, včetně důležitého měření oxidačně-redukčního potenciálu, se uskutečňují v pivu obsahujícím vysoké množství vzduchu vstupujícího do piva při jeho dekarbonizaci, obvykle třepáním [3-5]. Jedinou výjimkou je teplotní šokování piva v původních obalech, obsahujících ovšem různá množství kyslíku z piva i z hrdlového prostoru obalu. Současná technika umožňuje snížit obsah kyslíku v pivu na desítky ppb (1 ppb = 10^{-9} = 0,000 0001 %). Přes pokrok filtrační a lahvárenské technologie však kyslík z piva nelze úplně odstranit a další kyslík do obalu vstupuje ze vzduchu přes jeho uzávěr [6].

V současnosti se za příčinu stárnutí piva považuje enzymová nebo neenzymová oxidace prekurzorů nežádoucích změn vzdušným kyslíkem v konečné, nebo i v předcházejících fázích výroby [1]. Přes tato fakta je zřejmé, že pivo stárne i při téměř dokonalém odstranění kyslíku a že rychlost tvorby nežádoucích změn je stále dosti značná.

Walters et al. považují hranici 0,1 mg.l⁻¹ kyslíku za předěl mezi oběma mechanismy, neboť pod tento obsah v pivu při stárnutí převládá zejména *t*-2-nonenal, zatímco při vyšším obsahu kyslíku přednostně vznikají nenasycené aldehydy s dlouhým řetězcem, např. undekanal [7, 8].

Většina studií pokládá vyšší obsah kyslíku za příčinu dalšího vzrůstu cizích příchutí, ale vyskytují se i výjimky. Vznik tzv. letinkové příchuti radikálovou reakcí za účasti riboflavinu jako senzitizeru přítomnost kyslíku potlačuje [9]. Maillardova reakce nevyžaduje podle reakčního schématu volný kyslík, i když v jejím průběhu vznikají reduktory, které mohou s volným kyslíkem reagovat. Podobně Streckerova reakce může k oxidaci využívat nejen kyslík, ale také jednoduchá organická oxidační činidla, vznikající např. rozpadem sacharidů [10]. Rovněž radioizotopická analýza neprokázala inkorporaci vzdušného kyslíku do frakce těkavých aldehydů, představujících typické produkty stárnutí piva [11].

Mnoho prací vysvětluje stárnutí účasti dalších aktivních forem kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species), mezi něž patří singletový kyslík i peroxid vodíku. Vznik peroxidu vodíku se nejčastěji odvozuje opět od redukce vzdušného kyslíku vhodným donorem elektronů. V této souvislosti si lze připomenout průmyslovou výrobu peroxidu vodíku založenou na oxidaci difenolické látky na chinon (2-ethylanthrochinon), jehož hydrolýzou vzniká peroxid vodíku ve vysokém výtežku [12].

Chapon et al. důsledně oddělují tzv. oxidační mechanismus stárnutí piva, spojený s tvorbou peroxidu vodíku ze vzduchu, a peroxidační mechanismus, zahrnující další reakce peroxidu vodíku, které mohou probíhat za nepřístupu vzduchu [13]. Narozdíl od modelových systémů, obsahujících donor elektronů a vzdušný kyslík vytvářející dostatečné množství peroxidu vodíku, se však v pivu tato látka vyskytuje jen ve stopovém množství, ačkoliv jinak je peroxid vodíku v pivu relativně stálý [13, 14].

Chapon et al. rovněž popsali rozklad přirozených barviv piva, vína i barevného indikátoru methylové červení v anaerobním prostředí za účasti peroxidu vodíku a kyseliny askorbové, tuto reakci však pokládali za typickou radikálovou oxidaci, ačkoliv lze v literatuře nalézt příklady oxidačního i redukčního degradačního mechanismu [13, 15, 16]. V každém případě tato reakce představuje příklad degradačního působení za nepřítomnosti kyslíku.

V předchozí práci jsme zkoumali úči-

nek radikálových reakcí piva na organická barviva, která se liší mechanismem rozkladu. K rozkladu indigokarmínu peroxidem vodíku byla nutná přítomnost vzdušného kyslíku, který naopak inhiboval rozklad methylové červení [17]. Přítomnost sacharidů zvyšovala účinek peroxidu vodíku při aerobní i anaerobní oxidaci [17, 18].

2 MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE

2.1 Chemikálie

Zásobní roztoky: sodná sůl methylové červení (METR, $c = 1000$ mg.l⁻¹), dvojsodná sůl disíranu indiga (indigokarmín – INDC, $c = 1500$ mg.l⁻¹), methylenová modř (MEBL, $c = 1000$ mg.l⁻¹), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0.0268$ g.l⁻¹), dusitan sodný ($c = 1500$ mg.l⁻¹), disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (dihydrát) – EDTA ($c = 100$ mg.l⁻¹) se připravily rozpuštěním složek v deionizované vodě. Roztok kyseliny fosforečné (pro úpravu mladiny na pH ~ 4,5) se připravoval zředěním 3,5 ml koncentrované H_3PO_4 (85 % hm.) deionizovanou vodou (100 ml). Všechny chemikálie pocházely od Sigma Aldrich, kromě indigokarmínu (Merck).

Vodivost deionizované vody byla nižší než 0,2 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH = 6,2.

2.2 Reakce kyseliny askorbové s fenylalaninem za aerobních a anaerobních podmínek

Roztok kyseliny askorbové v deionizované vodě (75 ml, $c = 0,1$ %) s přidáním fenylalaninu ($c = 100$ mg.l⁻¹) a bez něj se rozdělil do 150 Erlenmayerových baněk. V souběžném souboru vzorků se k deionizované vodě přidalo 0,75 ml zásobního roztoku chloridu měďnatého (výsledná koncentrace $\text{Cu}^{2+} = 0,1$ mg.l⁻¹). Polovina roztoků se probublávala dusíkem injekční jehlou, vedoucí mezi hrdlem baňky a pryžovou zátkou a baňka se těsně uzavřela ihned po vytažení jehly. Ostatní část baněk se pokryla hliníkovou fólií.

Všechny baňky se inkubovaly při 45 °C po dobu 5 dní. Vzorky se zředily deionizovanou vodou (1:100) a zaznamenala se absorpční spektra mezi 200 až 320 nm (obr. 1, 2). Absorpční spektra destilátů vzorků po přehánění vodní párou se zaznamenala v rozmezí 200 – 320 nm (obr. 3), neředěné vzorky se měřily mezi 320 až 440 nm (obr. 4).

2.3 Reoxidace methylenové modři redukované kyselinou askorbovou působením světla

Roztok MEBL (50 μ l) se pipetoval do válcovitých kyvet Dr. Lange (průměr 1 cm) obsahujících 4,9 ml deionizované vody nebo piva, popř. obsahující další složky. Hodnota pH mladiny (pH = 5,2) se upravovala přidávkou roztoku kyseliny fosforečné na hodnotu pH piva (4,5). Vzorky se po dobu 15 min probublávaly dusíkem, pak se přidalo 50 μ l roztoku kyseliny askorbové ($c = 0,1\%$ – 10 %) a kyveta se těsně uzavřela pryžovou zátkou. Souběžné vzorky se krátce protřepaly se vzduchem před přidávkou kyseliny askorbové. Kyvety se ozářily halogenovou lampou (50 W) ze vzdálenosti 5 cm po dobu 5–10 s do odbarvení methylenové modři. Ve vhodných časových intervalech se zaznamenávala absorbance při 666 nm proti destilované vodě, mladině, pivu nebo džusu (obr. 5–7).

2.4 Přístroje

Spektrofotometr CADAS 200 (Dr. Lange, Německo) s křemennou pravo-

úhlou kyvetou tloušťky 1 a 5 cm a válcovitou skleněnou kyvetou (průměr 1 cm).

V rychlodestilačním přístroji 1 CUBE se z 50 ml vzorku předdestilovalo vodní párou 50 ml destilátu za 2 min. Absorbance destilátu se měřila v 1 cm křemenné kyvetě v rozmezí 200 až 320 nm.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

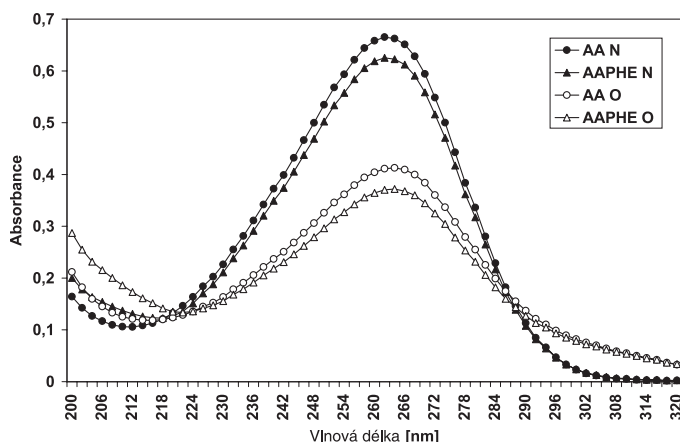
V předchozím sdělení jsme prokázali, že reduktony by mohly hrát významnou roli při stárnutí piva [19]. Mohou totiž poskytovat elektrony pro redukci kyslíku a tím také generovat volné radikály kyslíku a jeho aktivní formy. Větší část rozpuštěného kyslíku se redukuje čtyřmi elektrony/molekulu na neškodnou vodu, malá část zbývá v podobě nežádoucích radikálů.

Tento proces lze snadno znázornit modelovými pokusy s kyselinou askorbovou, zastupující úlohu reduktonů, které jinak vznikají tepelným rozkladem sacharidů v průběhu pivovarské výroby. Dokonce i v silně kyselém prostředí (0,1 % roztok kyseliny askorbové v destilované vodě má pH ~ 2,9) probíhala oxidace fe-

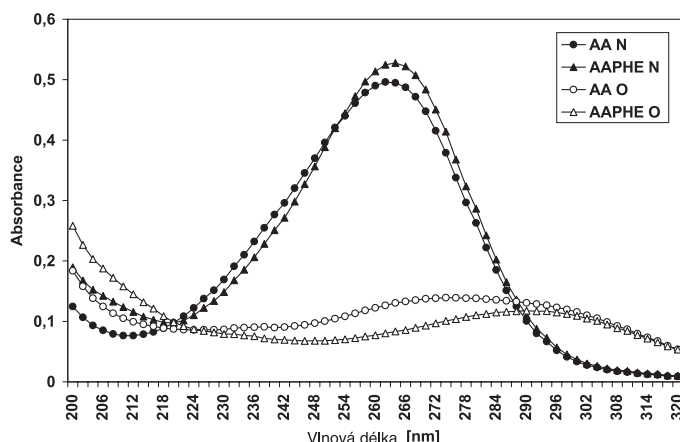
nylalaninu vzdušným kyslíkem dostatečnou rychlostí, jak se lze snadno přesvědčit podle změn absorpčních spekter těkavých látek produktů i podle typické vůně degradačních produktů fenylacetaldehydu a benzaldehydu za podmínky, že byl současně přítomen vhodný aktivátor, představovaný zde např. měďnatými ionty (obr. 3). Absorpční spektra degradačních produktů fenylalaninu i kyseliny askorbové znázorňuje obr. 4.

Obr. 1 a 2 znázorňují degradaci kyseliny askorbové, která vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 263 nm. Bez přítomnosti Cu^{2+} se kyselina askorbová částečně inaktivovala, pravděpodobně za účasti stopových množství nečistot, zatímco současná přítomnost kyslíku i Cu^{2+} způsobila hluboký rozklad této látky i tvorbu barevných produktů (obr. 2 a 4). Tyto změny neprobíhaly za nepřítomnosti kyslíku dokonce i v případě, že v roztoku byly ionty mědi.

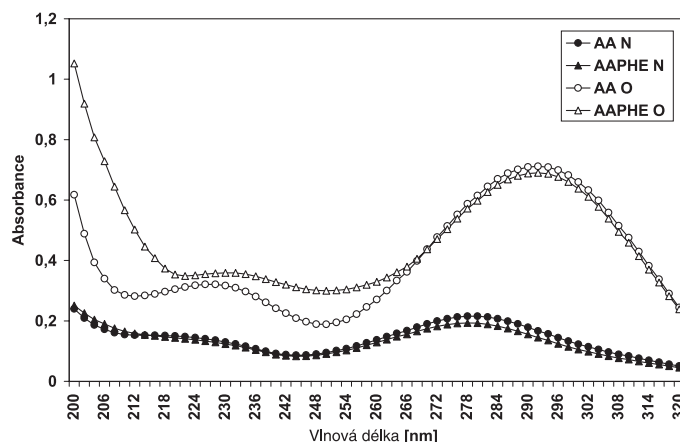
Fenylalanin pouze mírně zvyšoval rychlost reakce, takže hlavním mechanismem degradace byly pravděpodobně radikálové reakce kyseliny askorbové a kyslíku za přítomnosti aktivátoru. Oxi-



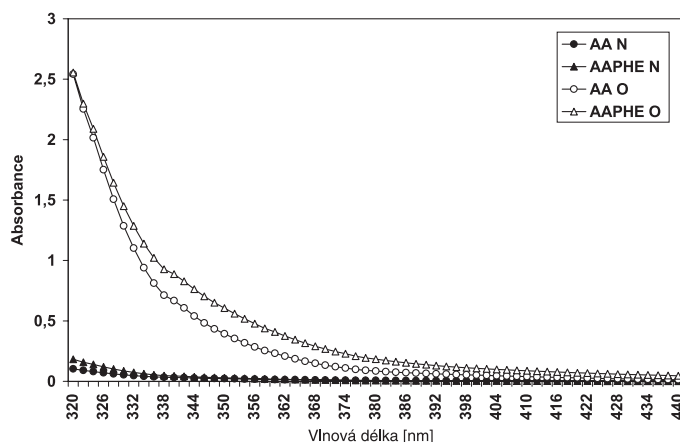
Obr. 1 Absorpční spektra roztoků obsahujících kyselinu askorbovou (AA, 0,1 %) a fenylalanin (PHE, 100 mg.l^{-1}) a nasycených dusíkem (N) nebo vzduchem (O) po 5 dnech zahřívání při 45 °C – zředěno 1:100



Obr. 2 Absorpční spektra roztoků obsahujících kyselinu askorbovou (AA, 0,1 %), fenylalanin (PHE, 100 mg.l^{-1}) a Cu^{2+} (0,1 mg.l^{-1}) a nasycených dusíkem (N) nebo vzduchem (O) po 5 dnech zahřívání při 45 °C – zředěno 1:100



Obr. 3 Absorpční spektra destilátů z roztoků obsahujících kyselinu askorbovou (AA, 0,1 %), fenylalanin (PHE, 100 mg.l^{-1}), Cu^{2+} (0,1 mg.l^{-1}) a nasycených dusíkem (N) nebo vzduchem (O) po 5 dnech zahřívání při 45 °C



Obr. 4 Absorpční spektra roztoků obsahujících kyselinu askorbovou (AA, 0,1 %), fenylalanin (PHE, 100 mg.l^{-1}), Cu^{2+} (0,1 mg.l^{-1}) a nasycených dusíkem (N) nebo vzduchem (O) po 5 dnech zahřívání při 45 °C – neředěno

dace fenylalaninu nemusí proto probíhat přes Maillardovu reakci této aminokyseliny se sacharidy, ale rychleji přes reduktony, které mohou ze sacharidů vznikat.

Potřeba kyslíku pro degradaci fenylalaninu byla dobře patrná, ačkoliv dusík zcela nezabránil reakci (obr. 2). V popsaném modelovém pokusu nebylo možné zamezit pronikání stop kyslíku okolo pryžové zátky, kterou byla reakční baňka uzavřena, nicméně pozitivní vliv kyslíku byl dobře patrný.

Tímto způsobem by se mohl vysvětlit i vznik těkavých aldehydů při stárnutí piva, kdyby ovšem byl vždy k dispozici kyslík v dostatečném množství. Obsah fenylacetaldehydu a zejména benzaldehydu mnohonásobně vzrůstal v pivu s vyšším obsahem vzduchu v hrdle lahve [20]. Je zajímavé, že podobné reakce lze uskutečnit přímo reakcí sacharidů s fenylalaninem za přítomnosti kyslíku a aktivátoru, přičemž také vznikají silně redukující látky [19]. Tento vliv je dobře patrný při vyšším pH, zatímco v kyselých roztocích je tvorba redukujících látek potlačena.

Kyslík může přímo reagovat s kyselinou askorbovou za tvorby peroxidu vodíku. Kyselina askorbová potom podporuje Fentonovu reakci, dostatečnou pro oxidaci prakticky všech biologicky významných látek. Autooxidace kyseliny askorbové poskytuje peroxid vodíku, který se hromadí v počátečních fázích reakce, ale posléze mizí, patrně reakcí s reakčními produkty rozpadu kyseliny askorbové [21]. Podobně může peroxid vodíku vznikat i hydrolyzou předtím oxidovaných polyfenolů [12].

Tento dobře dokumentovaný mechanismus je však obtížné aplikovat beze zbytku na stárnutí piva, neboť hromadění peroxidu vodíku ve větší míře v pivu se neprokázalo, i když jeho rychlost rozkladu v pivu je relativně pomalá [13, 14]. Jedním z možných vysvětlení, které uvedl již Chapon [13], je představa, že při stárnutí piva primárně vznikají organické radikály, které mohou reagovat jak

se složkami piva, tak s kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku. Bohužel všechny naše pokusy pouze prokázaly, že k tvorbě aldehydů z aminokyselin byl vždy nutný kyslík, a to i v případě, že se použil radikálový zdroj v podobě peroxodisíranu draselného, který termickým rozkladem poskytuje silný síranový radikál, schopný napadat většinu sloučenin přítomných v pivu [22].

Kromě těkavých látek vznikaly reakcí kyseliny askorbové s kyslíkem také barevné látky, a to i za nepřítomnosti aminokyselin, což by rovněž vysvětlovalo postupný nárůst barvy piva, ovšem kromě nárůstu barvy způsobeného také oxidací polyfenolových látek (obr. 4). Nicméně existují četné důkazy, že i v pivech s nízkým obsahem rozpuštěného kyslíku obsah aminokyselin klesá, ale tento pokles není příliš výrazný [23].

Zajímavým poznatkem, plynoucím z modelových pokusů, je skutečnost, že měďnaté ionty výrazně zrychlují spotřebu kyslíku a že podobně mohou působit i další látky, např. dusitan sodný [17]. Katalytickou redukcí kyslíku za přítomnosti reduktonů lze současně vysvětlit kontroverzní chování kyseliny askorbové i ostatních reduktonů, působících současně jako prooxidanty i anti-oxidanty při stárnutí piva.

Při nízkém obsahu kyslíku a především jeho aktivátorů kyselina askorbová redukuje již zoxidovanou přirozenou barvu piva, potlačuje tvorbu oxidačních příchutí a blokuje nežádoucí změny piva při jeho stárnutí. Naproti tomu v přítomnosti vyššího množství kyslíku a aktivátoru nelze zabránit nepříznivým změnám ani při relativně vysoké koncentraci kyseliny askorbové.

Vyšší koncentrace kyseliny v přítomnosti aktivátoru se však může projevit zrychlenou redukcí, a tím i spotřebou rozpuštěného kyslíku, jeho vyčerpáním a zastavením tvorby radikálů kyslíku. Dalším ochranným mechanismem je maskování kovových iontů rozkladnými produkty kyseliny askorbové [24].

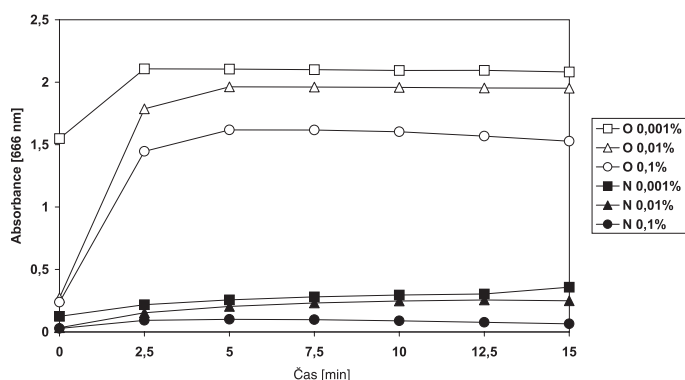
Oxidací kyseliny askorbové mohou

zrychlit i jiné látky. Ke studiu těchto efektů lze použít fotooxidace kyseliny askorbové methylenovou modří. Methylenová modř je v oxidované formě modrá, nelze ji jednoduše odbarvit odstraněním kyslíku z roztoku např. proudem dusíku, je k tomu zapotřebí ještě redukční činidlo. Rychlost redukce kyselinou askorbovou stoupá s rostoucím pH, což se shoduje s odbarvováním methylenové modři reakcí se sacharidy v alkalickém prostředí, jak je dobře známé z populárních pokusů s tzv. modrou lahví [25]. Všechna tato fakta kromě toho naznačují, že mnoho reakcí, dříve přičítaných melanoidinům, lze jednoduše vysvětlit pouze přítomností reduktonů bez účasti dusíkatých složek [19].

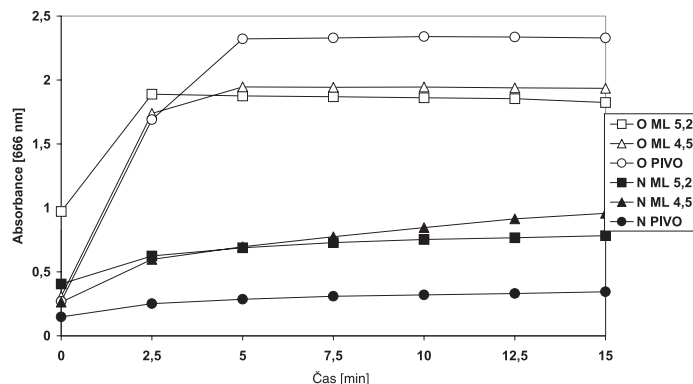
Je také všeobecně známo, že přenos elektronů z kyseliny askorbové na methylenovou modř lze výrazně zrychlit prostým působením světla (tzv. photobleaching) [26]. Pouhé fotony mohou tedy výrazně zvýšit rychlost redukce methylenové modři, přičemž je zajímavá i druhá část tohoto procesu. V přítomnosti aktivátorů redukce kyslíku se generují kyslíkové radikály i peroxid vodíku, způsobující reoxidaci leukoformy methylenové modři a tím i zpětné modření předtím odbarveného roztoku. V přítomnosti kyslíku bez aktivátorů nemůže tento proces probíhat a roztok zůstává odbarvený [24].

Uvedená technika umožnila prokázat, že přírodní materiály obsahují látky urychlující přenos elektronů mezi jejich donory a akceptory. Tyto látky jsme souhrnně označili jako ETIS (Electron Transport Influencing Species). I přes nízký obsah kovových iontů se v pivu vyskytují látky zvyšující výrazně reoxidaci leukoformy methylenové modři. Porovnání reakční rychlosti těchto procesů za přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku jasně prokázalo, že tyto látky mohou katalyzovat přenos elektronů i při velmi nízkém obsahu rozpuštěného kyslíku, což by mohlo vést k pochopení stárnutí piva za jeho nepřítomnosti [24].

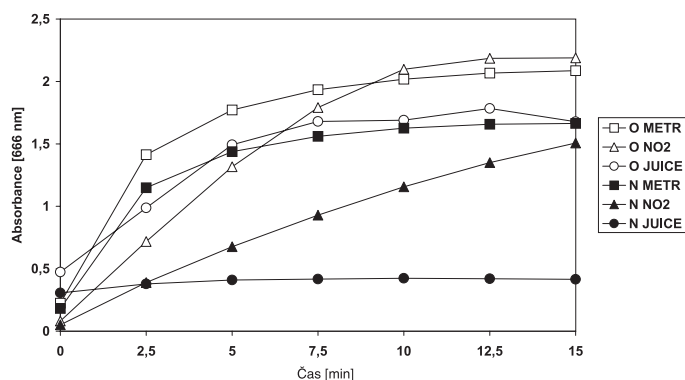
V průběhu těchto reakcí pravděpo-



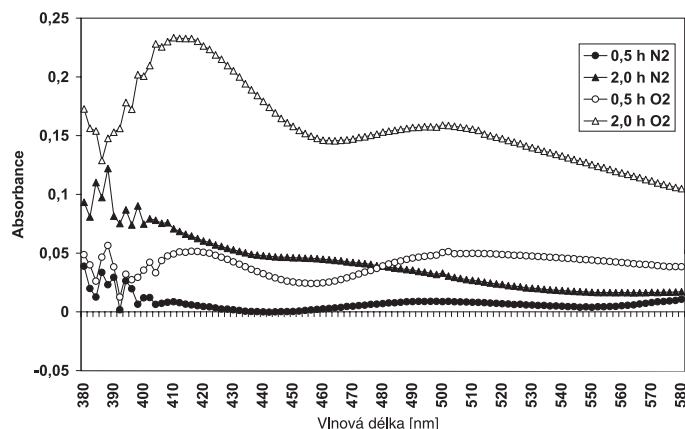
Obr. 5 Reoxidace methylenové modři (10 mg.l^{-1}) odbarvené ozářením v roztoku kyseliny askorbové (0,001 – 0,1 %) v deionizované vodě s přidávkou Cu^{2+} ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) a nasycením dusíkem (N) nebo vzduchem (O)



Obr. 6 Reoxidace methylenové modři (10 mg.l^{-1}) odbarvené ozářením v roztoku kyseliny askorbové (0,01 %) v mladině (pH 5,2 a 4,5) a pivu nasycených dusíkem (N) nebo vzduchem (O)



Obr. 7 Reoxidace methylenové modři (10 mg.l^{-1}), odbarvené ozářením v roztoku kyseliny askorbové ($0,01 \%$) v deionizované vodě s přídávkem dusitanu sodného ($10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$), METR (10 mg.l^{-1}) nebo v jablečném džusu, nasycených dusíkem (N) nebo vzduchem (O)



Obr. 8 Diferenční spektra 12 % piva nasyceného dusíkem (N) a vzduchem (O) a zahříváného při 60°C

dobně vzniká i peroxid vodíku, klíčová složka Fentonovy reakce. Rozkladem sacharidů za účasti Fentonovy reakce nebo radikálového iniciátoru vznikají látky zvyšující účinek těchto reakcí, jak lze soudit podle rychlejšího rozkladu INDC, nebo METR za přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku [17, 18, 24]. Zdá se, že rozkladem sacharidů vznikají agresivní cukerné radikály, vyznačující se delším poločasem rozpadu i částečnou rozpustností v lipidických látkách, takže mohou napadat i nenasycené mastné kyseliny [27].

Uvedené experimenty ukazují, že měření oxidačně-redukčního potenciálu v pivu klasickými způsoby, např. s 2,6-dichlorfenolindofenolem (populární ITT), nemají dostatečnou vypovídací hodnotu, probíhají-li pouze za přítomnosti kyslíku, a mohou sloužit hlavně jako metody stanovení redukčních látek, např. kyseliny askorbové. Je také známo, že přidavek nízkých množství kyseliny askorbové k pivu výrazně snižuje hodnotu ITT, aniž by se přitom dosáhlo odpovídajícího zvýšení odolnosti piva vůči stárnutí.

Při studiu stárnutí piva za nepřítomnosti kyslíku zaujímají patrně ETIS významné místo. V obecném pojetí se kyslík může dobře mezi ETIS zařadit. Studium oxidačně-redukčních procesů, probíhajících v pivu za přítomnosti organických barviv, je další nadějnou technikou pro pochopení oxidace piva za nepřítomnosti nebo za přítomnosti velmi nízkých koncentrací kyslíku.

K výběru vhodných barviv jsme přikročili po studiu jejich tepelné degradace ve směsi se sacharidy, přičemž jsme jako nadějná barviva zaznamenali methylenovou modř, methylovou červeň a indigokarmín. Po podrobné literární rešerši jsme objevili, že dvě z těchto barviv používal při studiu oxidace a redukce již Chapon asi před čtvrt stoletím [13]. Jeho práce přinesly revoluční myšlenky, dodnes podle našeho názoru plně nedocenené, zejména při popisu přirozených sloučenin, které by se daly zařadit

mezi ETIS. Dalším přínosem bylo využití enzymových metod, které umožnily řešit dodnes obtížný úkol stanovení peroxidu vodíku v přítomnosti silných redukovadel.

Použití oxidačně-redukčních indikátorů, známých z analytické chemie, se uplatňovalo zejména při studiu vratných oxidačně-redukčních procesů. Méně je známo, že organičtí chemici, zabývající se chemií barviv, již v minulosti rozlišovali organická barviva podle toho, zda se po předchozí redukci mohou znovu reoxidovat vzdušným kyslíkem, nebo nikoliv [28]. Toto pojetí vede přímo k rozoznání úlohy nevratné degradace organických barviv a účasti vzdušného kyslíku v tomto procesu.

Existuje analogie mezi chováním přírodních barviv, obsažených v pivu, a chováním některých organických barviv. Barviva v pivu tvoří široké spektrum polyfenolických látek a degradačních produktů sacharidů, včetně produktů Maillardových reakcí. Podobně jako organická barviva mohou tyto látky podléhat vratným oxidačně-redukčním reakcím, odbarvovat se redukcí, zbarvovat oxidací a také podléhat nevratné degradaci za ztráty barvy.

Některá barviva vyžadují radikálovou iniciaci, aby dosáhla typického zbarvení (např. ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)). Typické chování představuje degradační oxidace (např. u N,N,N',N' – tetramethyl-p-fenylendiaminu) nebo redukce. U oxidačně-redukčních indikátorů je známé i zbarvení bezbarvých indikátorů v důsledku jejich redukce, např. u tetrazoliových solí. Podobné vzory chování lze vysledovat i u přírodních barviv piva a dalších nápojů.

V současnosti používáme tři barviva s odlišným chováním v oxidačně-redukčních procesech. Indigokarmín (INDC) se může rozkládat pouze v přítomnosti vzdušného kyslíku a jeho rozklad za nepřítomnosti kyslíku se nedaří ani v přítomnosti silného radikálového iniciátoru, jakým je peroxodisíran draselný. Jako mnoho jiných barviv může

existovat i v radikálové formě schopné za přítomnosti kyslíku oxidovat aminokyseliny, a to i za nepřítomnosti iniciátoru [29].

Methylenová modř (MEBL) je univerzální indikátor, schopný opět tvořit radikálovou formu a umožňující vratně oxidovat redukující látky v nápojích. Její leukoforma citlivě reaguje na přítomnost radikálů vznikajících redukcí kyslíku. Přesto pivo, obsahující bezbarvou redukovanou formu methylenové modře indikující nepřítomnost kyslíkových radikálů za nepřístupu vzduchu, velmi rychle stárne i bez dalšího přístupu kyslíku.

Změny barvy methylenové modři dobře reagují na spotřebu kyslíku pivem. Tato rychlost je poměrně vysoká a poločas spotřeby kyslíku při pasteračních teplotách se pohybuje v jednotkách až desítkách minut, při laboratorní teplotě může dosahovat až několika dnů. Kyslík procházející obalem korunky může předcházet do piva v množství až několik miligramů za rok [6].

Methylová červeň (METR) je významný indikátor, rozkládající se v pivu za nepřítomnosti kyslíku. Chapon et al. považovali methylovou červeň za specifický indikátor, reagující na současnou přítomnost kyseliny askorbové a peroxidu vodíku [13]. Při vzájemné reakci obou složek se dokonce rozkládala i přirozená barviva červeného vína, čehož Chapon využíval jako bodu ekvivalence při stanovení oxidu siřičitého v červeném víně. Methylovou červeň potom nahrazoval barviva nepřítomná v bílém víně.

Tento indikátor se může odbarvovat i v pivu za nepřítomnosti kyslíku, což by mohlo ukazovat na tvorbu peroxidu vodíku i za nepřítomnosti kyslíku. Vznik kyslíkových radikálů rozpadem peroxidu vodíku totiž přítomnost kyslíku nevyžaduje, a naopak se kyslík v průběhu této reakce uvolňuje.

Zajímavou skutečností je zjištění, že odbarvování methylové červeně může probíhat za anaerobních podmínek i bez přidavku peroxidu vodíku, o čemž se studie Chapona nezmiňuje. Přídavek katalasy tuto reakci blokuje, což by opět

svědčilo ve prospěch anaerobní tvorby peroxidu vodíku.

Anaerobní mechanismus stárnutí piva však zůstává přes tyto nadějně výsledky dosud neobjasněn. Především není jasné, zda anaerobní mechanismus nevyžaduje byť nepatrná množství kyslíku, která mohou pronikat netěsným obalem. Dále jakýkoliv styk složité matrice přírodních látek ve styku s kyslíkem v předchozích fázích výroby může znamenat vazbu kyslíku např. ve formě peroxidů, které mohou později vytvářet peroxid vodíku. Jak již z předchozí diskuse vyplynulo, Fentonova reakce může probíhat i za nepřítomnosti kyslíku [17, 24].

Dalším možným mechanismem je aktivní působení radikálů přirozených barviv. K měření těchto změn lze použít diferenční spektroskopii, kterou lze snadno prokázat stárnutí i za nepřítomnosti kyslíku [30]. V současnosti jsme touto technikou prokázali, že barviva piva mohou během stárnutí nejen tmavnout, ale také se odbarvovat v závislosti na vlnové délce absorbance (*obr. 8*).

V každém případě představuje použití přírodních i umělých barviv významný nástroj k studiu oxidačně-redukčních procesů, probíhajících v pivu za přítomnosti i nepřítomnosti vzduchu.

Literatura

- [1] Bamforth, C. W.: The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assessment. *Brauwelt Int.* **17**, 1999, s. 98-110.
- [2] Uchida, M., Ono, M.: Improvement for oxidative flavor stability of beer-role of OH radical in beer oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, s. 198-204.
- [3] Moll, M.: Determination of antioxidants in brewing. Part 1. *Monatsschr. Brauwiss.* **54**, 2001, s. 28-30.
- [4] Moll, M.: Determination of antioxidants in brewing. Part 2. *Monatsschr. Brauwiss.* **54**, 2001, s. 64-69.
- [5] Chapon, L., Kretschmer, K.F.: Über die Bedeutung der reduzierenden Kraft bei hellen Bieren. *Monatsschr. Brauwiss.* **54**, 2001, s. 185-198.
- [6] Müller, K., Weisser, H.: Gasdurchlässigkeit von Flaschenverschlüssen. *Brauwelt* **142**, 2002, s. 617-619.
- [7] Walters, M.T., Heasman, A.P., Hughes, P.S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 1: Forced aging. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 1997, s. 83-89.
- [8] Walters, M.T., Heasman, A.P., Hughes, P.S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: Extended storage trials. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 1997, s. 91-98.
- [9] Templar, J., Arrigan, K., Simpson, W.J.: Formation, measurement and significance of lightstruck flavor in beer: a review. *Brew. Dig.* **70**(5), 1995, s. 18-25.
- [10] Velišek, J.: *Chemie potravin 1.* 1.vyd. OSSIS Tábor, 1999, s. 66, 279.
- [11] Noël, S., Metais, N., Bonte, S., Bodart, E., Peladan, F., Dupire, S., Collin, S.: The use of oxygen 18 in appraising the impact of oxidation process during beer storage. *J. Inst. Brew.* **105**, 1999, s. 269-274.
- [12] Greenwood, N.N., Earnshaw, A.: *Chemie prvků. Svazek I.* 1. vyd., překlad z angl., Praha 1993.
- [13] Chapon, L., Chapon, S.: Peroxidatic step in oxidation of beers. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **37**, 1979, s. 96-104.
- [14] Uchida, M., Ono, M.: Determination of hydrogen peroxide in beer and its role in beer oxidation. *J. Am. Soc. Chem.* **57**, 1999, s. 145-150.
- [15] Zhu, M., Huang, X., Shen, H.: Aromatic azo compounds as spectrophotometric kinetic assay substrate for HRP. *Talanta* **53**, 2001, s. 927-935.
- [16] Sagami, I., Sato, Y., Noguchi, T., Miyajima, M., Rozhkova, E., Daff, S., Shizimu, T.: Electron transfer in nitric-oxide synthase. *Coord. Chem. Rev.* **226**(1-2), 2002, s. 179-186.
- [17] Savel, J.: Fenton reaction acceleration using maltose and ascorbic acid. *Monatsschr. Brauwiss.* **56**, 2003, s. 4-8.
- [18] Savel, J.: A new kind of antioxidant test. *Monatsschr. Brauwiss.* **54**, 2001, s. 206-208.
- [19] Savel, J.: Reductones in beer ageing. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **38**, 2001, s. 135-144.
- [20] Miedaner, H., Narziss, L., Eichhorn, P.: Einige Faktoren der Geschmackstabilität – sensorische und analytische Bewertung. *Proc. Eur. Brew. Congr. 1991*, Lisbon, s. 401-408.
- [21] Takahashi, A., Hashimoto, K., Kumazawa, S., Nakayama, T.: Determination of hydrogen peroxide by high-performance liquid chromatography with a cation-exchange resin gel column and electrochemical detector. *Analytical Sciences* **15**(5), 1999, s. 481-483.
- [22] Staško, A., Brezová, V., Liptáková, M., Šavel, J.: Thermally initiated radical reactions of K₂S₂O₈: EPR spin trapping investigations. *Magn. Reson. Chem.* **38**, 2000, s. 957-962.
- [23] Basařová, G., Šavel, J., Janoušek, J., Čížková, H.: Veränderung des Aminosäuregehaltes während der natürlichen Alterung des bieres. *Monatsschr. Brauwiss.* **52**, 1999, s. 112-118.
- [24] Šavel, J.: v tisku
- [25] Šavel, J.: Chcete vidět radikálové reakce? *Kvasny Prum.* **47**, 2001, s. 109.
- [26] Buettner, G.R., Doherty, T.P., Bannister, T.D.: Hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation by methylene blue in the presence of ascorbic acid. *Radiat. Environ. Biophys.* **23**, 1984, s. 235-243.
- [27] Luo, G., Qi, D., Zheng, Y., Mu, Y., Yan, G., Yang, T., Shen, J.: ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Letters* **492**, 2001, s. 29-32.
- [28] Andrlík, K.: *Cvičení v chemické laboratoři.* 1.vyd., Praha 1952, s. 356, 357.
- [29] Susumu, I., Natsuko, O., Sumsu, T., Todashi, S.: Formation of a hydroxyl radical from tan dye by photo-illumination. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 1995, s. 1810-1812.
- [30] Šavel, J., Zdvihalová, D., Prokopová, M.: Změny barvy při chemické a fotochemické oxidaci piva. *Kvasny Prum.* **43**, 1997, s. 67-70.

Lektorovala:

Prof. Ing. Gabriela Basařová
Do redakce došlo: 3. 3. 2003

Šavel, J.: Aerobní a anaerobní stárnutí piva. *Kvasny Prum.* **49**, 2003, č. 5, s. 144-149.

Modelové pokusy oxidace fenylylaninu v roztoku kyseliny askorbové prokázaly, že k účinné oxidaci je zapotřebí kyslík a aktivátor, např. Cu²⁺. Tento mechanismus může vysvětlit tvorbu těkavých aldehydů z aminokyselin při stárnutí piva za přístupu vzduchu. Při nedostatku kyslíku se aldehydy tvoří jen v malé míře. Účast kyslíku za přítomnosti aktivátorů při stárnutí piva potvrdila i reoxidace leukoformy methylenové modři, připravené redukcí methylenové modři kyselinou askorbovou po ozáření viditelným světlem. Na stejném principu se prokázala přítomnost různých aktivátorů reoxidace v pivu, mladíně, jablečné šťávě i aktivní účast dusitanu sodného nebo methylové červení při vzdušné reoxidaci leukoformy methylenové modři. Vzdušný kyslík naopak inhiboval degradaci methylové červeně v roztoku kyseliny askorbové, což je příklad degradace barviva za anaerobních podmínek. Uvádějí se příklady kladného i negativního působení reduktorů při výrobě piva i významná úloha barviv piva při jeho stárnutí.

Šavel, J.: Aerobic and Anaerobic Beer Ageing. *Kvasny Prum.* **49**, 2003, No. 5, p. 144-149.

Model experiments of phenylalanine oxidation in the solution of ascorbic acid proved that the oxygen and activator (Cu²⁺) are necessary for effective oxidation. This mechanism can explain the formation of volatile aldehydes from amino acids during the aerobic ageing of beer. When there is a lack of oxygen the aldehydes form only in small amounts. Participation of oxygen in presence of activators during the aging of beer has been confirmed also by the reoxidation of methylene blue leucoform, prepared by methylene blue reduction with ascorbic acid after exposing to visible light. Based on the same principle there has been proved the presence of different activators of reoxidation in beer, hopped wort, apple juice plus active presence of nitrite sodium or methylene red during the aerobic reoxidation of methyl blue leucoform. On the contrary atmospheric oxygen inhibited methyl red degradation in the solution of ascorbic acid, which is an example of colouring agents degradation under the anaerobic conditions. The examples of positive and negative action of reducing agents during the production of beer and significant role of beer colouring agents during its ageing is being stated here.

Šavel, J.: Aerobe und anaerobe Alterung des Bieres. *Kvasny Prum.* **49**, 2003, Nr. 5, S. 114-119.

Modellversuche der Oxidation Phenylalanins in der Lösung der Ascorbinsäure zeigten, dass zu einer wirksamen Oxidation Sauerstoff und ein Aktivator, z. B. Cu²⁺ notwendig ist. Dieser Mechanismus kann die Bildung flüchtiger Aldehyde aus Aminosäuren bei der Alterung des Bieres bei Luftzutritt erklären. Bei Sauerstoff-Mangel entstehen die Aldehyde nur in einem kleinen Ausmass. Die Beteiligung des Sauerstoffs bei Aktivatoranwesenheit wurde auch durch die Reoxidation der Methylenblau-Leukoform bestätigt, die durch Reduktion von Methylenblau mittels Ascorbinsäure nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht aufbereitet wurde. Auf gleichem Prinzip wurde auch die Anwesenheit verschiedener Aktivatoren der Reoxidation im Bier, in der Würze und im Apfelsaft sowie

auch die aktive Beteiligung des Natriumnitrits oder des Methylrots bei Luft-Reoxidation der Methylenblauleukoform bestätigt. Der Luftsauerstoff wirkte im Gegenteil inhibierend auf die Degradation von Methylrot in der Ascorbinsäurelösung, was ein Beispiel der Färbungsmitteldegradation bei anaeroben Bedingungen darstellt. Es werden Beispiele positiver und negativer Wirkung der Reduktone bei der Bierherstellung sowie auch die wichtige Rolle der Farbstoffe bei seiner Alterung angeführt.

Шавел, Й.: Аэробное и анаэробное старение пива. Kvasny Prum. 49, 2003, No. 5, стр. 114–119.

Модельные эксперименты окисления фенилаланина в растворе аскорбиновой кислоты доказали, что для эффективного окисления нужны оксид и активатор, напр. Cu^{2+} . Настоящий механизм позволяет объяснить летучих альдегидов из аминокислот при старении пива с доступом воздуха. При недостатке оксида альдегиды образуются только в незначительной степени. Действование оксида при наличии активаторов при старении пива было подтверждено реоксидированием лейкоформы метиленового синего, подготовленного редукцией метиленового синего аскорбиновой кислотой после облучения видимым светом. Одинаковым принципом было доказано наличие разных активаторов реоксидирования в пиве, сусле, яблочном соке и активное участие нитрита натрия или метиленового красного при реоксидировании на воздухе лейкоформы метиленового синего. Кислород воздуха наоборот ингибировал деградацию метилового красного в растворе аскорбиновой кислоты, что представляет пример деградирования красителя при анаэробных условиях. Приводятся примеры положительного и отрицательного влияния редуктонов при производстве пива и значительная роль красителей пива при его старении.



60. zasedání MEBAK v Geisenheimu

21. až 22. října 2002 se uskutečnilo v Geisenheimu v Německu 60. zasedání komise MEBAK. Jednání se zúčastnilo 16 delegátů, 9 bylo omluveno.

Bez dalších připomínek byl schválen protokol z 59. zasedání MEBAK, konaného v Neu-Anif u Salzburgu.

Internetovou stránku MEBAK najdou zájemci na adrese www.vlb-berlin.org. V současné době pokračují úpravy stránky, aby v budoucnu umožnila například přímé objednávání separátů týkajících se jednotlivých analytických postupů pouze za mírný poplatek. S tím, že se v budoucnu počítá s využitím této stránky například pro nákup vybraných informací, souvisí i skutečnost, že svazek č. II MEBAK bude zřejmě vydán jako poslední tištěný tištěk. Předpokládá se, že všechny následující svazky MEBAK budou dostupné pouze v CD-ROM verzi a budou zpřístupněny pro zájemce i na výše uvedené internetové adrese.

Vzhledem k tomu, že bylo vydáno úplné znění V. svazku MEBAK, byla na návrh předsedy komise GUP Dr. Schura její činnost ukončena.

Přítomní věnovali zvýšenou pozornost zlepšení akceschopnosti komise MEBAK. V budoucnu se proto počítá například s možností, že se členy MEBAK stanou i zástupci privátních zkušebních laboratoří. Na návrh profesora Miedanera byli jednomyslně jmenováni Prof. Jäger a Dr. Schur zaslužitými členy MEBAK. Stálým členem MEBAK se stala Dr. Jülich z firmy Döhler Euro Citrus.

Dr. Schur informoval přítomné, že probíhá překlad V. svazku MEBAK do španělštiny pro potřeby jihoamerické pivovarské skupiny Alafaca.

Dr. Anger podal zevrubnou zprávu o výsledcích testování LG-Foamtesteru, provedeného v rámci projektu AIF. Studovány byly zejména parametry teplota, tlak, vlhkost a proudění vzduchu. Výsledky dosažené u běžných typů piv jsou velmi slibné, určité problémy nastaly pouze u piv se zvýšeným obsahem zbytkového extraktu a u piv pšeničných, kde bude s ohledem na vyšší objem pěny potřebné upravit měřicí válec přístroje, případně změnit podmínky a geometrii rozpěňovacího nástavce. Připomínky byly předány výrobcí a v současné době pokračují práce na úpravách LG-Foamtesteru.

Dr. Anger seznámil přítomné s výsledky kruhového testu měření friability, který proběhl v minulém roce. Testu se zúčastnilo šest světových renomovaných pracovišť, mezi nimi i VÚPS, a.s. Hodnoty naměřené na EBC sladu č. 15 byly následující: nebyly zjištěny žádné odlehle výsledky. V případě friability činila průměrná hodnota 82,6 %, opakovatelnost r_{95} 1,60 % a reprodukovatelnost R_{95} 1,91 %. U částečně rozluštěných zrn byly naměřeny hodnoty 2,3 %, 1,08 % resp. 1,46 %. U zrn sklovitých činil průměr 0,41 %, r_{95} 0,32 % a R_{95} 5,44 %.

Budoucí činnost členů MEBAK bude zaměřena na přípravu nového, upraveného vydání I. svazku MEBAK.

V rámci zasedání komise MEBAK proběhla v prostorách Vyšší odborné školy vinařské a zahradnické vzorová degustace piv dle upraveného degustačního schématu. Při senzorickém hodnocení vín je na této škole používána tzv. Kvantitativní a deskriptivní analýza vín. Metoda spočívá v tom, že je senzorický vjem popisován degustátory na základě přirovnání chutí a vůní posuzovaného vzorku k běžně známým přirozeným deskriptorům (melasa, seno, banán, sušené houby, muškát, skořice apod.). Studenti navrhli pro pivo 24 deskriptorů, jejich výběr pro degustaci byl následně snížen na 15. Za standardy zde místo umělých aromat slouží čerstvě připravené vodné výluhy příslušných matric. Problémem zůstává těžko dosažitelná kvalitativní a kvantitativní reprodukovatelnost při přípravě výše zmíněných přírodních standardů. Výhodou je dosažení „přirozeného“ aroma standardu. Zda je tento přístup vhodný i pro degustaci piva, zůstává diskutabilní, nicméně lze tento přístup, nezátížený „pivovarským konzervativismem“, považovat přinejmenším za zajímavý a podnětný.

61. zasedání komise MEBAK proběhlo ve dnech 23. až 25. 4. 2003 v Pfäffikonu ve Švýcarsku.

Ing. Jiří Čulík, CSc.

Technologie

- Chlazení mladiny
- Provzdušňování mladiny
- Zakvašování
- Propagace kvasnic
- Úschova kvasnic
- Kvasnicová síta
- Kyselé praní



REGOM INSTRUMENTS s.r.o.

Váš spolehlivý partner



BRABCOVA 2 / 1159, 147 00 PRAHA 4

**Tel.: 241 402 206
Fax: 241 400 290**

**www.regom.cz
regom@regom.cz**