

## ZMĚNY BARVY PŘI STÁRNUTÍ PIVA

### COLOUR CHANGES DURING BEER AGING

JAN ŠAVEL, PETR KOŠIN, ADAM BROŽ, Budějovický Budvar, n. p., Karoliny Světlé 4,  
370 21 České Budějovice; e-mail: savel@original-budweiser.cz

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Změny barvy při stárnutí piva.** Kvasny Prum. 54, 2008, č. 2, s. 30–37.

Studovaly se změny spekter žlutých, oranžových a žlutočervených oxidačních produktů epikatechinu s typickým absorpčním maximem v okolí 430 nm. K neenzymové tvorbě těchto látek je nutný kyslík, a jejich tvorba se zvyšuje s rostoucím pH a koncentrací kovů  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . Z těchto důvodů vznikají barevné produkty snáze ve vodě vodovodní, než deionizované. Vzniklá barviva se mohou částečně odbarvovat s klesajícím pH a rostoucí koncentrací redukujících látek. Jednou vytvořené barevné látky nelze zcela vratně zredukovat, čemuž odpovídá model částečně vratné oxidačně-redukční reakce a postupné narůstání barvy modelových roztoků i piva v aerobním i anaerobním prostředí. Oxidované polyfenoly i reduktony mohou při redukci poskytovat další oxidační činidla, např. radikály semichinonů a reduktonů, jejichž vzájemnými reakcemi nevratně vznikají další barevné produkty. Vzájemné reakce mezi oxidovanými polyfenoly a reduktony lze urychlit ozářením viditelným světlem a potom sledovat diferenční spektrofotometrií.

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Colour changes during beer aging.** Kvasny Prum. 54, 2008, No. 2, p. 30–37.

Spectrum changes of yellow, orange and yellow-red oxidation products of epicatechin with their typical absorption maximum around 430 nm were studied. Oxygen is necessary for the non-enzymatic formation of these substances and their formation increases with growing pH value and  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  concentration.

Based on the a.m. reasons, colour products are formed more easily in tap water than in deionized one. The colour substances formed can partially discolour with falling pH value and increasing concentration of reducing substances. Colour substances once formed cannot be fully reversibly reduced, which corresponds to the model of a partially reversible oxidation-reduction reaction and gradual colour increasing of model solutions as well as beer in both aerobic and anaerobic conditions.

Oxidized polyphenols as well as reductones can provide further oxidizing agents during the reduction process, such as semiquinone and reductone radicals and further colour substances are formed as a result of their mutual reactions.

Mutual reactions between oxidized polyphenols and reductones can be speeded up by the effect of visible radiation and then observed by differential spectrophotometry.

**Šavel, J. - Košin, P. - Brož, A.: Die Färbenänderungen beim Bieralterungsprozess.** Kvasny Prum. 54, 2008, Nr. 2, S. 30–37.

Es wurden die Spektrumsänderungen von Gelb-, Orangen-, Gelbroxidationsprodukten des Epikatechins mit einem typischen Absorptionsmaximum im Bereich 430 nm studiert. Zur nicht enzymatischen Bildung von diesen Stoffen ist notwendig Sauerstoff, ihre Bildung nimmt mit einem wachsenden pH – Wert und der  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  Metallkonzentration zu. Aus diesen Gründen entstehen die Farbprodukte einfacher im Wasser aus der Wasserleitung als im deionisierten Wasser. Mit einem abnehmenden pH – Wert und einer zunehmenden Konzentration von reduzierenden Stoffen können die entstehende Farbstoffe teilweise entfärbt werden. Schon gebildete Farbstoffe können völlig rückgängig nicht reduziert werden, dazu ein Modell einer rückgängigen oxidation-reduzierenden Teilreaktion gleichzeitig mit einem allmählichen Farbenanstieg von Modell- und Bierlösungen im Aerob- und Unaerobmilieu entspricht. Bei der Reduktion können die oxidierte Polyphenols und Reduktions weitere Oxidationsmittel entstehen lassen, zum Beispiel Semichinonradikals und Reduktions. Durch eine gegenseitige Reaktion von diesen Stoffen bilden irreversible Farbprodukte. Durch eine Bestrahlung mit einem sichtbaren Licht kann die gegenseitige Reaktion unter den oxidierten Polyphenols und Reduktions beschleunigt werden und dann die Differenzspektrophotometrie zu verfolgen.

**Шавел, Я. – Кошин, П. – Брож, А.: Перемены цвета во время старения пива.** Kvasny Prum. 54, 2008, No. 2, стр. 30–37.

Статья занимается изменением спектров жёлтых, оранжевых и жёлто-красных окислительных продуктов эпикатехина с типичным максимумом абсорпции около 430 nm. К не-ферментному созданию этих веществ необходим кислород, и их создание возрастает с возрастающим pH и концентрацией металлов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ . По той причине образуются разноцветные продукты лучше в воде водоводной, чем деионизированной. Образованные красители могут частично обесцвечиваться с понижающимся pH и с возрастающей концентрацией редуцирующих веществ. Один раз образованные цветные вещества нельзя полностью возвратно восстановить, чему отвечает модель частично возвратной окислительно-восстановительной реакции и постепенные повышение цвета модельных растворов и пива в аэробных и анаэробных условиях. Окислированные полифенолы и редуктоны могут в течение восстановления предоставлять другие окислительные реактивы, напр. радикалы семихинонов и редуктонов, реакциями которых необратимо возникают последующие цветные продукты. Взаимные реакции между окислированными полифенолами и редуктонами возможно ускорить облучением видимым светом и далее наблюдать дифференциальной спектрофотометрией.

**Klíčová slova:** epikatechin, polyfenoly, reduktony, barva piva, stárnutí, diferenční spektrofotometrie, neenzymová oxidace, vratné a nevratné reakce

#### 1 ÚVOD

Změny barvy potravin při jejich skladování se vykládají různými mechanismy chemických přeměn. Obvykle se uvažují enzymová a neenzymová oxidace polyfenolů a/nebo vznik melanoidních látek [1]. Podobně se chová i pivo, které stárnutím hnědne za tvorby nežádoucích chuťových produktů. V úvahu je nutné vzít vznik barevných karamelizačních látek, zejména při rmutování a vaření mladiny [2].

Ačkoliv počáteční reakční mechanismus těchto reakcí je dobře znám, málo detailních informací se v literatuře získá o dalších stupních tvorby barevných produktů. U polyfenolů se nejčastěji uvádějí barevné oxidační produkty katechinů, u sacharidů karamelizační nebo melanoidní pigmenty.

Enzymově i neenzymově oxidovaný katechin vykazuje typický absorpční pás s maximem okolo 430 nm. Barevné produkty se mohou

**Keywords:** epicatechin, polyphenols, reductones, beer colour, ageing, differential spectrophotometry, non-enzymatic oxidation, reversible and irreversible reactions

#### 1 INTRODUCTION

Food colour changes during storage are explained by various mechanisms of chemical changes. Usually, enzymatic as well as non-enzymatic oxidations of phenols and/or formation of melanoid substances are considered [1]. Similar changes can be found in beer as well, which becomes brown by ageing, forming undesirable gustatory products). Colour substances of caramelization formed especially during mashing and hopped wort boiling should be taken in account, too [2].

Although initial reaction mechanisms of these reactions are known well, there is little detailed information on further stages of colour product formation that could be found in literature. Mostly, colour products of catechin oxidation for polyphenols and caramelization products or melanoid pigments for saccharides are described.

kombinovat s dalšími látkami, jako jsou rozkladné produkty sacharidů nebo acetaldehyd [3, 4].

Většinou se tvorba barevných sloučenin studuje za aerobních podmínek. Také pivo rychle stárne za přítomnosti kyslíku, ale tento proces se jeho vyčerpáním nezastaví. Kromě toho by následně měla barva piva za anaerobních podmínek klesat působením redukcujících látek. Do skladovaného piva může pronikat kyslík i netěsnostmi uzávěru nebo prostupností obalu, ale ani tento vliv nemůže vysvětlit rozsah a rychlost nežádoucích změn. Aplikace látek pohlcujících kyslík do uzávěru obalů stárnutí piva nezastaví.

Podobné nejasnosti se týkají i antioxidačního působení reduktů a polyfenolů [5, 6]. Po vymizení kyslíku v pivu trvale převládá redukční prostředí, které by mělo silně potlačovat další oxidační změny. Často se zastánci antioxidačního působení reduktů a polyfenolů utkávají se zastánci teorie vzniku nebezpečných radikálů z jejich oxidovaných forem působením reduktů.

Kromě toho se uvádí tvorba peroxidu vodíku během oxidace polyfenolů vzdušným kyslíkem [7]. Většina těchto reakcí vyžaduje kyslík, i když samotný rozklad peroxidu vodíku může probíhat i anaerobně.

Většina autorů se shoduje v tom, že rozkladné produkty sacharidů, melanoidiny i oxidované polyfenoly mohou způsobovat senzorické stárnutí piva za přítomnosti kyslíku oxidací aminokyselin a vyšších alkoholů [8, 9].

Další základní teorie stárnutí piva se zakládá na oxidačním rozkladu lipidů a mastných kyselin, probíhajícím přes tvorbu hydroperoxidů. Naproti tomu se jen vzácně jednotlivé práce zabývají stárnutím za anaerobních podmínek [10]. Tyto aerobní oxidační teorie se opírají o negativní působení reaktivních druhů kyslíku. Přitom existence anaerobních degradací složitějších látek na jednodušší je v přírodě velmi rozšířena u anaerobních nebo fakultativně aerobních mikroorganismů a jejich stárnutí svědčí o významné složce anaerobních procesů v živé buňce.

Klíčovými reakcemi při stárnutí piva jsou Streckerova oxidace a Maillardova reakce, objevené dávno před průkazem kyslíkových radikálů. Obě reakce mohou probíhat za anaerobních podmínek, i když přítomnost kyslíku většinou jejich průběh urychluje. Podobně je tomu i u Fentonovy reakce, která je třetí významnou reakcí při stárnutí piva.

Tato práce se pokouší porovnat průběh barevných změn při stárnutí piva a modelových roztoků. Protože tyto reakce silně závisí na složení vodního prostředí, ve kterém probíhají, porovnával se průběh reakcí v deionizované i vodovodní vodě.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Chemikálie

Maltosa, kyselina askorbová i (-)-epikatechin pocházely od Sigmaly Aldrich, podobně jako složky pro přípravu fosfátových ústojných roztoků (1/15 mol.l<sup>-1</sup>), včetně kyseliny fosforečné.

### 2.2 Zásobní roztoky

Kyselina askorbová (0,1 %, 1 % a 10 % hm.), dihydrát chloridu měďnatého (0,0268 g.l<sup>-1</sup> = 10 mg.l<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>), tetrahydrát chloridu železnatého (0,0356 g.l<sup>-1</sup> = 10 mg.l<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>), vše v deionizované vodě. Pracovní roztoky se připravovaly ředěním nebo dávkováním zásobních roztoků do vzorku, většinou v poměru 1:100. Použitá vodovodní voda obsahovala Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> v množství 0,7–0,8 mmol.l<sup>-1</sup> (asi 4 °n), Fe 0,1 mg.l<sup>-1</sup>, Cu pod 0,05 mg.l<sup>-1</sup>, pH 6,9.

### 2.3 Přístroje

Spektrofotometr Hach-Lange DR 5000 s válcovitými skleněnými nádobkami (kyvetami) LCW 906 s optickou dráhou 1 cm, ultratermostat Julabo, pH metr Mettler Toledo.

Přístroj na ozařování vzorků ve viditelném světle se skládal z trubice s přívodem a odvodem vodovodní vody pro chlazení vzorku. Kyveta LCW 906 se vzorkem se zasunula do chladicí trubice a v protékající chladicí vodě se vzorek ozařoval dvěma halogenovými žárovkami 2x50 W ze vzdálenosti 1 cm od kyvety.

### 2.4 Pracovní postupy

#### 2.4.1 Příprava barevných oxidačních produktů z epikatechinu

Roztok epikatechinu (100 mg.l<sup>-1</sup>) se připravil mícháním pevné látky v deionizované nebo vodovodní vodě, popř. ještě s přísadkou Fe<sup>2+</sup> a Cu<sup>2+</sup> (oba 0,1 mg.l<sup>-1</sup>), a roztoky se plnily do válcovitých skleněných kyvet. Z poloviny vzorků se odstranil vzduch probubláváním dusíkem (20 min) a po uzavření pryžovou zátkou se kyvety zahřívaly 90 min při 60 °C ve vodní lázni (pasterace). Po ochlazení se měřila absorpční spektra roztoků (obr. 1).

Enzymaticky as well as non-enzymatically oxidized catechin shows a typical absorption band with its maximum around 430 nm. Colour products can be combined with other substances such as decomposition products of saccharides or acetaldehyde [3, 4].

In most cases, the formation of colour substances is studied under aerobic conditions. Also beer ages fast in the presence of oxygen, but this process does not stop when it is depleted. Moreover, the beer colour should be decreasing by the activity of reducing substances under anaerobic conditions. Oxygen can penetrate beer also through the untightness of the closure or packaging permeability, but even this influence cannot explain the extent and speed of undesirable changes. The application of the oxygen-absorbing substances in the packaging closures does not stop beer ageing.

Similar unclearness also concerns the antioxidant activity of reductones and polyphenols [5, 6]. After oxygen disappears, reducing conditions in beer prevails. Under such conditions, further oxidation changes should be strongly suppressed. Those who believe in antioxidant activities of reductones and polyphenols compete with those believing in the theory of formation of dangerous radicals from their oxidized forms by the activity of reductones. In addition to this, the formation of hydrogen peroxide during polyphenol oxidation by atmospheric oxygen is described [7]. Most of these reactions require oxygen, even if the decomposition of hydrogen peroxide itself can also take place under anaerobic conditions. The majority of authors agree that the decomposition product of saccharides, melanoidins and oxidized polyphenols can cause sensorial ageing of beer under the presence of oxygen by the oxidation of amino acids and higher alcohols [8, 9].

Another basic theory of beer ageing is based on the oxidation decomposition of lipids and fatty acids through the formation of hyperoxides. On the other hand, just a small number of studies deals with the ageing under anaerobic conditions [10]. These aerobic oxidation theories are grounded on the negative effect of reactive forms of oxygen. But at the same time, the existence of anaerobic degradations of more complex substances to simple ones is quite spread in the nature both for anaerobic or facultative aerobic microorganisms and their ageing makes the importance of anaerobic processes in a live cell more evident.

The key reactions in the process of beer ageing are Strecker's oxidation and Maillard's reaction discovered a long ago before the proving the existence of oxygen radicals. Both reactions can take place under anaerobic conditions, even if the presence of oxygen makes their course faster. Similarity can be found for Fenton's reaction, the third important reaction during beer ageing.

This study attempts to compare the course of colour changes during beer ageing and in model solutions. Since these reactions are strongly dependent on the composition of the aqueous solution where they take place, the course of reactions in deionised and tap water was compared.

## 2 MATERIAL AND METHODS USED

### 2.1 Chemicals

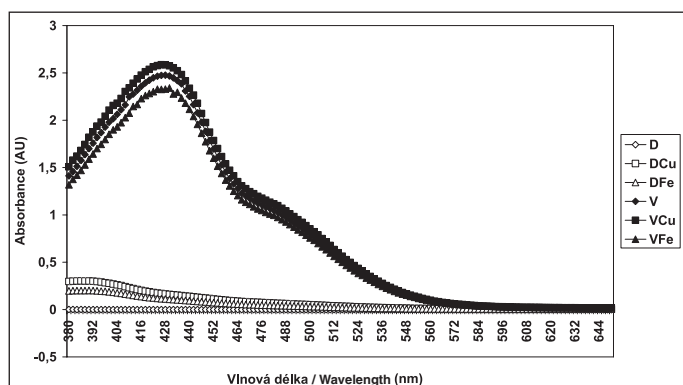
Maltose, ascorbic acid as well as (-)-epicatechin were bought from company Sigma Aldrich, together with the components for the preparation of phosphate buffer solutions (1/15 mol.l<sup>-1</sup>), including phosphoric acid.

### 2.2 Stock solutions

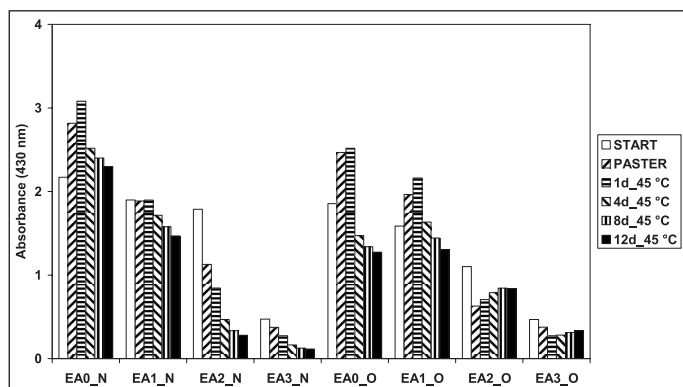
Ascorbic acid (0.1 %, 1 % a 10 % by weight), cupric chloride dihydrate (0.0268 g.l<sup>-1</sup> = 10 mg.l<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>), tetrahydrate ferrous chloride (0.0356 g.l<sup>-1</sup> = 10 mg.l<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>), all of them dissolved in deionised water. Working solutions were prepared by dilution or dosage of stock solutions into the sample, mostly in a ratio of 1:100. The tap water used contained Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in the amount of 0.7–0.8 mmol.l<sup>-1</sup> (approx. 4 °dH – German degrees of hardness), Fe 0.1 mg.l<sup>-1</sup>, Cu below 0.05 mg.l<sup>-1</sup>, pH value 6.9.

### 2.3 Apparatus

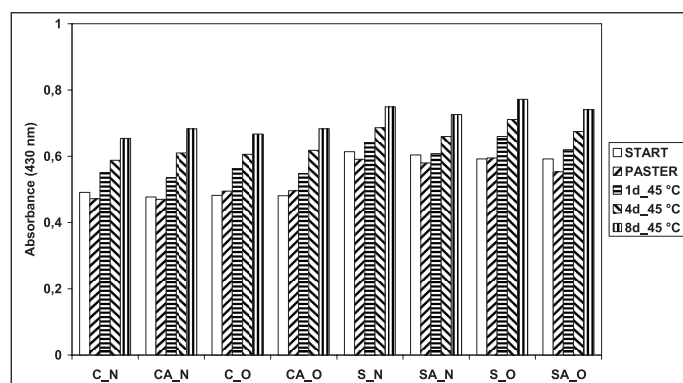
Spectrophotometer Hach-Lange DR 5000 with cylindrical glass cells (cuvettes) LCW 906 with an optical path of 1 cm, ultrathermostat Julabo, pH-meter Mettler Toledo. The device for the exposure of the samples to visible light consisted of a tube with the inlet and outlet of tap water for sample cooling. The LCW 906 cuvette with the sample was inserted into the cooling tube and the sample was exposed to two halogen lamps 2x50 W from a distance of 1 cm from the cuvette in flowing cooling water.



Obr. 1 / Fig. 1 Absorpční spektra epikatechinu (100 mg.l<sup>-1</sup>) v deionizované (D) a vodovodní (V) vodě s přidavkem Cu<sup>2+</sup> a Fe<sup>2+</sup> (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) po zahřívání 90 min při 60 °C v přítomnosti vzduchu / Absorption spectra of epicatechin (100 mg.l<sup>-1</sup>) in deionised (D) and tap water (V) with addition of Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) after warming at 60 °C for 90 minutes under air presence.



Obr. 2 / Fig. 2 Změny barev oxidovaných roztoků epikatechinu ve vodovodní vodě bez (EA0\_N) a s přidavkem kyseliny askorbové (10 mg.l<sup>-1</sup> EA1\_N, 100 mg.l<sup>-1</sup> EA2\_N a 1000 mg.l<sup>-1</sup> EA3\_N) po pasteuraci (90 min při 60 °C) a následném zahřívání při 45 °C v anaerobním (N) a aerobním prostředí (O) / Colour changes of oxidized epicatechin solutions in tap water without (EA0\_N) and with ascorbic acid addition (10 mg.l<sup>-1</sup> EA1\_N, 100 mg.l<sup>-1</sup> EA2\_N and 1000 mg.l<sup>-1</sup> EA3\_N) after pasteurisation (90 minutes at 60 °C) and subsequent warming at 45 °C under anaerobic (N) and aerobic conditions (O).



Obr. 3 / Fig. 3 Změny barvy nepasterovaného, čerstvě stočeného (C) a dlouhodobě skladovaného (1 rok při 20 °C) starého piva (S) s přidavkem kyseliny askorbové (100 mg.l<sup>-1</sup>, A) a bez něj (bez písmena A) po pasteuraci (90 min při 60 °C) a následném zahřívání při 45 °C v anaerobním (N) a aerobním prostředí (O) / Colour changes of non-pasteurised, fresh-bottled beer (C) and long-time stored beer (1 year at 20 °C), old beer (S) with addition of ascorbic acid (100 mg.l<sup>-1</sup>, A) and without it (without A letter) after pasteurisation (90 minutes at 60 °C) and subsequent warming at 45 °C under anaerobic (N) and aerobic conditions (O).

#### 2.4.2 Redukce barevných oxidačních produktů epikatechinu kyselinou askorbovou

Roztoky barevných oxidačních produktů epikatechinu připravené podle předchozího odstavce se plnily do válcovitých skleněných kyvet. Po přidavku kyseliny askorbové ve výsledné koncentraci (0 až 1000

## 2.4 Procedures

### 2.4.1 Preparation of colour oxidation products from epicatechin

The epicatechin solution (100 mg.l<sup>-1</sup>) was prepared by mixing the solid substance in deionised or tap water, possibly with addition of Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> (both 0.1 mg.l<sup>-1</sup>), and the solutions were filled into cylindrical glass cuvettes. Oxygen was removed from one half of the samples by bubbling nitrogen through the solutions (20 minutes) and after closing the cuvettes by a rubber stopper; they were warmed at 60 °C for 90 minutes in water bath (pasteurisation). After cooling down, the absorption spectrum of the solutions was measured (Fig. 1).

### 2.4.2 Reduction of colour oxidation products of epicatechin by ascorbic acid

The solutions of colour oxidation products of epicatechin prepared according to the previous paragraph were filled into cylindrical glass cuvettes. After adding of ascorbic acid in a final concentration (0 to 1000 mg.l<sup>-1</sup>), removing oxygen from one half of samples by bubbling nitrogen through the solutions (20 minutes) and after closing the cuvettes by a rubber stopper, they were warmed at 60 °C for 90 minutes in water bath (pasteurisation). After pasteurisation, the absorbance of the samples was measured during storage in a dark place at 45 °C (Fig. 2).

### 2.4.3 Reduction of colour substances of beer by ascorbic acid

Non-pasteurised (fresh-bottled) beer after bottling and one year old pasteurised beer (stored in the dark at 20 °C) was decarbonised by bubbling nitrogen or air through the sample (20 minutes). After adding ascorbic acid (100 mg.l<sup>-1</sup>), the beer samples were filled into cylindrical glass cuvettes. The air was removed from one half of the cuvettes by bubbling nitrogen through the solutions (20 minutes) and after closing the cuvettes by a rubber stopper; they were warmed at 60 °C for 90 minutes in water bath (pasteurisation). After pasteurisation, the absorbance of the samples was measured during storage in a dark place at 45 °C (Fig. 3).

### 2.4.4 Colour change of oxidation products of epicatechin by the effect of pH and reducing conditions

The solutions of colour oxidation products of epicatechin prepared according to the first paragraph of the procedure were mixed with deionised water or phosphate buffer solutions in a ratio of 1:1 with addition of ascorbic acid (100 mg.l<sup>-1</sup>) and without it. Oxygen was removed from one half of the samples by bubbling nitrogen through the samples and after closing by a rubber stopper, the absorbance of the samples was measured during storage in a dark place at 45 °C (Fig. 4, 5).

### 2.4.5 Formation of colour oxidation products of epicatechin by boiling in maltose solution

Epicatechin (100 mg.l<sup>-1</sup>) or maltose (10 % by weight) or the mixture of both substances was dissolved in tap water and the solutions were boiled under the presence of oxygen for 2 hours under a reflux condenser. After cooling down, the samples were pipetted into cylindrical glass cuvettes. Oxygen was removed from one half of the samples by bubbling nitrogen through the samples and after closing by a rubber stopper, the absorbance of the samples was measured during storage in a dark place at 45 °C (Fig. 6, 7).

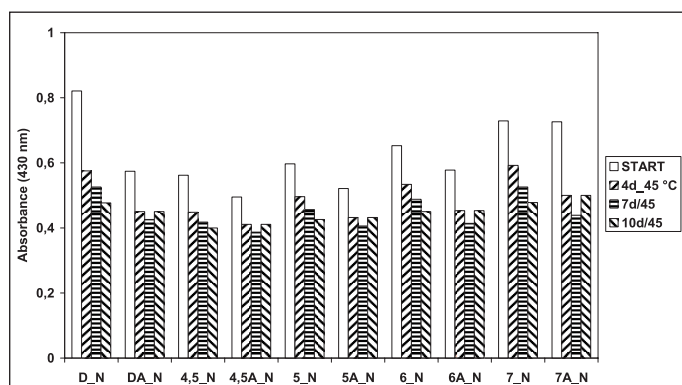
### 2.4.6 Absorbance changes after exposure of colour products of epicatechin to visible light

Non-pasteurised 12% beer was decarbonised by bubbling nitrogen or air through the sample (20 minutes) and beer was exposed to 2 halogen lamps (2x50 W) for 15 and 75 minutes. After exposure, the absorbance spectra of both samples were measured and differential spectra as the difference between the non-exposed and exposed sample were calculated and displayed (Fig. 8).

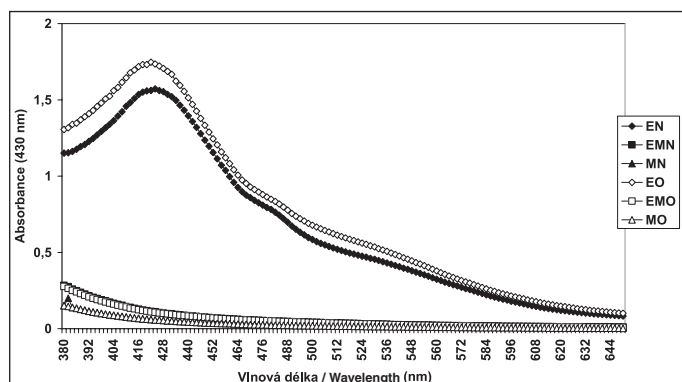
### 2.4.7 Effect of epicatechin on colour changes of beer during storage

(-)Epicatechin in the amount of 100 mg.l<sup>-1</sup> was dissolved in beer under continuous stirring; carbon dioxide was previously removed from the beer sample by bubbling nitrogen or air through the sample (20 minutes). After epicatechin was dissolved, the beer was stored for two days at 45 °C and differential spectra were recorded (Fig. 9). The natural content of epicatechin in the used beer before its addition was not determined due to the non-availability of required techniques, but it can be assumed that the content was considerably lower as it can be evidenced from literature data that is strongly dependent on the methodology used.

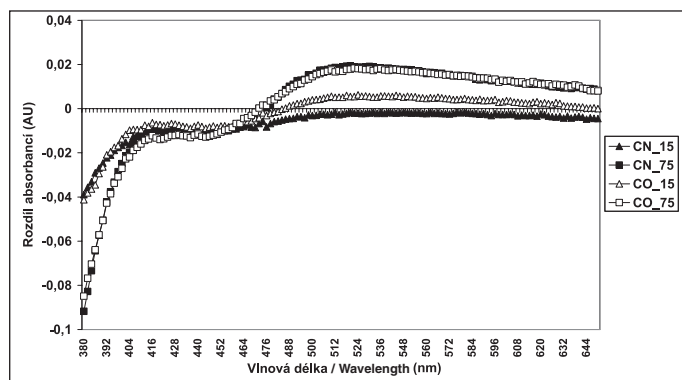




Obr. 4 / Fig. 4 Změny barvy oxidovaných roztoků epikatechinu s přidavkem deionizované vody (D) nebo ústojných roztoku (pH = 4,5–7) popř. ještě kyseliny askorbové (100 mg.l<sup>-1</sup>, A) po zahřívání za anaerobních podmínek (N) / Colour changes of oxidized solutions of epicatechin with addition of deionised water (D) or buffer solutions (pH = 4.5-7), possibly ascorbic acid (100 mg.l<sup>-1</sup>, A) after warming under anaerobic conditions (N).



Obr. 6 / Fig. 6 Absorpční spektra roztoků epikatechinu (100 mg.l<sup>-1</sup>, E), maltosy (10 %, M) a jejich směsi (EM) vařených 2 h pod zpětným chladičem, ochlazených za přítomnosti vzduchu (O) nebo vybublávaných dusíkem (N) / Absorption spectra of epicatechin solutions (100 mg.l<sup>-1</sup>, E), maltose (10 %, M) and their mixture (EM) boiled for 2 hours under reflux condenser, cooled down under oxygen presence (O) or bubbled through by nitrogen (N).

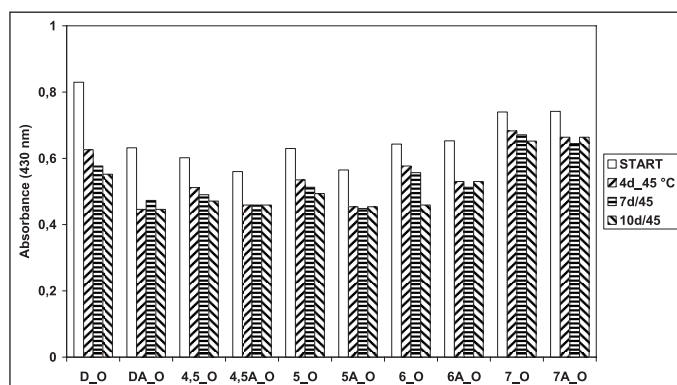


Obr. 8 / Fig. 8 Diferenční spektra vzorků čerstvě stočeného (C) 12% piva vybublávaného dusíkem (N) nebo vzduchem (O) a potom ozařovaného viditelným světlem po dobu 15 a 75 min / Differential spectra of fresh-bottled sample (C) of 12% beer bubbled through by nitrogen (N) or air (O) followed by exposure to visible light for 15 and 75 minutes.

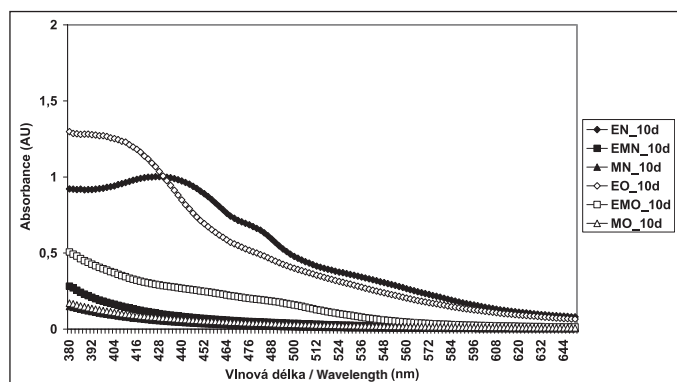
mg.l<sup>-1</sup>), odstranění kyslíku z poloviny vzorků vybubláním dusíkem (20 min) a po uzavření pryžovou zátkou se květy zahřívaly 90 min při 60 °C ve vodní lázni (pasterace). Po pasteraci se měřila absorbance těchto roztoků v průběhu uchovávání ve tmě při 45 °C (obr. 2).

#### 2.4.3 Redukce barevných látek piva kyselinou askorbovou

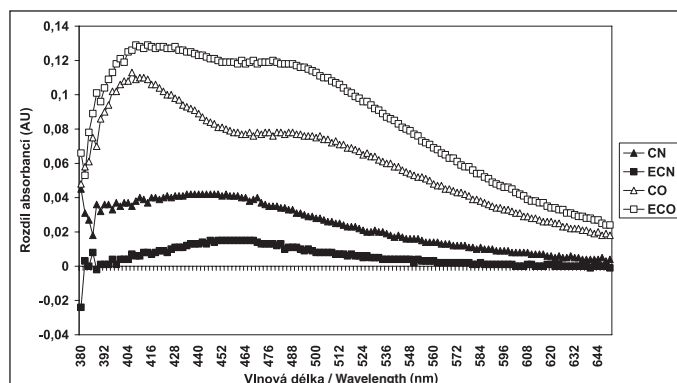
Nepasterované (čerstvě stočené) pivo po stočení a 1 rok staré pasterované pivo (skladované ve tmě při 20 °C) se dekarbonizovalo probubláváním dusíkem nebo vzduchem (20 min). Po přidavku kyseliny



Obr. 5 / Fig. 5 Změny barvy oxidovaných roztoků epikatechinu s přidavkem deionizované vody nebo ústojných roztoku (pH = 4,5–7) bez a s přidavkem kyseliny askorbové (100 mg.l<sup>-1</sup>) po zahřívání za aerobních podmínek (O) / Colour changes of oxidized solutions of epicatechin with addition of deionised water or buffer solutions (pH = 4.5-7) without and with addition of ascorbic acid (100 mg.l<sup>-1</sup>) after warming under aerobic conditions (O).



Obr. 7 / Fig. 7 Absorpční spektra roztoků epikatechinu (100 mg.l<sup>-1</sup>, E), maltosy (10 %, M) a jejich směsi (EM) vařených 2 h pod zpětným chladičem, ochlazených za přítomnosti vzduchu (O) nebo vybublávaných dusíkem (N) po 10 dnech při 45 °C / Absorption spectra of epicatechin solutions (100 mg.l<sup>-1</sup>, E), maltose (10 %, M) and their mixture (EM) boiled for 2 hours under reflux condenser, cooled down under oxygen presence (O) or bubbled through by nitrogen (N) after 10 days at 45 °C.



Obr. 9 / Fig. 9 Diferenční spektra vzorků čerstvě stočeného (C) 12% piva bez a s přidavkem (-)-epikatechinu (E), vybublávaného dusíkem (N) nebo vzduchem (O) a potom skladovaného 2 dny při 45 °C / Differential spectra of fresh-bottled sample (C) of 12% beer without and with addition of (-)-epicatechin (E), bubbled through by nitrogen (N) or air (O) and then stored for 2 days at 45 °C.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Flavonoid substances are a group of polyphenols present in malts, hops and beers. Their important parts are catechins that are oxidised to colour substances during the production process being accompanied by polymerisation. Colour products (e.g. quinones) are also formed by the oxidation of single polyphenols such as phenolic acids.

An important role in the oxidation of polyphenol substances play the metals being present in water, together with their higher pH va-

askorbové (100 mg.l<sup>-1</sup>) se vzorky piva plnily do válcovitých skleněných nádobek. Z poloviny nádobek se odstranil vzduch probubláváním dusíkem (20 min) a po uzavření pryžovou zátkou se kyvety zahřívaly 90 min při 60 °C ve vodní lázni (pasterace). Po pasteraci se měřila absorbance těchto roztoků v průběhu jejich uchovávání ve tmě při 45 °C (obr. 3).

#### 2.4.4 Změna barvy oxidačních produktů epikatechinu vlivem pH a redukčního prostředí

Roztoky barevných oxidačních produktů epikatechinu, připravených podle prvního odstavce postupů, se smísily s deionizovanou vodou nebo fosfátovými ústojnými roztoky v poměru 1:1 s přídavkem kyseliny askorbové (100 mg.l<sup>-1</sup>) a bez něj. Z poloviny vzorků se odstranil kyslík vybubláním dusíkem a po uzavření pryžovou zátkou se měřila absorbance v průběhu uchovávání těchto vzorků ve tmě při 45 °C (obr. 4, 5).

#### 2.4.5 Tvorba barevných oxidačních produktů epikatechinu vařením v roztoku maltosy

Ve vodovodní vodě se rozpustil epikatechin (100 mg.l<sup>-1</sup>) nebo maltosa (10 % hm.), popř. směs obou látek, a roztoky se vařily za přítupu vzduchu 2 h pod zpětným chladičem. Po ochlazení se roztoky pipetovaly do válcovitých skleněných nádobek. Z poloviny vzorků se odstranil kyslík vybubláním dusíkem a po uzavření pryžovou zátkou se měřila absorbance v průběhu uchovávání těchto vzorků ve tmě při 45 °C (obr. 6, 7).

#### 2.4.6 Změny absorbance po ozáření barevných produktů epikatechinu viditelným světlem

Nepasterované 12% pivo se dekarbonizovalo probubláváním dusíkem nebo vzduchem (20 min) a pivo se ozařovalo 15 a 75 min dvěma halogenovými žárovkami (2x50 W). Po ozáření se změnila absorpční spektra obou vzorků, vypočetla a zobrazila diferenční spektra jako rozdíl absorbancí mezi neozářeným a ozářeným vzorkem (obr. 8).

#### 2.4.7 Vliv epikatechinu na změny barvy piva při skladování

K pivu zbavenému oxidu uhličitého vybubláním dusíkem nebo vzduchem (20 min) se za stálého míchání rozpustil (-)-epikatechin v předaném množství 100 mg.l<sup>-1</sup>. Po jeho rozpuštění se piva skladovala 2 dny při 45 °C a zaznamenala se diferenční spektra (obr. 9). Přirozený obsah epikatechinu v použitém pivu před jeho přídavkem se nestavoval vzhledem k nedostupnosti potřebných technik, je možné však předpokládat, že byl výrazně nižší, jak o tom svědčí literární údaje, které jsou silně závislé na použité metodice.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Flavonoidní látky tvoří část polyfenolů přítomných ve sladu, chmelu i pivu. Jejich důležitou složkou jsou katechiny, které se v průběhu výroby oxidují na barevné sloučeniny, což je většinou doprovázeno polymerací. Barevné produkty (např. chinony) také vznikají oxidací jednoduchých polyfenolů, např. fenolových kyselin.

Významný vliv na oxidaci polyfenolových látek mají kovy přítomné ve vodě, spolu s jejím vyšším pH proti pivu a přítomností ústojných látek. Pro zvolené pokusy se volily deionizovaná i vodovodní voda, aby se jednoduchým způsobem prokázal rozdíl mezi reakcemi změn barevných složek v přirozeném prostředí a v deionizované vodě.

Jako modelový polyfenol se zvolil (-)-epikatechin, který se vyskytuje v surovinách pro výrobu piva a na rozdíl od (+)-katechinu poskytuje intenzivnější zabarvené oxidační produkty. Tato látka je zejména vhodná pro studium neenzymových oxidací, protože polyfenoloxidasu sladu epikatechin neoxidují [11].

Barevné změny epikatechinu jsou dobře patrné na obr. 1, přičemž tvorba barevných produktů oxidace epikatechinu byla velmi nízká v deionizované vodě i za přítupu kyslíku, ale výrazně vzrostla ve vodovodní vodě, v přítomnosti kyslíku a iontů Fe<sup>2+</sup> a Cu<sup>2+</sup> v katalytickém množství 0,1 mg.l<sup>-1</sup>. Ve vodovodní vodě se kromě přítomnosti kovů uplatňuje rovněž jejich vzájemný poměr, vyšší pH a ústojná kapacita. Barva těchto oxidačních produktů byla žlutá, oranžová až žlutočervená, typické hnědé zbarvení se při relativně krátkých dobách stárnutí nezasazovalo. Podle literatury látky vznikající oxidací katechinu vykazují typické absorpční maximum v rozmezí 420–430 nm [12].

Absorbance všech vzorků vybubláných dusíkem byly při všech vlnových délkách menší než 0,01 AU (nezobrazeno). Tato pozorování jsou v naprosté shodě s dosud získanými poznatky o změnách barvy během výroby a stárnutí piva. Při rmutování a ohřevu sladiny s chmellem k varu se polyfenolové barevné sloučeniny tvoří kromě toho také enzymovou oxidací.

lue compared with the one of beer and the presence of buffer substances. For the experiments carried out, deionised as well as tap water was used to prove in a simple way the difference the reactions of the changes of colour substances under natural conditions and deionised water.

(-)-Epicatechin was used as a model polyphenol occurring in the raw materials for beer production and in contrast to (+)-catechin it provides more intensively coloured oxidation products. This substance is especially suitable for the studies of non-enzymatic oxidation processes, since malt polyphenoloxidases do not oxidise epicatechin [11].

The colour changes of epicatechin are well obvious from Fig. 1, whereas the formation of colour oxidation products of epicatechin was very low in deionised water also in the presence of oxygen, but it was significantly higher in tap water, in the presence of oxygen and Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions in a catalytic amount of 0.1 mg.l<sup>-1</sup>.

Besides the metals being present in tap water, also their mutual ratio, higher pH and buffer capacity play a role. The colour of these oxidation products was yellow, orange to yellow-red, typical brown coloration was not observed at relatively short ageing periods. As it can be found in the literature, the substances formed by the oxidation of catechin show their typical absorption maximum in a range of 420–430 nm [12].

The absorbances of all samples bubbled through by nitrogen were lower than 0.01 AU at all wavelengths (not shown). These observations are in full compliance with the pieces of knowledge about the colour changes during beer production and ageing gained up to now. During the mashing process and warming up the wort with hops to the boiling point, the polyphenol colour substances are furthermore formed also by enzymatic oxidation.

The colour substances formed fulfil further functions during beer production. They can partly discolour depending on the pH value and the reducing capacity of the solution and change its colour again in the presence of oxygen. This idea was supported by the changes of colour substances formed by the oxidation of epicatechin during ageing, but their colour was further decreasing in model experiments during long-term warming up at 45 °C. The reducing capacity was established by using ascorbic acid (0–1000 mg.l<sup>-1</sup>) (Fig. 2).

The initial increase in the absorbance of the oxidation products of epicatechin under aerobic as well as anaerobic conditions can be explained by the transformation of still colourless epicatechin into colour intermediates, which are then reduced under anaerobic conditions in the presence of ascorbic acid. After the initial decrease in absorbance in the presence of oxygen, the colour intensity was increasing again in the solutions with a higher concentration of ascorbic acid, which can give evidence of its fast oxidation by oxygen in the presence of polyphenols.

A similar experiment with fresh and old pasteurised beer samples proved a slightly different behaviour properties, since the beer samples permanently increased their colour intensity during ageing, especially in the presence of oxygen and even in the presence of ascorbic acid (Fig. 3). The reducing effect of ascorbic acid was more evident with long-term stored (old) beer samples. By adding ascorbic acid, the pH value of the model solutions of the oxidation products of epicatechin changed, too, since the highest final concentration of ascorbic acid (1000 mg.l<sup>-1</sup>) in tap water reduced the pH value to 4.5.

For the above-mentioned reason, a phosphate buffer solution in a ratio 1:1 with the addition of ascorbic acid (100 mg.l<sup>-1</sup>) and without it was added to the solutions of the oxidation products of epicatechin (Fig. 4 and 5). As found in the literature, the pH value has a significant effect also on the course of the enzymatic oxidation of a similar compound (+)-catechin, from which colour products were formed mainly at a higher pH value [13].

Based on these results, the beer colour is dependent on the amount of colour oxidation products of catechins, on their pH value and the presence of reducing substances. The presence of ascorbic acid can induce the formation of colour substances from (+)-catechin in the presence of oxygen [4, 14]. For this reason, colour changes were studied during boiling of originally colourless epicatechin solutions with the addition of maltose, for reductones can be formed during boiling (Fig. 6 and 7).

When boiling model solutions of epicatechin and maltose, epicatechin solutions showed the highest colour intensity, solutions of epicatechin with maltose or the solution of maltose itself showed substantially lower colour intensity. In a real boiling process, the colour intensity further increases by the formation of melanoid substances, but this study did not deal with them. Moreover, the colour of maltose solutions was partially increased by caramelization reactions.

Vzniklé barevné látky plní v průběhu výroby piva další funkce. Mohou se alespoň částečně odbarvovat v závislosti na pH a redukční síle roztoku, a opět zabarvovat v přítomnosti kyslíku. Těto představy odpovídaly změnám barevných sloučenin vzniklých oxidací epikatechinu při stárnutí, ale v modelových pokusech jejich barva dále klesala při dlouhodobém zahřívání při 45 °C. Redukční prostředí se zajistilo přidáním kyseliny askorbové (0–1000 mg.l<sup>-1</sup>) (obr. 2).

Počáteční nárůst absorbance oxidačních produktů epikatechinu v aerobním i anaerobním prostředí lze vysvětlit přeměnou dosud bezbarvého epikatechinu na následně barevné meziproducty, které se pak v anaerobním prostředí redukuje za přítomnosti kyseliny askorbové. Za přítomnosti vzduchu po počátečním poklesu absorbance barva opět rostla v roztocích s vyšší koncentrací kyseliny askorbové, což může svědčit o její rychlé oxidaci kyslíkem za přítomnosti polyfenolů.

Podobný pokus s čerstvým a starým pasterovaným pivem prokázal poněkud odlišný vzor chování, neboť piva zvyšovala trvale barvu při stárnutí, zejména v přítomnosti kyslíku, a to i za přítomnosti kyseliny askorbové (obr. 3). Redukční účinek kyseliny askorbové se více projevil u dlouhodobě skladovaného (starého) piva.

Přidáním kyseliny askorbové se také měnilo pH modelových roztoků oxidačních produktů epikatechinu, protože nejvyšší výsledná koncentrace kyseliny askorbové (1000 mg.l<sup>-1</sup>) ve vodovodní vodě snížila pH na hodnotu 4,5. Proto se v dalším pokusu k roztokům oxidačních produktů epikatechinu přidal fosfátový ústojný roztok v poměru 1:1 s přidáním kyseliny askorbové (100 mg.l<sup>-1</sup>) a bez něj (obr. 4 a 5). Podle literatury má pH význačný vliv také na průběh enzymové oxidace podobné látky (+)-katechinu, z níž vznikaly barevné produkty hlavně při vyšším pH [13].

Podle těchto výsledků závisí barva piva na množství barevných oxidačních roztoků katechinů, na jejich pH a přítomnosti redukujících látek. Přítomnost kyseliny askorbové může za přístupu vzduchu indukovat tvorbu barevných látek z (+)-katechinu [4, 14]. Z tohoto důvodu se sledovaly změny barvy při vaření původně bezbarvých roztoků epikatechinu s přidáním maltosy, neboť z ní mohou v průběhu varu vznikat reduktory (obr. 6 a 7).

Při vaření modelových roztoků epikatechinu a maltosy se nejvíce zbarvily roztoky epikatechinu, podstatně méně roztoky epikatechinu s maltosou nebo roztok samotné maltosy. V skutečném varném procesu barva narůstá ještě tvorbou melanoidních látek, kterými se ale tato studie nezabývala. Kromě toho barva roztoků maltosy částečně rostla karamelizačními reakcemi.

Potlačení tvorby barvy epikatechinu lze přičítat vlivu reduktů, vzniklých rozkladem maltosy. Během stárnutí při 45 °C se nejvíce zvyšovala barva roztoku epikatechinu, vařeného s maltosou, zatímco barva samotných barevných produktů oxidace epikatechinu poněkud poklesla. Podle změny absorpčních spekter lze také usuzovat na další polymerační reakce. Přitom se také změnil původní tvar absorpčních křivek oxidačních produktů epikatechinu a vzájemná poloha těchto křivek u vzorků, skladovaných za přístupu, nebo nepřístupu vzduchu (obr. 7). Barva také mohla klesat degradací barevných produktů.

Podle těchto výsledků se barva roztoku, obsahujícího reduktory a oxidované polyfenoly může snižovat, nebo zvyšovat podle hodnoty jejich oxidačně redukčního potenciálu. Fragmenty rozkladu sacharidů mohou tvořit komplex s epikatechinem [15].

Nejbližší se typickému absorpčnímu spektru piva tvarem podobalo spektrum barevných produktů vzniklých z epikatechinu po reakci s maltosou. Během stárnutí klesá patrně koncentrace reduktů a obnovuje se zbarvení předtím redukovaných barevných produktů epikatechinu současně s poklesem redukční kapacity roztoku. Tyto reakce mohou probíhat v aerobním i anaerobním prostředí. Na stárnutí se tedy podílí přenos elektronů mezi oxidačními produkty polyfenolů a redukujícími látkami piva.

Podle dřívějších výsledků provází stárnutí piva počáteční pokles absorbance v oblasti blízké 380 nm, zatímco při delších vlnových délkách absorbance roste [16]. Absorpční spektrum mění svůj tvar, což se projeví změnou subjektivního vnímání barvy. Při vyšších teplotách skladování tento počáteční pokles mizí, absorbance roste v celém rozsahu vlnových délek a pivo získává nahnědlou barvu. Také toto pozorování je možné vysvětlit počáteční vratnou redukcí barevných produktů a nárůstem jejich zbarvení během stárnutí. Výrazný pokles barvy během kvašení a dokvašování piva souvisí s činností kvasničných reduktů a následný nárůst barvy s poklesem redukční schopnosti piva během stárnutí, popř. degradací a polymerací barevných produktů. Kvasinky také inhibovaly degradaci barevných produktů katechinu a epikatechinu [17].

Počáteční pokles absorbance lze pozorovat i při jeho ozařování ve viditelné oblasti (obr. 8). Změny absorpčního spektra piva je možné vysvětlit urychlením reakce mezi reduktory a barevnými polyfenoly,

The suppression of the formation of epicatechin colour can be attributed to the effect of reductones formed by the decomposition of maltose. During the ageing process at 45 °C, the highest increase in colour was observed for the epicatechin solution boiled with maltose, whereas the colour intensity of the colour products of epicatechin oxidation themselves slightly decreased.

Based on the change of the absorption spectra, further polymerisation reactions can also be assumed. Changes were also observed for the original shape of the absorption curves of the epicatechin oxidation products and the mutual position of these curves for samples stored in the presence of air or without it (Fig. 7). The colour could also have decreased by the degradation of colour products.

Based on these results, the colour of the solution containing reductones and oxidised polyphenols can decrease or increase depending on the value of their oxidation-reduction potential. The fragments of saccharide decomposition can form complexes with epicatechin [15]. Closest to the typical shape of the absorption spectrum of the beer sample was the spectrum of the colour products formed from epicatechin after the reaction with maltose. During the ageing process, the concentration of reductones decreases and the coloration of the previously reduced colour products of epicatechin is renewed, together with the decrease of the reducing capacity of the solution. These reactions can take place under aerobic as well as anaerobic conditions. The transfer of electrons between the oxidation products of polyphenols and reducing substances of beer take part in the ageing process.

According to previous results, the ageing process of beer is accompanied by the decrease of absorbance in a range close to 380 nm, while the absorbance increases with longer wavelengths [16]. The absorption spectrum changes its shape, which is evidenced by the change of the subjective appreciation of the colour. At higher storage temperatures, this initial decrease fades away, the absorbance increases within the whole range of wavelengths and the beer sample turns brownish.

This observation can also be explained by the initial reversible reduction of colour products and the decrease of their colour intensity during the ageing process. A significant decrease in colour during the fermentation and secondary fermentation stages is linked with the activity of brewer's yeast reductase and the following increase in colour intensity with the decrease of the reducing capacity of beer during the ageing process or in some cases by the degradation and polymerisation of the colour products contained. The yeasts also inhibited the degradation of the colour products of catechin and epicatechin [17].

The initial decrease in absorbance can also be observed when being exposed to the visible light (Fig. 8). The changes of the absorption spectrum of beer can be explained by the acceleration of the reaction between reductones and colour polyphenols, by polymerisation or degradation of colour products.

This decrease can also be observed at lower wavelengths below 380 nm as well as within the UV spectrum, when the degree of the decrease in colour intensity grows with the decreasing wavelength, which is probably linked with the increasing radiant energy with the increasing radiation frequency. On the other hand, the absorbance increases with the as the wavelength of radiation increases. These spectral changes can be observed during the natural ageing process after exposure or chemical oxidation by potassium peroxodisulphate [16, 18].

Nevertheless, the colour products formed by warming the epicatechin solution cannot be fully reduced back to the original colourless substances. The model of a partially reversible oxidation reaction between the oxidised products of polyphenols and reductones corresponds to this observation, with the following irreversible transformation:



where *OP* stands for oxidised polyphenols, *R* for reductones, *OR* for coloured oxidised reductones and *RP* for reduced polyphenols.

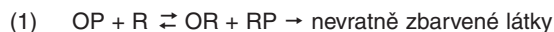
A partial reversible decomposition of reductones also corresponds to this idea, which can be observed for example with ascorbic acid providing a reversible oxidation product during oxidation, dehydroascorbic acid, further being transformed to irreversible products or to relatively low-molecular furfural or glyoxal [1, 19]. Their further reactions, in some cases combined with those with nitrogen compounds again provide brown products.

These reactions also include a partial reversibility, sing furfural, for example, can be easily reduced to furfuryl alcohol by the yeasts, but not already to the original complex substances. The irreversibility of this process thus lies in the transformation of the substances with



popř. polymerací, nebo degradací barevných produktů. Tento pokles je možné pozorovat i při nižších vlnových délkách pod 380 nm i v UV oblasti, přičemž stupeň poklesu barvy roste s klesající vlnovou délkou, což patrně souvisí s rostoucí energií záření při zvyšující se frekvenci záření. S rostoucí vlnovou délkou záření naopak absorbance vzrůstá. Tyto spektrální změny lze pozorovat v průběhu přirozeného stárnutí piva po ozáření nebo chemické oxidaci peroxodisíranem draselným [16, 18].

Přesto nelze barevné produkty vznikající zahříváním roztoku epikatechinu redukovat na původní bezbarvé sloučeniny úplně. Tomuto pozorování odpovídá model částečně vratné oxidační reakce mezi oxidovanými produkty polyfenolů a reduktory, s následující nevratnou přeměnou:



kde *OP* jsou oxidované polyfenoly, *R* jsou reduktory, *OR* barevné oxidované reduktory a *RP* jsou redukované polyfenoly. Těto představě také odpovídá částečně vratný rozklad reduktů, což lze pozorovat např. u kyseliny askorbové, poskytující při oxidaci vratný oxidační produkt, kyselinu dehydroaskorbovou, dále přecházející na nevratné produkty, např. až na relativně nízkomolekulární furfural nebo glyoxal [1, 19]. Jejich další reakce, popř. kombinované s reakcemi s dusíkatými látkami opět poskytují hnědé produkty.

Tyto reakce zahrnují i částečnou vratnost, neboť např. furfural lze snadno zredukovat kvasnicemi na furfurylalkohol, ale ne již na původní složité látky. Nevratnost procesu tedy spočívá v přeměně sloučenin s málo pravděpodobným uspořádáním na mnohem pravděpodobnější neuspořádané fragmenty. Tento samovolný proces tedy odpovídá nárůstu entropie během stárnutí.

Podobnému rozpadu podléhá i oxidačně-redukční pár redukováný/oxidovaný polyfenol, např. u známé jednoduché reakce



s podrobně prostudovaným průběhem, poskytujícím různé radikálové produkty spojené s jejich rekombinací za tvorby hnědých polymerních produktů.

V pivu se běžně vyskytující deriváty pyrokatechinu podléhají podobné reakci:



Oxidace katechinu také primárně poskytuje chinony [12]. Mezi oxidační reakce je nutné také zahrnout reakce s peroxidem vodíku, neboť látky piva vykazují oxidační i peroxidační aktivitu [20].

Význačným rysem všech těchto reakcí je skutečnost, že produkty vznikající oxidací reduktů a polyfenolů za přítomnosti kyslíku mohou podléhat samovolným změnám i v anaerobním prostředí, přičemž dodatečný přístup kyslíku zpravidla urychluje jejich průběh, zejména v přítomnosti iontů kovů Cu a Fe.

Takto se rozkládají jak reduktory, tak chinony, zejména při vyšší hodnotě pH. Rozpadem také vzniká mnoho organických radikálů různého typu, čímž se zvyšuje reaktivita jednotlivých složek a snižuje celková aktivací energie reakce. Volné radikály mohou vznikat rovněž vzájemnou reakcí chinonů a kyseliny askorbové [21, 22]. Tyto radikály mohou pak nevratně napadat další organické látky jako aminokyseliny, alkoholy a cukry a poskytovat další oxidačně-redukční páry.

Anaerobní stárnutí může probíhat jako částečně vratný katalyzovaný rozklad chinonů nebo oxidovaných polyfenolů na nevratné sloučeniny, zpravidla v podobě barevných pigmentů. Podobně mohou stárnout produkty rozpadu cukrů, vzniklé karamelizačními reakcemi.

Tento model potvrzuje ozařování roztoků barevných oxidačních produktů polyfenolů i melanoidních látek. Také u nich lze pozorovat pokles absorbance u nízkých vlnových délek záření následovaný postupným nárůstem absorbance. Částečný pokles absorbance systémů na začátku stárnutí lze zaznamenat i za tmy a silněji v přítomnosti světla [18].

Podobná pozorování se potvrdila sledováním barevných změn piva s přidaným epikatechinem při stárnutí piva za tmy. Za anaerobních podmínek přidávek epikatechinu v podstatně neměnil barvu roztoku, zatímco za aerobních podmínek barvu zvyšoval (obr. 9).

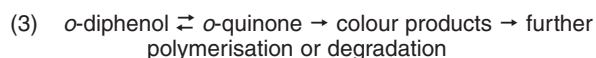
Popsané dílčí změny barvy piva odpovídají nalezeným závislostem, neboť barevné produkty, připravené např. vzdušnou oxidací *o*-pyrokatechinu, zvyšovaly intenzitu barvy modelového roztoku při jeho samovolném stárnutí za přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku, a to i v přítomnosti redukujících látek, jako jsou hydrogensířičitany, sířičitany a kyselina askorbová (nezobrazeno). Rovněž zde mohly redukující látky omezit tvorbu barevných produktů v samotném počátku, což ale nebylo možné zastavit v dalším průběhu stárnutí.

a hardly likely order to more likely disordered fragments. Thus, this spontaneous process corresponds to the increase in entropy during the ageing process. A similar decomposition can also be observed for the oxidation-reduction pair of reduced/oxidised polyphenol, e.g. in the following well known reaction:



with a detailed and well studied course, giving various radical products connected with their recombination providing brown polymeric products.

Catechol derivatives commonly present in beer are subject to a similar reaction:



The oxidation of catechin also primarily provides quinones [12]. Among oxidation reactions must be also included the reactions with hydrogen peroxide, since the substances of beer show both oxidation and peroxidation activity [20].

A distinctive feature of all of these reactions is the fact that the products being formed by the oxidation reductones and polyphenols in the presence of oxygen can be subject to spontaneous changes under anaerobic conditions, too, whereas additional presence of oxygen usually accelerates their course, especially in the presence of Cu and Fe.

Both reductones and quinones are decomposed in this way, especially at a higher pH value. During this process, a great number of organic radicals of various types is formed, which results in an increased activity of individual constituents and the total activation energy of the reaction decreases. Free radicals can also be formed by interactions of quinones and ascorbic acid [21, 22]. These radical then can irreversibly attack further organic substances such as amino acids, alcohols and sugars and provide further oxidation-reduction pairs.

Anaerobic ageing can take place as a partially reversible catalysed decomposition of quinones or oxidised polyphenols to irreversible substances, usually in the form of colour pigments. Similarly, products of the decomposition of sugars formed by caramelisation reactions can age.

This model is confirmed by exposing the solutions of colour oxidation products of polyphenols as well as melanoid substances to visible light. Also here, the decrease in absorbance at low wavelengths of exposure followed by a gradual increase in absorbance can be observed. A partial decrease in absorbance of the systems at the beginning of the ageing process can be noted also in a dark place and more strongly in the presence of light [18].

Similar observations were confirmed by studying colour changes of beer with the addition of epicatechin during the ageing process in a dark place. Under anaerobic conditions, the addition of epicatechin significantly did not change the colour of the solution, while it increased the colour under aerobic conditions (Fig. 9).

The partial changes of beer colour described correspond to the dependences found, since the colour products prepared for example by air oxidation of *o*-catechol increased the colour intensity of the model solution during its spontaneous ageing in the presence / without the presence of oxygen, even in the presence of reducing substances such as hydrogen sulphites, sulphites and ascorbic acid (not shown). Also here the reducing substances could restrict the formation of colour products at the very beginning, but this was not possible to be stopped in the further course of the ageing process.

The chemism itself of the transformations of flavonoids has not been explained in a satisfactory manner yet, with the exception of the initial phases of catechin changes. A one year long storage period at 20 °C led to a degree of degradation of 75 % of small flavonoids, with the colour intensity increasing in a dark place and more strongly at long-term exposure to visible light. During this process, colourless dehydrodicathechin B gave yellow-brown dimers and trimers of dehydrodicathechin A having strong antioxidation properties, which were decreasing with the time of ageing [23].

A more complicated course can be observed for the thermic decomposition of saccharides, since in contrast to polyphenolic substances, colour products can be formed in the presence of tap water by warming maltose solutions under anaerobic conditions even without previous oxidation.

For these substances, too, partial discoloration of solutions or, on the other hand, coloration dependences on anaerobic/aerobic conditions can be observed. Also in this case, their formation can be restricted by adding reducing substances, such as sodium hydrogen sulphite or ascorbic acid.

Samotný chemismus přeměn flavanoidů není ještě uspokojivě vysvětlen kromě počátečních stupňů při změnách katechinu. Jednorocní skladování piva při 20 °C vedlo přitom k 75% degradaci malých flavanoidů, přičemž intenzita barvy vzrůstala ve tmě a silněji při dlouhodobém ozáření. Přitom bezbarvý dehydrodikatechin B poskytoval žlutohnědé di- a trimery dehydrodikatechinu A, mající silné antioxidační vlastnosti, antioxidační vlastnosti však s dalším stárnutím klesaly [23].

Komplikovanější průběh má termický rozklad sacharidů, neboť na rozdíl od polyfenolických látek mohou v prostředí vodovodní vody vznikat barevné produkty zahříváním roztoků maltosy v anaerobních podmínkách i bez předchozí oxidace. Také u těchto látek lze pozorovat částečné odbarvování roztoků, nebo naopak zabarvování v závislosti na aerobních/anaerobních podmínkách. I v tomto případě je ale možné jejich tvorbu omezit přidávkem redukčních látek, jako je hydrosulfidit sodný nebo kyselina askorbová.

## ZÁVĚR

- Oxidací epikatechinu vznikají za přítomnosti kyslíku žlutá, oranžová a žlutočervená barviva s typickým maximem mezi 420 až 430 nm.
- Stupeň oxidační přeměny roste v přítomnosti kyslíku, iontů Fe i Cu a se zvyšujícím se pH roztoku.
- Vzniklá barviva se mohou částečně odbarvovat vlivem klesajícího pH i přítomnosti redukujících látek.
- Tato barviva mohou podléhat další polymeraci, popř. degradaci podle hodnot oxidačně-redukčního potenciálu.
- Další změny jednou vytvořených barevných oxidačních produktů mohou nastávat za anaerobních a aerobních podmínek, čímž se vysvětluje narůstání barvy piva i za nepřítomnosti kyslíku.
- Redukční látky piva nemohou tyto reakce zastavit, čemuž odpovídá model částečně vratné oxidačně-redukční reakce, následované nevratnými přeměnami oxidačních produktů.
- Změny oxidovaných reduktů i polyfenolů mají společné nevratné rysy v přeměně vysoce uspořádaných látek na neuspořádané.
- Redukce oxidovaných produktů polyfenolů i reduktů poskytují další reaktivní páry, často v radikálové formě, jako jsou radikály semichinonů a reduktů, které umožňují zvýšit pravděpodobnost dalších vzájemných reakcí a tvorby polymerních produktů.
- Tyto reakce jsou podobné redukci kyslíku, poskytující reaktivní radikály kyslíku, přičemž vyčerpání kyslíku nemůže zastavit stárnutí, protože další oxidačně-redukční páry vznikají rozpadem nebo redukcí složitějších organických sloučenin.
- Polyfenoly rovněž mohou působit jako přenašeče elektronů z organických látek piva na kyslík, nebo produkty vzniklé jejich oxidací.

Lektoroval Doc. Ing. Pavel Dostálék, CSc.  
Do redakce došlo 30. 10. 2007

## Literatura / References

- Velíšek, J.: Chemie potravin 3. 1. vyd., OSSIS, Tábor, 1999, ISBN 80-902391-5-3.
- Nøddekaer, T. V., Andersen, M. L.: Effects of Maillard and caramelization products on oxidative reactions in lager beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **65**, 2007 (1), 15–20.
- Kim, Y., Chung, J.E., Kurisawa, M., Uyama, H., Kobayashi, S.: Regioselective synthesis and structures of (+)-catechin-aldehyde polycondensates. *Macromol. Chem. Phys.* **204**, 2003 (15), 1863–1868.
- Labrousse, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Scollary, G. R.: Isomeric influence on the oxidative coloration of phenolic compounds in a model white wine: comparison of (+)-catechin a (-)-epicatechin. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2005 (26), 9993–9997.
- Pietta, P.: Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 2000 (7), 1035–1042.
- Savel, J.: Negative role of oxidised polyphenols and reductones in beer. *Monatsschr. Brauwiss.* **59**, 2006 (1/2), 30–37.
- Akagawa, M., Shigemitsu, T., Suyama, K.: Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under Quasi-physiological conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2003 (12), 2632–2640.
- Hashimoto, N., Eshima, T.: Composition and pathway of formation of stale aldehydes in bottled beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **35**, 1977, 145–150.
- Irwin, A. J., Barker, R. L., Pipasts, P.: The role of copper, oxygen and polyphenols in beer flavour instability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **49**, 1991, 140–149.

## CONCLUSION

- Yellow, orange and yellow-red colours with their typical absorbance maximum of 420 to 430 nm are formed by the oxidation of epicatechin in the presence of oxygen.
- The degree of oxidation transformation increases in the presence of oxygen, Fe and Cu ions and with the increasing pH value of the solution.
- The colour substances formed can partly discolour by decreasing pH value and in the presence of reducing substances.
- These colour substances can further polymerise or be degraded depending on the values of the oxidation-reduction potential.
- Further changes of the colour oxidation products once formed can take place under anaerobic as well as aerobic conditions, by which the increase in colour intensity also without the presence of oxygen can be explained.
- Reducing substances of beer cannot stop these reactions, which corresponds to the model of a partial reversible oxidation-reduction reaction, followed by irreversible changes of oxidation products.
- The changes of oxidised reductones and polyphenols have common irreversible characteristics in the transformation of highly ordered substances into disordered ones.
- The reduction of the oxidised products of polyphenols and reductones provide further reactive pairs, very often in radical forms, such as semiquinone and reductone radicals, which allow increasing the probability of further interactions and formation of polymeric products.
- These reactions are similar to oxygen reduction, providing reactive oxygen radicals, whereas the depletion of oxygen cannot stop the ageing process, since further oxidation-reduction pairs are formed by decomposition or reduction of more complex organic compounds.
- Further to this, polyphenols can act as the transfers of electrons from organic compounds of beer to oxygen or the products formed by their oxidation.

Translated by Ladislav Kábrt

- Bamforth, C. W.: The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assesment. *Brauwelt Int.* **17**, 1999 (2), 98–110.
- Huynh van, N., Jerumanis, J.: Study on the barley and malt polyphenoloxidase. II. Characterization of barley and steeped barley polyphenoloxidase. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **36**, 1978 (2), 81–86.
- Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F.: Kinetic analysis of catechin oxidation by polyphenol oxidase at neutral pH. *Biophem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 2004 (3), 902–910.
- Guyot, S., Cheynier, V., Souquet, J., Moutounet, M.: Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1995 (9), 2458–2462.
- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., Scollary, G. R.: Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2001 (2), 234–239.
- Totlandi, V. M., Peterson, D. G.: Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous Maillard systems: identification and structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2006 (19), 7311–7318.
- Savel, J.: Differential spectroscopy and beer oxidation. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **42**, 2005 (1), 57–64.
- Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M.: Yeast-induced inhibition of (+)-catechin a (-)-epicatechin degradation in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2002 (6), 1631–1635.
- Šavel, J., Zdvihalová, D., Prokopová, M.: Změny barvy při chemické a fotochemické oxidaci piva (Colour changes during chemical and photochemical beer oxidation). *Kvasny Prum.* **43**, 1997 (3), 67–70.
- Sánchez, B., Reverol, L., Gallindo-Castro, I., Bravo, A., Rangel-Aldao, R., Ramírez, J. L.: Brewer's yeast oxidoreductase with activity on Maillard reaction intermediates of beer. *Tech. Q. MBAA Commun.* **40**, 2003 (3), 204–212.
- Chapon, L., Chapon, S.: Peroxidatic step in oxidation of beers. *J. Am. Brew. Soc. Chem.* **37**, 1979 (2), 96–104.
- Pethig, R., Gaycoyne, P. R. C., McLaughlin, J. A., Szent-Gyorgyi, A.: Ascorbate-quinone interactions: Electrochemical, free radical, and cytotoxic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 1983 (1), 129–132.
- Isaacs, N. S., Eldik van, R.: A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 1465–1467.
- Callemien, D., Collin, S.: Polyphenol and colour stability through beer ageing. *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* **30**, 2007, 95/1 – 95/7.