

# PROOXIDAČNÍ A ANTIOXIDAČNÍ ÚLOHA REDUKTONŮ A POLYFENOLŮ V PIVU

## PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT ROLE OF REDUCTONES AND POLYPHENOLS IN BEER

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

**Klíčová slova:** stárnutí piva, reduktory, polyfenoly, methylenová modř, diferenční spektroskopie

**Keywords:** beer ageing, reductones, polyphenols, methylene blue, differential spectroscopy

**Šavel, J.: Prooxidační a antioxidační úloha reduktónů a polyfenolů v pivu.** Kvasny Prum. 50, 2004, č. 10, s. 291–297.

Stočené pivo bez přítomnosti kyslíku tvoří vyvážený oxidačně-redukční systém, v němž probíhá relativně pomalá výměna elektronů mezi donory a akceptory elektronů. Mezi oxidačními činidly zaujímá významné místo kyslík, vystupující po aktivaci jako soubor silných oxidačních činidel se silnými degradačními účinky (reactive oxygen species, ROS a oxygen free radicals, OFRs). Výsledkem oxidace jsou nevratné oxidační změny, charakterizované uživatelem jako stárnutí. Rozpadem organických látek mohou vznikat sloučeniny, podporující i inhibující další oxidaci. Při výrobě piva může oxidace vzdušným kyslíkem poskytovat další oxidační činidla, např. semichinony, chinony a peroxidy, které mohou působit i při stárnutí za nepřítomnosti vzduchu. Reaktivní oxidační činidla, vznikající redukcí kyslíku reduktómem, mohou s tímto reduktómem reagovat, čímž je zaručena zpětná vazba mezi oxidačními činidly a jejich generátorem. Tato zpětná vazba je příčinou současných schopností redukcí látek vystupovat jako prooxidyanty a antioxidyanty. Tímto způsobem se chovají typické antioxidyanty jako kyseliny gallová, askorbová a tanin. Uvádějí se příklady rozdílové i podílové diferenční spektroskopie při stárnutí piva.

**Šavel, J.: Prooxidant and antioxidant role of reductones and polyphenols in beer.** Kvasny Prum. 50, 2004, No. 10, p. 291–297.

The beer bottled or racked without oxygen presence represents an oxidation-reduction system, in which a relatively slow exchange of electrons among donors and acceptors of electrons takes place. Oxygen is an important oxidizing agent, acting after activation as a complex of strong oxidizing agents with strong degradation effects (reactive oxygen species, ROS a oxygen free radicals, OFRs). The results of oxidation are irreversible oxidation changes, characterized by the user as aging. Based on the decomposition of organic compounds, such compounds can be formed that support as well as inhibit further oxidation. During beer production, the oxidation caused by atmospheric oxygen can provide further oxidizing agents, such as semiquinones, quinones and peroxides that can be active also during aging without air presence. Reactive oxidizing agents formed by the reduction of oxygen by a reductone, can react with this reductone, by which the feedback among oxidizing agents and their producer is ensured. This feedback is the cause of the capability of the reducing substances to act as prooxidants as well as antioxidants. This way of behaviour show typical antioxidants, such as gallic acid, ascorbic acid and tannin. Examples of differential spectroscopy and ratio-differential spectroscopy during beer aging are mentioned.

**Šavel, J.: Föroxydation und Antioxydationsaufgabe von Reduktions und Polyphenols im Bier.** Kvasny Prum. 50, 2004, Nr. 10, S. 291–297.

Das abgefüllte Bier bildet ein ausgewogenes Oxydation-Reduktionssystem, in dem ein relative langsamer Elektronsaustausch zwischen Elektronendonoren und -akzeptoren verfolgt. Unter den Oxidations-

mitteln stellt Sauerstoff eine bedeutende Position dar, der nach der Aktivierung als ein Komplex von starken Oxidationsmitteln mit den intensiven Degradationswirkungen austritt (reactive oxygen species, ROS a oxygen free radicals, OFRs). Die Ergebnisse einer Oxydation sind irreversible Oxydationsänderungen, die durch den Anwender als eine Älterung charakterisiert werden können. Durch einen Zerfall von organischen Stoffen können die Bildungen entstehen, die einen positiven als auch negativen Einfluss auf die Oxydation auswirken können. Bei der Bierherstellung kann eine Oxydation durch den Luft-sauerstoff auch eine andere Oxydationsmittel herausgeben, z.B. Semichinons, Chinons und Peroxyden, die eine Älterung auch ohne Luft-anwesenheit verursachen können. Die reaktive Oxydationsmittel, bildende durch eine Sauerstoffreduktion mittels eines Reduktions, können mit diesem Reduktor weiter reagieren, dadurch eine Rückkoppelung unter Oxydationsmittel und ihrem Generator gesichert wird. Diese Rückkoppelung ist auch eine Ursache, dass diese Reduktionsstoffe durch ihre Tauglichkeit als eine Föroxydante und Antioxydante sich markieren können. Auf diese Weise benehmen sich typische Antioxydantsstoffe, wie z.B. Gallsäure, Askorbinsäure und Tanin. Weitere Beispiele des Unterschiedsdifferentsspektroskopie und Anteilsdifferentsspektroskopie bei einer Bierälterung werden im diesen Artikel beigefügt.

**Шавел, Й.: Окислительная и антиокислительная роль реду-ктов и полифенолов в пиве.** Kvasny Prum. 50, 2004, No. 10, стр. 291–297.

Разливное пиво без присутствия кислорода представляет сбалансированную окислительно-восстановительную систему, в которой проходит относительно медленный обмен электронов между донорами и акцепторами электронов. Среди окислительных реагентов имеет важное значение кислород, представляющий после активации состав сильных окислительных реагентов, имеющих сильные разлагающее влияние (reactive oxygen species – ROS и oxygenfree radicals – OFRs).

В результате окисления проходят необратимые окислительные изменения, воспринимаемые пользователем как старение. Распадом органических веществ могут возникать соединения, поддерживающие и ингибирующие последующие окисление. При производстве пива могут окислением кислородом воздуха возникать следующие окислительные реагенты, как напр. семихиноны, хиноны и перекиси, которые могут иметь влияние при старении пива даже при отсутствии воздуха. Реактивные окислительные реагенты, возникающие редукцией кислорода редуктоном, могут реагировать с этим редуктоном, чем гарантируется обратная связь между окислительными реагентами и их генератором. Эта обратная связь является причиной способности восстановительных веществ играть роль окислителей и антиоксидантов. Это поведение типично для антиоксидантов, как галловая кислота, аскорбиновая и танин. Приводятся примеры разностной и фракционной спектроскопии при старении пива.

### 1 ÚVOD

Stárnutí piva se vysvětluje na základě různých mechanismů, což se zpravidla uvádí v souhrnných článcích [1]. Dvě hlavní teorie předpokládají tvorbu těkavých aldehydů z alkoholů za účasti melanoidních látek pocházejících ze sacharidů, nebo vznik aldehydů katalytickou oxidací na účasti polyfenolů a kyslíku [2, 3]. Rozhodující úlohu sacharidů při tvorbě aldehydů prokázala další sdělení, přesný výklad mechanismu však dosud chybí [4]. Podle našeho názoru jsou významnou

součástí glykosylačních reakcí reduktory, které primárně vznikají z cukrů [5].

V minulém sdělení jsme uveřejnili souhrn poznatků o aerobním i anaerobním stárnutí piva [6]. Ve shodě s literárními údaji měl rozhodující úlohu při stárnutí kyslík, nelze však zanedbat ani reakce probíhající bez přístupu kyslíku. Na modelových pokusech se prokázal protikladný účinek typického antioxidyantu kyseliny askorbové, která se může za přístupu kyslíku chovat také jako prooxidační.

Jednotlivé polyfenolické látky piva se

obecně považují za antioxidyanty s vysokým antiradikálovým potenciálem [7]. Naproti tomu měření elektronovou spinovou rezonanční spektroskopií (ESR) prokázalo, že jedinou sloučeninou piva s antioxidačním účinkem je oxid siřičitý, zatímco polyfenolové látky nemají žádný vliv na výskyt radikálů, a askorbát, cystein i cysteinamin mají naopak prooxidační účinek [8].

Oxidačních reakcí se mohou zúčastnit i oxidované polyfenoly, které jako chinony mohou podporovat přirozenou oxidaci piva [9]. Pro

stárnutí piva jsou typické změny barvy, což lze exaktně sledovat diferenční spektrofotometrií [10].

Pochopení významu vzdušného kyslíku pro stárnutí piva vedlo k snaze zabránit vlivu i nejmenších stop kyslíku, vstupujícího do obalů přes jejich uzávěr [11]. Přes tyto nové poznatky o stárnutí piva zůstává hlavní mechanismus stárnutí nejasný. Není ani jasné, zda těkavé aldehydy typické pro stárnutí piva pocházejí z aminokyselin nebo alkoholů, ačkoli v nedávné době se objevily dvě významné práce o tzv. Streckerových aldehydech v pivu, předpokládající jejich vznik z aminokyselin [12, 13]. Konečnou odpověď mohou dát pouze studie s radioaktivně značenými prekursorů těkavých aldehydů.

## 2 MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE

### 2.1 Chemikálie

Zásobní roztoky: methylenová modř (MEBL,  $c=1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ), sodná sůl methylové červeně (METR,  $c=1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $c=0,0268 \text{ g.l}^{-1}$ , což odpovídá  $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ),  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $c=0,356 \text{ g.l}^{-1}$ , což odpovídá  $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ ), kyselina askorbová ( $c=1$  a  $10 \%$ ), kyselina gallová ( $c=1 \%$ ), tanin (kyselina taninová,  $c=1 \%$ ), dichroman draselný ( $c=0,1 \%$ ), peroxid vodíku ( $c=0,1 \%$ ). Roztoky se připravily rozpouštěním složek v deionizované vodě. Všechny chemikálie pocházely od Sigma Aldrich.

### 2.2 Neprovzdušněné a provzdušněné pivo

Do 150 ml Erlenmeyerovy baňky se po stěně v proudu dusíku naliło 100 ml zchlazeného piva ( $5^\circ\text{C}$ ), mezi hrdlo baňky a pryžovou zátku se vsunula jehla a bubláním jemným proudem dusíku po 30 min se z piva odstranil oxid uhličitý a kyslík. Probublávání dusíkem snížilo obsah rozpuštěného kyslíku na koncentraci pod  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ . V souběžném vzorku se pivo probublávalo vzdušným kyslíkem.

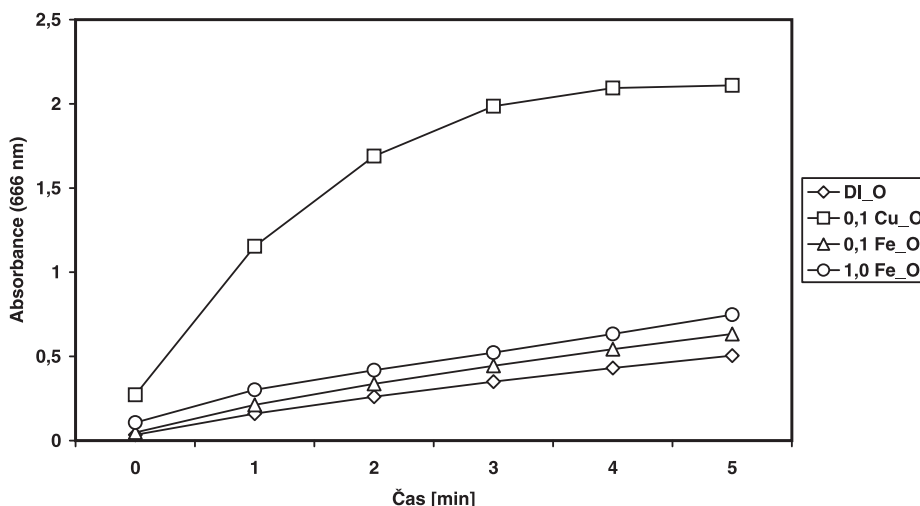
### 2.3 Vliv kovových iontů na oxidaci methylenové modři redukované kyselinou askorbovou

Roztoky kovových solí, připravené ředěním zásobních roztoků v neprovzdušněné a provzdušněné deionizované vodě nebo pivu se pipetovaly v množství  $4,9 \text{ ml}$  do válcovitých kyvet Dr. Lange (průměr= $1 \text{ cm}$ ) předplněných dusíkem nebo vzduchem jehlou, umístěnou mezi hrdlem nádoby a pryžovou zátkou. Do nádoby se přidalo  $50 \mu\text{l}$  roztoku kyseliny askorbové ( $c=1 \%$ ) a  $50 \mu\text{l}$  roztoku methylenové modři ( $c=1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ), po další minutě bublání se jehla vytáhla a pryžová zátkla vtačila do hrdla nádoby.

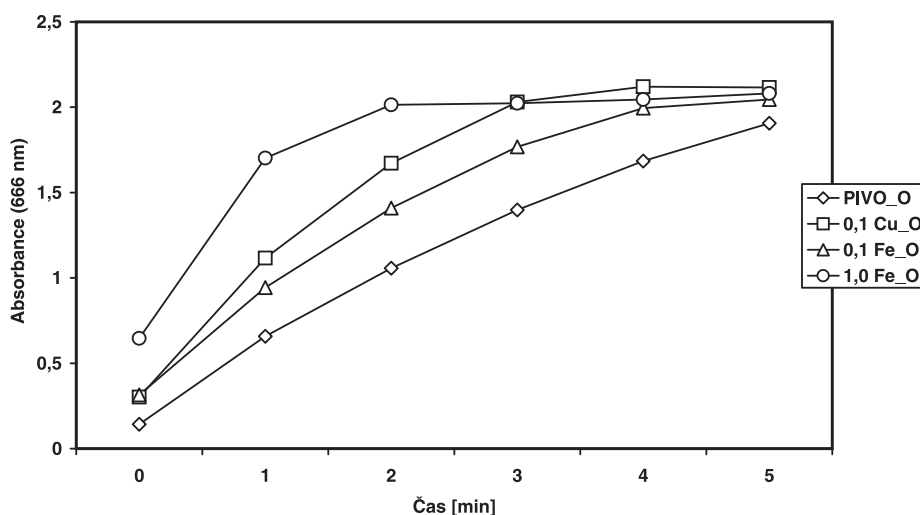
Kyvety se ozářily halogenovou lampou ( $50 \text{ W}$ ) ze vzdálenosti  $5 \text{ cm}$  po dobu  $5\text{--}10 \text{ s}$  do odbarvení methylenové modři. V  $1 \text{ min}$  časových intervalech se zaznamenávala absorbance při  $666 \text{ nm}$  proti destilované vodě (obr. 1–3).

### 2.4 Vliv kyseliny gallové, taninu a dichromanu draselného na oxidaci methylenové modři redukované kyselinou askorbovou

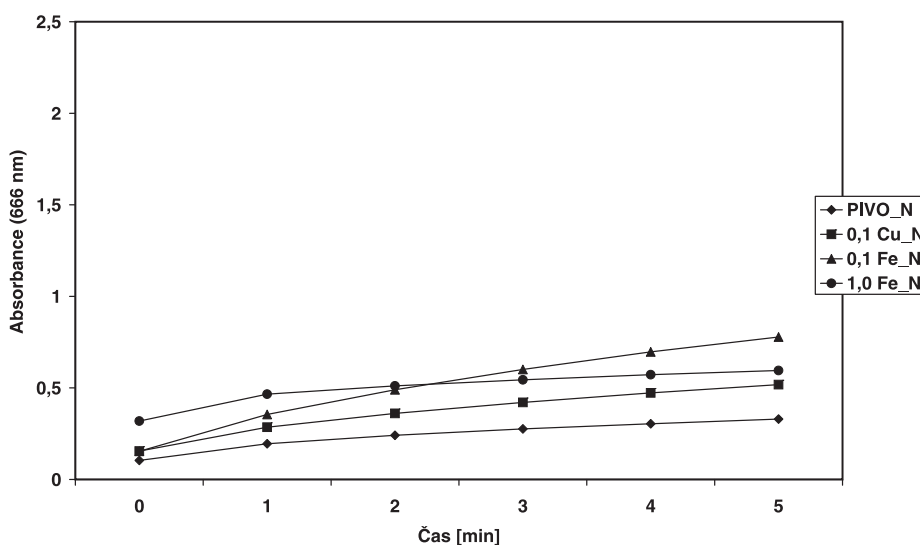
K roztokům kyseliny gallové, taninu nebo dichromanu draselného, připraveným ředěním zásobních roztoků v neprovzdušněné a provzdušněné deionizované vodě ( $4,9 \text{ ml}$ ) ve válcovitých kyvetách, se přidalo  $50 \mu\text{l}$  roztoku kyseliny askorbové ( $c=1 \%$ ) a  $50 \mu\text{l}$  roz-



Obr. 1 Oxidace methylenové modři ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), redukované kyselinou askorbovou ( $0,01 \%$ ), v přítomnosti kationtů kovů ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  $0,1$  a  $1,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ ) v deionizované (DI) vodě za aerobních podmínek (O)



Obr. 2 Oxidace methylenové modři ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), redukované kyselinou askorbovou ( $0,01 \%$ ), v přítomnosti kationtů kovů ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  $0,1$  a  $1,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ ) v pivu (PIVO) za aerobních podmínek (O)



Obr. 3 Oxidace methylenové modři ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), redukované kyselinou askorbovou ( $0,01 \%$ ), v přítomnosti kationtů kovů ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  $0,1$  a  $1,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ ) v pivu (PIVO) za anaerobních podmínek (N)

toku methylenové modři ( $c=1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ), po další minutě bublání dusíku nebo vzduchu se jehla vytáhla a pryžová zátkla vtačila do hrdla nádoby.

Kyvety se ozářily halogenovou lampou ( $50 \text{ W}$ ) ze vzdálenosti  $5 \text{ cm}$  po dobu  $5\text{--}10 \text{ s}$  do odbarvení methylenové modři. V minutových intervalech se zaznamenávala





## Požitek díky technologii.

- Zařízení pro varny
- Filtrační zařízení
- Zařízení pro spilku a ležácký sklep
- Plnicí technika
- Etiketovací technika
- Balicí a paletizační zařízení

Vynikající kvalita Vašeho piva je základem Vašeho úspěchu. K tomu přispíváme uplatněním inovačních metod a nejmodernějším zařízením: technickými novinkami v oblasti

vaření piva, plnění, etiketování a balení lahví. Jsme průkopníky nových technologií – a zároveň průvodci Vašeho piva. – Necht' nachází stále více příznivců v tuzemsku i v cizině.

**STEINECKER GMBH**  
Tel. +49 (0) 81 61/9 53-0, Fax 9 53-150  
E-mail: sales@steinecker.com, www.steinecker.com

**KRONES S.R.O., PRAHA**  
Tel. +420 257 315 663, Fax 257 315 662  
E-mail: krones@krones.cz, www.krones.com



**BRAU Bevale 2004**  
Nürnberg, 10.-12. Nov.  
Hala č. 7

 **KRONES GROUP**

absorbance při 666 nm proti destilované vodě (obr. 4–6).

## 2.5 Vliv látek piva a peroxidu vodíku na redukci methylové červení kyselinou askorbovou

K neprovzdušněné a provzdušněné deionizované vodě nebo pivo (4,85 ml) se přidalo 50  $\mu$ l roztoku kyseliny askorbové ( $c=1$  a 10 %), 50  $\mu$ l roztoku methylové červení ( $c=1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a 50  $\mu$ l peroxidu vodíku ( $c=0,1$  %) nebo deionizované vody. V 0,5 h intervalech se zaznamenávala absorbance při 520 nm. (obr. 7–8).

## 2.6 Diferenční spektroskopie piva při pasteraci

Pivo probublávané dusíkem nebo kyslíkem se zahřívalo v Erlenmeyerových baňkách při 60 °C po dobu 2,5 h a 5 h. Po ochlazení na 20 °C se zaznamenala absorpční spektra jednotlivých vzorků v 5 cm pravouhlé kyvetě proti destilované vodě. Záznam v číslcovém tvaru obsahoval dvojice hodnot (vlnová délka, absorbance) v intervalech po 2 nm od 380 do 580 nm. Jako srovnávací spektrum se použila absorpční křivka piva po probublávání dusíkem před ohřevem. Diferenční spektra se získala jako rozdíl (rozdílové diferenční spektrum, RDS) nebo podíl (podílové diferenční spektrum, PDS) příslušných hodnot spektra vzorku a srovnávacího vzorku a jejich vynešením do grafů (obr. 9 a 10).

## 2.7 Přístroje

Spektrofotometr CADAS 200 (Dr. Lange, SRN) s pravouhlou skleněnou kyvetou (5 cm) a válcovitou skleněnou kyvetou s průměrem 1 cm.

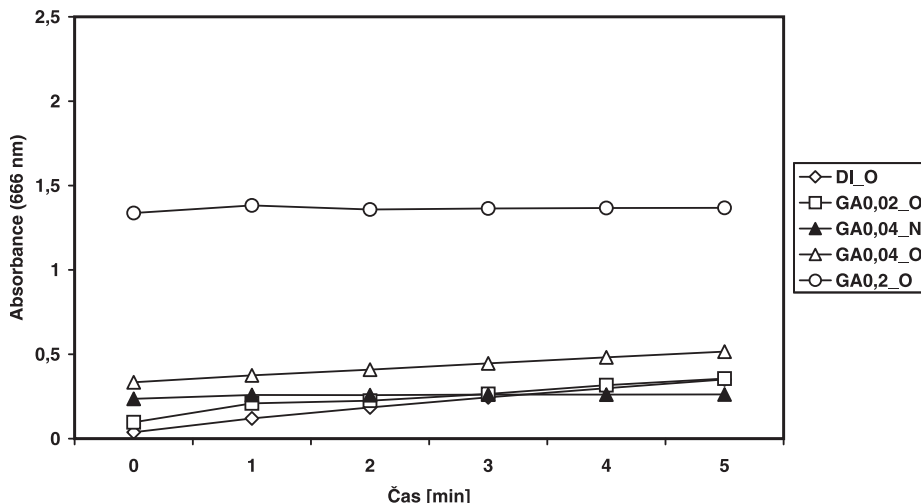
## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

K testování tvorby kyslíkových radikálů a reaktivních forem kyslíku se použila jejich reakce s redukovanou methylenovou modří [6, 9, 10]. Využívá se přitom tvorby leukoformy methylenové modři ozáření jejího roztoku s redukčním činidlem, v tomto případě kyselinou askorbovou. Tvorba reaktivních forem redukci vzdušného kyslíku je přitom pomalejší než vlastní odbarvení, takže vznik aktivních forem se prozradí postupným modráním roztoku, což lze spektroskopicky zaznamenat jako časovou křivku absorbance při 666 nm.

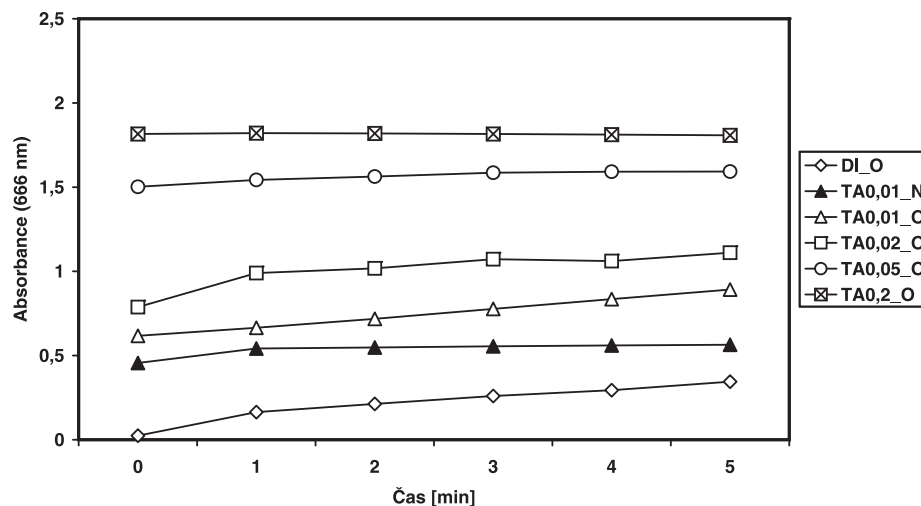
Účast světla lze vyloučit přípravou leukoformy methylenové modři za tmy a jejím přidáním k testovanému roztoku. Nepříjemnou skutečností zůstává, že i slabý, krátký impuls světla s vlnovou délkou 266 nm při vlastním měření absorbance ovlivňuje slabě výsledek měření, neboť podporuje reoxidaci leukoformy methylenové modři, ačkoliv ozáření silným bílým světlem působí právě opačně [9].

Přes tuto částečnou nevýhodu metoda poskytuje vhodný nástroj k řešení problémů s oxidací piva. Ukázalo se, že kovové kationty mohou působit jinak při oxidaci kyseliny askorbové v deionizované vodě a jinak v složitějším systému, jako je pivo. Radikálovou oxidaci kyseliny askorbové vzdušným kyslíkem ve vodě podporuje především měď, zatímco v pivo se uplatňuje i železo, a to i za přítomnosti pouhých stop kyslíku (obr. 1–3).

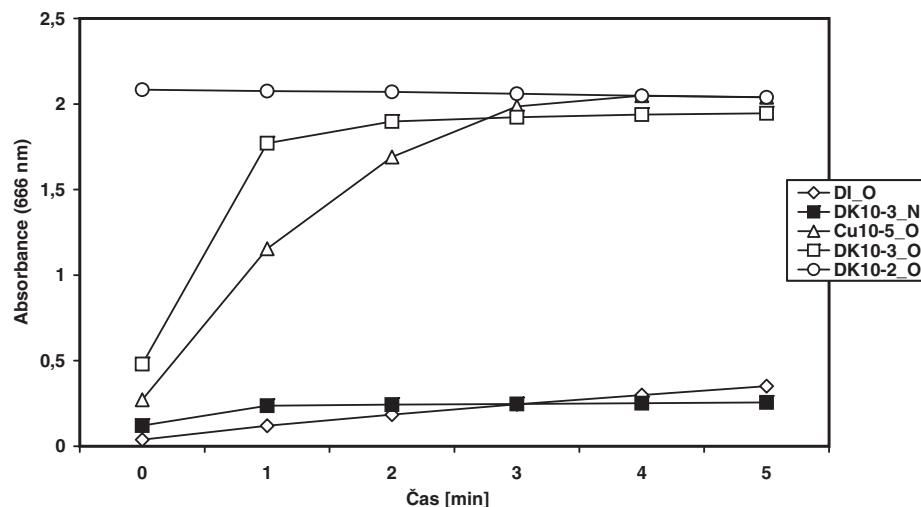
Experimentální technika, použitá v této práci, bohužel znemožňuje připravit vzorky absolutně prosté stop kyslíku i nepatrných zbytků kovů, a to ani při práci s modelovým roztokem kyseliny askorbové v deionizované



Obr. 4 Oxidace methylenové modři ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), redukované kyselinou askorbovou (0,01 %), v přítomnosti kyseliny galové (0,02–0,2 %) v deionizované (DI) vodě za aerobních (O) a anaerobních (N) podmínek



Obr. 5 Oxidace methylenové modři ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), redukované kyselinou askorbovou (0,01 %), v přítomnosti taninu (0,01–0,2 %) v deionizované (DI) vodě za aerobních (O) a anaerobních (N) podmínek



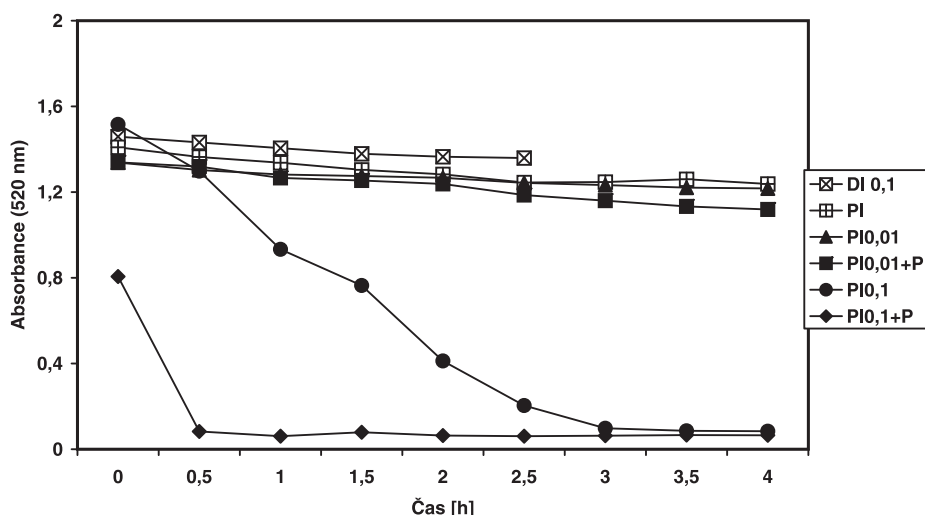
Obr. 6 Oxidace methylenové modři ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), redukované kyselinou askorbovou (0,01 %), v přítomnosti dichromanu draselného ( $\text{DK } 10^{-3} = 0,001 \%$ ,  $\text{DK } 10^{-2} = 0,01 \%$ ) a  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-5} = 0,00001 \%$  = 0,1  $\text{mg.l}^{-1}$ ) v deionizované (DI) vodě za aerobních (O) a anaerobních (N) podmínek

vodě. Ze spektroskopických pozorování rozpadu kyseliny askorbové vyplývá, že i při maximálním vyloučení stop kyslíku i iontů kovů se tato látka ve vodě rozpadá vlivem teploty a ionizačního záření. V úvahu se také musí

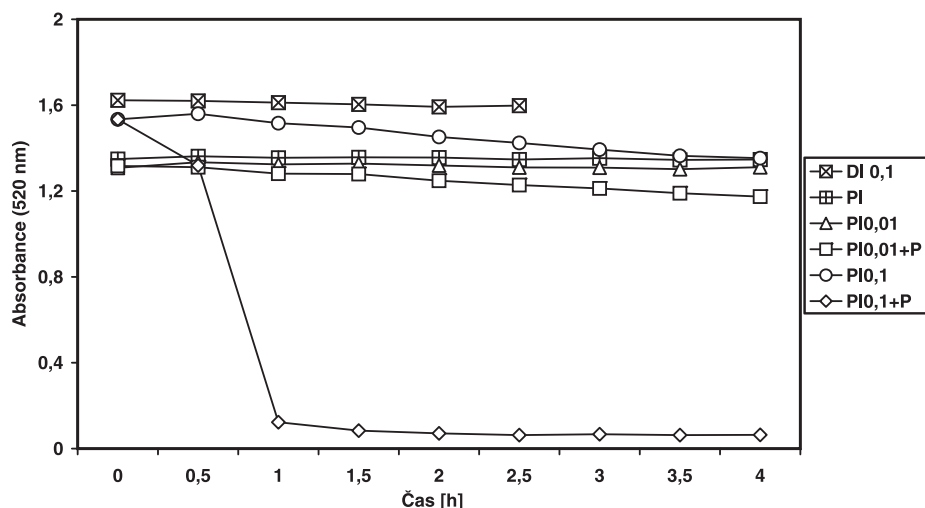
zahrnout samovolná pomalá oxidace kyseliny askorbové methylenovou modří, při níž vzniká askorbylový radikál ještě před ozáření.

Kyselina gallová se všeobecně považuje za silný antioxidant piva [7]. V testu s methyle-

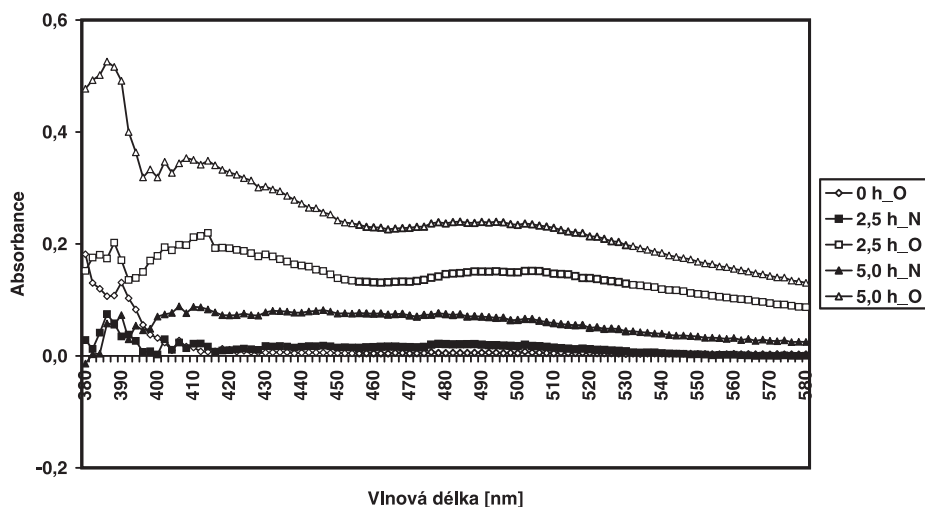




Obr. 7 Redukce methylové červeni ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) kyselinou askorbovou (0,01 a 0,1 %) v deionizované (DI) vodě a pivu (PI) za anaerobních podmínek, popř. s přidavkem peroxidu vodíku (0,001 %, +P)



Obr. 8 Redukce methylové červeni ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) kyselinou askorbovou (0,01 a 0,1 %) v deionizované (DI) vodě a pivu (PI) za aerobních podmínek, popř. s přidavkem peroxidu vodíku (0,001 %, +P)



Obr. 9 Rozdílové diferenční spektrum piva za aerobních (O) a anaerobních (N) podmínek před (0 h) a po (2,5 a 5 h) pasteraci při 60 °C

novou modří se prokázalo, že s rostoucí koncentrací kyseliny gallové vzrůstá také tvorba reaktivních forem kyslíku, současně však přítomnost této látky blokuje jejich další produkci. Klíčovou roli kyslíku potvrzuje průběh reakce za jeho nepřítomnosti, přičemž počáteční nenulová hodnota absorbance by mo-

hla svědčit o přítomnosti malé části silně oxidační formy kyseliny gallové, vzniklé např. vzdušnou oxidací při jejím skladování, a následný mírný nárůst absorbance souvisí s působením kyslíku (obr. 4). Podobný průběh se získal při studiu další přírodní polyfenolové sloučeniny, taninu (obr. 5).

Přímá oxidace kyseliny askorbové oxidačním činidlem, dichromanem draselným, prokazuje možný vznik reaktivních forem ze vzdušného kyslíku překvapivě i při klasickém přenosu mezi příjemcem elektronů, kyselinou askorbovou, a jejím dárce, dichromanem draselným. Tato reakce je velmi rychlá i za nepřítomnosti kyslíku, zde však reaktivní formy nevznikají (obr. 6).

Ve složitém přirozeném materiálu se vznik kyslíkových reaktivních forem z kyslíku může vázat na různé oxidačně redukční reakce, jinak probíhající i za jeho nepřítomnosti. Náhrada dichromanu draselného chromitou solí prokázala pouze mírný katalytický vliv, nevysvětluje plně vznik reaktivních forem kyslíku. Podobné závěry se získaly při modelových studiích roztoků pyrogallolu manganistanem draselným (data neuvedena).

Všechna tato pozorování svědčí o tom, že klasická oxidační činidla po přidavku do piva navozují změny, typické pro stárnutí piva [14]. Tyto změny probíhají za nepřístupu vzduchu a jsou výraznější v jeho přítomnosti [15].

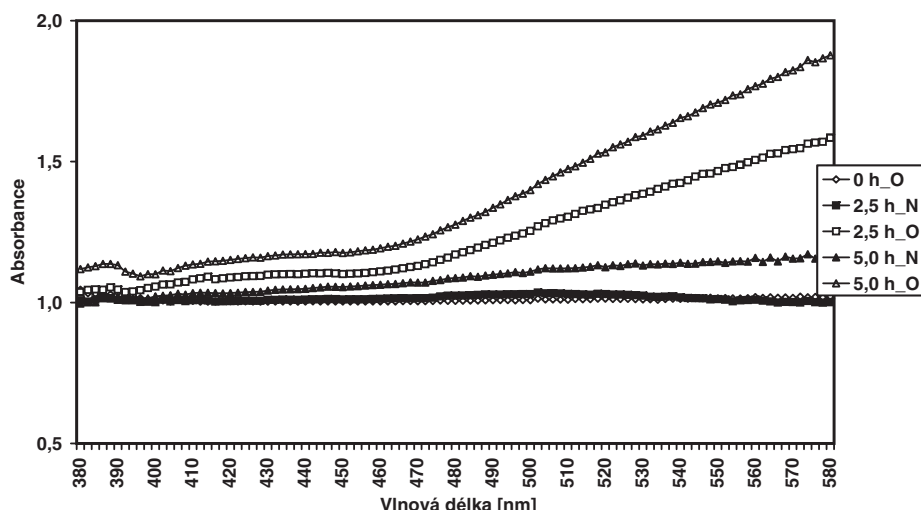
Dosavadní teorie stárnutí předpokládá, že nežádoucí změny senzorických vlastností souvisí s převládající oxidací. Všeobecně převládá názor, že kyslík, aktivovaný fyzikálními nebo chemickými vlivy, přechází na aktivní formy, které mají podstatně vyšší oxidační schopnost než samotné kyslíkové molekuly. Pro oxidační mechanismus stárnutí svědčí skutečnost, že provzdušněním piva se zvyšuje jeho barva, vzrůstá množství oxidačních produktů, pocházejících z aminokyselin nebo alkoholů a že přidavkem redukčních látek lze zpomalit tyto změny.

Kromě přímé účasti kyslíku se za základní reakci stárnutí považuje Fentonova reakce, zakládající se na rozkladu peroxidu vodíku za účasti kovových iontů. Vznik peroxidu vodíku lze vysvětlit katalytickou oxidací reduktorů nebo polyfenolů [6, 10]. Zajímavá je i samostatná oxidace piva peroxidem vodíku, který jako jediné z oxidačních činidel může snižovat barvu piva [10, 14]. Zdá se, že tato látka se může účastnit oxidačních i redukčních procesů v pivu.

Při stárnutí piva probíhají nevratné změny přítomných látek i za nepřístupu vzduchu, jak vyplývá z pokusů s redukcí methylové červeni kyselinou askorbovou. V deionizované vodě kyselina askorbová neredukuje methylovou červen ani při vysoké koncentraci kyseliny askorbové (0,1 %) a nepřítomnosti vzduchu. Methylová červen se však za stejných podmínek redukuje v pivu a průběh redukce se dále zesílí přidavkem peroxidu vodíku (obr. 7). Vzdušný kyslík potlačuje tuto degradační reakci (obr. 8).

V některých případech se však reakce může uskutečnit, poklesne-li dostatečně obsah kyslíku reakci za přítomnosti peroxidu vodíku [16]. Proto lze např. odbarvit methylovou červen v kyselině askorbové v deionizované vodě za přítomnosti mědnatých iontů a vzduchu, ale ne za jeho nepřítomnosti. Redukci kyslíku totiž vzniká peroxid vodíku a klesá koncentrace kyslíku. Vhodným uspořádáním reakčních podmínek lze přitom navodit vznik chemických oscilací jak ve vodném prostředí, tak v pivu [6].

S protikladnými vlastnostmi a chováním kyseliny askorbové za různých podmínek souvisí skutečnost, že kyselina askorbová se někdy považuje za tzv. nepravý antioxidant, působící pouze jako akceptor kyslíku, zatímco jiní autoři zdůrazňují schopnost kyseliny as-



Obr. 10 Podílové diferenční spektrum piva za aerobních (O) a anaerobních (N) podmínek před (0 h) a po (2,5 a 5 h) pasteraci při 60 °C

korbové vázat škodlivé volné radikály, a označují ji proto jako antioxidant. Chování kyseliny askorbové při předávkování může vykazovat různé druhy účinku, jak vyplývá i z této studie.

Obdarování methylové červení v pivu za anaerobních podmínek lze tedy považovat za indikátor katalytické degradace barviva za přítomnosti peroxidu vodíku, vznikající např. z peroxidů, nebo oxidovaných polyfenolických složek.

Pozoruhodným rysem popsané reakce je její zrychlení za přítomnosti maltosy a podobně za přítomnosti ethanolu, přičemž přídavek katalasy potlačoval tento účinek (data neuvedena). Ze studií s oxidačními systémy za přítomnosti barviva indigokarmínu jako indikátoru vyplývá, že přírodní organické látky mohou vstupovat do radikálových reakcí za účasti kyslíku a utlumovat, nebo podporovat jejich průběh [17].

Diferenční spektroskopie prokázala svou hodnotu zejména při oxidačních změnách piva při výrobě i skladování, při působení různých technologických faktorů a významu jednotlivých sloučenin při stárnutí piva. Metoda je tak citlivá, že v klasickém uspořádání může zaznamenat i oxidační změny piva při působení vzdušného kyslíku po 30 min při laboratorní teplotě (obr. 9). Pro tento účel je vhodnější tzv. rozdílová diferenční spektroskopie (RDS), zatímco dlouhodobější oxidační změny postihuje podílová diferenční spektroskopie (PDS) (obr. 10).

Obě metody postihují citlivě změny při stárnutí nejen piva, ale obecně všech čirých nápojů s nízkou barvou a mohou sloužit jako indikátor těchto změn vlivem skladování. Vyžaduje se pouze vysoce citlivý spektrofotometr s vysokou reprodukovatelností záznamu [10].

Z podílové diferenční spektroskopie lze odvodit význam kritéria podílu absorpce při dvou vlnových délkách, citlivě reagujícího na oxidační změny při výrobě piva [10]. Je však nutné uvědomit, že v některých případech tato hodnota selhává vzhledem k nepravidelným průběhům křivek PDS a že je proto vhodnější používat kompletního záznamu těchto křivek.

Tyto skutečnosti vedou k přirozené snaze potlačit jakýkoliv příjem kyslíku do piva. V sou-

časnosti se pozornost zaměřuje na průnik nepatrných množství kyslíku přes uzávěr obalů. Výchozím stavem pro oxidaci je obsah kyslíku v plynné a kapalně fázi po uzavření obalu [18].

Probíhá-li průstup kyslíku současně s jeho spotřebou pivem, lze teoreticky vždy naměřit nenulovou zbytkovou koncentraci kyslíku v hrdlovém prostoru během stárnutí. V lahvo- vých pivech, skladovaných po dobu 2 až 12 měsíců, jsme měřili zbytkový kyslík technikou, vyvinutou podle předchozího sdělení [18]. Piva se stáčela s nízkým obsahem celkového kyslíku v pivu (pod 50 ppb) po stočení. Přesto jsme naměřili poměrně stálý zbytkový obsah kyslíku v hrdlovém prostoru během 2 až 12 měsíců skladování při 20 °C, který vyjádřený v hodnotách obsahu vzduchu činil asi 0,1–0,2 ml. Tato měření by mohla přispět k posouzení vlivu různých korunkových uzávěrů při stáčení piva.

#### 4 ZÁVĚRY

Z uvedených experimentálních výsledků vyplývají tyto **teoretické** závěry:

1. Stočené pivo bez přítomnosti kyslíku tvoří vyvážený oxidačně-redukční systém, v němž probíhá relativně pomalá výměna elektronů mezi donory a akceptory elektronů (tzv. oxidačně-redukční dvojice, ORD). Výsledkem jsou nevratné oxidační změny, charakterizované uživatelem jako stárnutí. Tento proces lze urychlit zahříváním nebo přidavkem oxidačních činidel.
2. ORD vznikají enzymovými i neenzymovými reakcemi při pěstování surovin a jejich zpracování i při vlastní výrobě piva. Další ORD vznikají z neutrálních molekul, např. sacharidů, fyzikálními (teplo, záření) nebo chemickými degradačními změnami. Degradační změny jsou většinou nevratné. Přenos elektronů mezi ORD mohou urychlit anorganické nebo organické sloučeniny (electron transport influencing species, ETIS), urychlující tyto reakce na různém principu, většinou na základě vzniku dalších ORD. Reakce, založené na urychleném sdílení elektronů mezi ORD, si mohou vzájemně konkurovat.
3. Mezi oxidačními činidly zaujímá významné místo kyslík, vystupující po aktivaci jako silné oxidační činidlo, poskytující opět další

ORD se silnými degradačními účinky (reactive oxygen species, ROS a oxygen free radicals, OFRs). Aktivace zahrnuje působení fyzikálních (záření) nebo chemických činidel, působících tvorbou komplexů s kyslíkem, nebo jeho elektronovou redukcí. Při výrobě piva může oxidace vzdušným kyslíkem poskytovat další oxidační činidla, např. semichinony, chinony a peroxidy, které mohou působit i při stárnutí za nepřítomnosti vzduchu.

4. Reaktivní oxidační činidla, vznikající redukcí kyslíku reduktorem, mohou s tímto reduktorem reagovat, čímž je zaručena zpětná vazba mezi oxidačními činidly a jejich generátorem. Tato zpětná vazba je příčinou současných schopností redukcí látek vystupovat jako prooxidanty a antioxidanty. Antioxidační působení může zahrnovat vyčerpání kyslíku, záchyt silně reaktivních činidel (radikálů) nebo maskování ETIS vznikajícími produkty.
5. Oxidační reakce, které v konečném důsledku v pivu převládají, jsou doprovázeny i tvorbou silných redukčních činidel, která mohou vratně nebo nevratně degradovat organické sloučeniny piva. Přítomnost kyslíku může tuto degradaci inhibovat. Radikálová oxidace/redukce může být základem oxidačně-redukčních oscilačních redukcí v pivu.
6. V důsledku mechanismu popsaného v předešlých bodech se při stárnutí generují oxidační i redukční mechanismy napadající další látky piva za vzniku sensoricky významných sloučenin. Na konečném projevu sensorického stárnutí se podílí jak mechanismus vzniku silných oxidačních činidel, tak přítomnost látek, které se oxidují na sensoricky aktivní látky. Rychlost těchto reakcí závisí na koncentraci prekurzorů, které mohou vznikat kvašením, a na přítomnosti dalších látek, které mohou sensoricky významné látky maskovat.
7. Reaktivní degradační činidla mohou reagovat v řetězových reakcích s ostatními sloučeninami piva, přičemž závisí na jejich vzájemné koncentraci, zda se výsledná reakce utlumí, nebo rozšíří řetězovou reakci. Oxidační reakce mají své aktivátory a inhibitory, jejichž účinek závisí na jejich koncentraci. Za přítomnosti slabého zdroje radikálů může inhibitor (např. alkohol) reakci utlumit, při silném zdroji reakci podpořit. Řetězová reakce s prekurzorem sensorických změn přináší nežádoucí změny, řetězová reakce, při níž nevzniká sensoricky významná látka, může působit pozitivně.

Z teoretických výsledků vyplývají tyto **praktické** závěry:

1. Stárnutí piva nelze zastavit ani fyzikálními, ani chemickými úpravami, neboť degradace složitých organických látek v sobě obsahuje nevratnost. Stárnutí lze těmito metodami zpomalit. Univerzální metodou zpomalení stárnutí je snížení teploty. Prakticky lze vliv teploty sledovat monitorováním teploty po dobu mezi výrobou a spotřebou a vyjádřením míry poškození vhodnou stupnicí v tzv. sensorických jednotkách stárnutí.
2. Zásahy k zpomalení stárnutí piva lze uskutečnit již při pěstování surovin a jejich zpracování. Použitelnost těchto zásahů je však omezena skutečností, že tradiční chuť piva vznikala spolupůsobením stejných procesů, které také působí při stárnutí piva.



- Takto lze připravit pivo s chutí odlišnou od tradičního výrobku, ale s pomalým stárnutím. Závisí na reakci spotřebitele na uvedení takového výrobku na trh.
3. Oxidačně-redukční změny v průběhu stárnutí piva lze sledovat s použitím jednoduchých optických metod, jako je diferenční spektroskopie nebo jednoduché kolorimetrické metody.
  4. Protože kyslík působí vždy negativně, je nutné omezit jeho působení, regulovat jej během výroby a posléze zcela eliminovat od okamžiku stáčení. Kontinuální měření kyslíku ve vybraných místech výroby je nutné navrhovat na základě rychlosti jeho spotřeby, neboť kyslík spotřebovaný pivem působí následně negativně.
  5. Schopnost generovat silně aktivní oxidační formy lze měřit fyzikálními i chemickými metodami. Reakce kyslíku se musí měřit s použitím piva bez rozpuštěného kyslíku, neboť styk piva s kyslíkem zásadně mění jeho vlastnosti. K tomu se musí použít nové postupy zbavování piva oxidu uhličitého. Stejně metody pomohou identifikovat působení ETIS (electron transport influencing species).
  6. Existence zpětné vazby mezi redukující látkou a z kyslíku vznikajících reaktivních sloučenin umožňuje posuzovat prooxidační i antioxidační vlastnosti jednotlivých látek během výroby. Z tohoto faktu také vyplývá, že stupeň poškození piva je závislý na rychlosti spotřeby kyslíku a vlastní oxidace příslušného prekurzoru, z čehož plyne možnost optimalizace tohoto procesu.
  7. Omezení přístupu kyslíku po stočení piva do obalu skýtá další možnosti, neboť žádný ze současných používaných obalů zcela nezabraňuje vstupu kyslíku. V důsledku toho se vždy v plynné fázi obalu vyskytuje nízké množství kyslíku, které lze měřit invazivními a přednostně neinvazivními metodami. Tato technika opět umožňuje další zvýšení jakosti vyráběných nápojů.
  8. Identifikace prekurzorů senzoryckých významných látek v kvasných těkavých produktech umožňuje cíleně zpomalit stárnutí piva podmínkami kvašení a výběrem kvasničných kmenů. Základem tohoto postupu je příprava senzoryckých významných látek řízenou oxidací piva.

#### Literatura

- [1] Bamforth, C.W.: The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assesment. *Brauwelt Int.* **17**, 1999(2), s. 98–110.
- [2] Hashimoto, N., Eskima, T.: Composition and pathway of formation of stale aldehydes in bottled beer. *J. Am. Soc. Brew.* **35**, 1977(3), s. 145–150.
- [3] Irwin, A.J., Barker, R.L., Pipasts, P.: The role of copper, oxygen and polyphenols in beer flavor instability. *J. Am. Soc. Brew.* **49**, 1991(3), s. 140–149.
- [4] Rangel-Aldao, R., Bravo, A., Galindo-Castro, I., Sánchez, B., Reverol, L., Scherer, E., Madrid, J., Ramírez, J.L., Herrera, J., Penttillä, M., Vehkomäki, M.-L., Vidgren, V., Virtanen, H., Home, S.: A new technology for beer flavor stabilization: control of key intermediates of the Maillard reaction. *Proceedings of the 28th EBC Congress BUDAPEST 2001*, CD ROM, č. 61, s. 576–585.
- [5] Savel, J.: Reductones and beer ageing. *Tech. Q.Master. Brew. Assoc. Am.* **38**, 2001(3), s. 135–144.
- [6] Šavel, J.: Aerobní a anaerobní stárnutí piva. *Kvasny Prum.* **49**, 2003, s. 114–119.
- [7] Franz, O., Back, W.: DPPH – scavenging activity of beer and polyphenols measured by ESR. *Proceedings of the 28th EBC Congress BUDAPEST 2001*, CD ROM, č. 66, s. 621–630.
- [8] Andersen, M.L., Outrup, H., Skibsted, L.H.: Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2000(8), s. 3106–3111.
- [9] Savel, J.: Electron transport influencing species in beer. (nabídnuto k publikaci).
- [10] Savel, J.: Differential spectroscopy and beer ageing. *Monatsschr. Brauwiss.* **57**, 2004, č. 2, s. 1–7.
- [11] Müller, K.: Active packaging in breweries – oxygen scavenger for beer. *Proceedings of the 29th EBC Congress, DUBLIN 2003*, CD ROM, č. 76, s. 796–805.
- [12] Methner, F.J., Fritsch, H., Stephan, A.: Influence of storage conditions, raw materials and brewing technology on the formation of Strecker aldehydes during beer aging. *Proceedings of the 29th EBC Congress, DUBLIN 2003*, CD ROM, č. 68, s. 732–739.
- [13] Vesely, P., Lusk, L., Basarova, G., Seabrooks, J., Ryder, D.: Analysis of Strecker aldehydes in beer during storage using SPME with on-fiber derivatization. *Proceedings of the 29th EBC Congress, DUBLIN 2003*, CD ROM, č. 94, s. 965–975.
- [14] Šavel, J., Zdvihalová, D., Prokopová, M.: Oxidační destrukční analýza piva a meziproduktů. *Kvasny Prum.* **43**, 1997(5), s. 132–136.
- [15] Jakš, V.: Vliv oxidace na kvalitu piva. Diplomová práce VŠCHT, ÚKCHB, Praha 2003.
- [16] Savel, J.: Fenton reaction acceleration using maltose and ascorbic acid. *Monatsschr. Brauwiss.* **56**, 2003(1/2), s. 4–8.
- [17] Savel, J.: A new kind of antioxidant test. *Monatsschr. Brauwiss.* **54**, 2001(9/10), s. 206–208.
- [18] Šavel, J.: Měření vzdušného kyslíku a nadměrného pění piva v obalech. *Kvasny Prum.* **50**, 2004, s. 66–69.

Lektorovala

Prof. Ing. Gabriela Basařová, DrSc.  
Do redakce došlo 2. 2. 2004



NORIT The Purification Company

- Chlazení mladiny
- Provzdušňování mladiny
- Zakvašování
- Propagace kvasnic
- Úschova kvasnic
- Kyselé praní
- Filtrace
- HGB
- CIP stanice
- Technologické celky
- Automatizace

**BRAU  
Beviale 2004**  
Nürnberg 10. - 12.11.  
Hala 6  
Stánky 319, 321, 323, 325, 327, 420



REGOM INSTRUMENTS s.r.o.

Brabcova 2 / 1159, 147 00 PRAHA 4

241 402 206, 241 433 153, 241 433 152

241 400 290, 241 433 151 [regom@regom.cz](mailto:regom@regom.cz) [www.regom.cz](http://www.regom.cz)