

Vliv typu chmelové suroviny na antioxidační vlastnosti piva

Impact of Hop Raw Material Type on Antioxidant Behaviour of Beer

ALEXANDR MIKYŠKA, DANUŠA HAŠKOVÁ, TOMÁŠ HORÁK, MARIE JURKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2*

e-mail: mikyska@beerresearch.cz

Mikyška, A. – Hašková, D. – Horák, T. – Jurková, M.: Vliv typu chmelové suroviny na antioxidační vlastnosti piva. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 7–8, s. 294–302.

Pokusné celoskladové dekokční várky (200 l) 12% světlého ležáckého piva s jedním opakováním variant byly chmeleny škálou pěti chmelů od jemné aromatické odrůdy (ŽPČ) po odrůdu vysokoobsažnou (Magnum) a chmelový CO₂ extrakt. Antioxidační vlastnosti byly hodnoceny třemi metodami, RC-DCPI, ESR-DPPH a ESR-T150 (lag time). Senzorická stabilita byla hodnocena po tepelném stažení i tříměsíčním skladování. Množství chmelových antioxidantů, polyfenolů i volných fenolových látek dávkovaných při chmelení prudce klesalo od aromatických po vysokoobsažné odrůdy. Důležitý je poměr hořkých kyselin a polyfenolů ve chmelu. Piva chmelená ŽPČ obsahovala o 60 % více celkových polyfenolů a o 80 % více volných fenolových látek, zejména flavanoidů a flavonoidů v porovnání s nulovou variantou, chmelovým extraktem. Redukční schopnost ESR-DPPH mladiny a redukční schopnost pív ESR-DPPH i RC-DCPI významně závisela na chmelení, klesala od pív chmelených aromatickými chmelů po piva chmelená hořkými odrůdami. Pro piva chmelená ŽPČ byla stanovena hodnota o 38 % a pro Sládek o 27 % vyšší v porovnání s chmelovým extraktem. Hodnota antiradikálové aktivity ESR-T150 mladiny částečně závisela na chmelení, u mladiny chmelených odrůdami Žatecký červeňák, Sládek, Premiant a Agnus byla srovnatelná (T150 = 6,5–6,7), hodnota u várek chmelených chmelem Magnum (T150 = 7,5) a chmelovým extraktem (T150 = 9,5) byla méně příznivá. Obsah skupiny markerů karbonylových látek vznikajících z aminokyselin a vyšších alkoholů a rovněž tak obsah 2-furfuraldehydu ve starém pivu závisel na chmelení, to jest na redukční aktivitě (ESR-DPPH, RC-DCPI) a klesal od pív chmelených chmelovým extraktem po piva chmelená aromatickými odrůdami Žatecký červeňák a Sládek. Jednoznačný vliv na skupinu markerů karbonylů vznikajících z mastných kyselin nebyl prokázán. Senzorické stárnutí pív, ať již hodnocené zhoršením celkového subjektivního dojmu, nebo intenzitou oxidační, sklepní (zatuchlé) a staré chuti a vůně, bylo rychlejší u pív chmelených hořkými odrůdami chmele Agnus a Magnum či chmelovým extraktem v porovnání s pivy chmelenými odrůdami Žatecký červeňák, Sládek a Premiant. Pokusy prokázaly nezanebatelný vliv typu chmele, množství chmelových antioxidantů na antioxidační vlastnosti a zpomalení senzorického stárnutí pív.

Mikyška, A. – Hašková, D. – Horák, T. – Jurková, M.: Impact of hop raw material type on antioxidant behaviour of beer. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 7–8, p. 294–302.

Trial all malt decoction brews (200 L) of 12% pale lager beer were hopped by a series of five hops from fine aroma variety (Saaz hops) to high-alpha variety and CO₂ hop extract. Antioxidant properties were assessed by three methods, RC-DCPI, ESR-DPPH a ESR-T150 (lag time). Sensorial stability was assessed after heat ageing and three months' storage. The amount of hop antioxidants, polyphenols and free phenol compounds supplied by hopping strongly dropped from the aroma to the high-alpha variety. An important factor is the bitter acids/polyphenols ratio in hops. Beer hopped by Saaz hops contained 60 % more total polyphenols and 80 % more free phenolics, flavonoids and flavanoids in comparison with the zero variant, i.e. hop extract. ESR-DPPH reducing power of worts and both ESR-DPPH and RC-DCPI reducing power of beers significantly depended on hopping, decreasing from beers hopped by aroma hops to beers hopped by bitter varieties. In comparison with beers hopped by hop extract, beers hopped by Saaz hops showed a 38 % higher value, those hopped with Sládek a 27 % higher value. Antiradical activity ESR-T150 value of worts depended partially on hopping, and was comparable in worts hopped by Saaz hops, Sládek, Premiant and Agnus varieties (T150 = 6.5–6.7). The value for brews hopped by Magnum variety (T150 = 7.5) and by hop extract (T150 = 9.5) was less satisfactory. The content of a group of markers of carbonyl compounds formed from amino acids and higher alcohols, as well as 2-furfuraldehyde content in aged beer depended on hopping, i.e. on reducing activity (ESR-DPPH, RC-DCPI), and decreased from beers hopped by hop extract to beers hopped by aroma varieties Saaz hops and Sládek. Explicit influence of hopping on a group of carbonyl markers formed from fatty acids was not proved. Sensory aging of beers, rated either by deterioration of the overall impression or by intensity of oxidized, moldy (musty) and stale flavour, was faster for beers hopped by bitter hop varieties Agnus and Magnum or hop extract than for beers hopped by Saaz hops, Sládek and Premiant. The experiments proved a significant effect of the type of hop and amounts of hop antioxidants on antioxidant properties and a slowing down of beer sensory aging.

Mikyška, A. – Hašková, D. – Horák, T. – Jurková, M.: Der Einfluss des Typs von Hopfenrohstoffe auf die antioxidative Eigenschaften des Bieres. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 7–8, S. 294–302.

Die Gesamtmalzproben (200 Liter) für die Lagerhellbierherstellung (Stammwürze 12%), mit einer Wiederholung wurden mit einer Scala von fünf verschiedenen Hopfen von einer feinaromatischen Saazer halbfrühen Rotenhopfen (ŽPČ) bis zu der hochhaltigen Hopfensorte (Magnum) und CO₂ Hopfenextrakt. Die Antioxidations-eigenschaften wurden mittels drei Methoden RC-DCPI, ESR-DPPH a ESR-T150 (lag time) ausgewertet. Die sensorische Stabilität wurde nach der Wärmalterungsbehandlung und nach der Lagerung des Bieres von drei Monaten festgestellt. Die Menge an Hopfenantioxidants, -Polyphenols und freien Phenolstoffen, die während der Hopfenzugabe dosiert wurden, nahm von feinen aromatischen halbfrühen Rotenhopfensorte (ŽPČ) bis zu den hochhaltigen Hopfensorten sehr schnell ab. Wichtig war das Verhältnis von Bitterstoffen zum Gehalt an Polyphenol im Hopfen. Die Biere, die durch mit feinem aromatischen Saazer halbfrüh Rotenhopfen (ŽPČ) gehopft wurden, wiesen im Vergleich mit der Nullvariante (das durch Hopfenextrakt gehopftem Bier) an gesamten Polyphenolen um 60% Prozent mehr und an gesamten freien Polyphenols um 80% mehr, insbesondere an Flavanoiden auf. Die Reduktionsfähigkeit ESR-DPPH von den Würzen und Reduktionsfähigkeit ESR-DPPH vom Bier und RC-DCPI war abhängig von der Hopfensorte, diese Fähigkeit nahm von den Bieren, gehopften mit feinem aromatischen Saazer halbfrüh Rotenhopfen (ŽPČ) bis zu den Bieren gehopften mit hochhaltigen Hopfensorten ab. Für Biere, die mit feinem Hopfen (ŽPČ) gehopft wurden, wurde ein Wert um 38% höher und für die mit der Hopfensorte Sládek gehopftes Bier der Wert um 27% höher als für das Bier, das mit Hopfenextrakt gehopft wurde. Der Wert an Antiradikalwürzeaktivität ESR – T150 hingte teilweise von der Hopfensortezugabe ab, diese Aktivitäten von den mit Hopfensorten Saazer halbfrüh Rotenhopfen (ŽPČ), Sládek, Premiant und Agnus gehopften Würzen wurden vergleichbar, bei der durch Hopfensorte Magnum gehopften Würze wurde (T150 = 7,5) und die Würze mit dem Hopfenextrakt wies die wenig günstigere Aktivität (T150 = 9,5) auf. Der Gehalt an Markersgruppe von aus den Aminosäuren und höheren Alkohols entstehenden Karbonyl Stoffen und der Gehalt an 2-Furfuraldehyd in den alten Bieren hingte von der Hopfenzugabe, d.h. von der Reduktionsaktivität (ESR-DPPH, RC-DCPI) ab, die höchste Aktivität wurde bei der durch Hopfenextrakt gehopften Würze und die niedrigste ist bei der mit feinem aromatischen Saazer Halbfrührothopfen (ŽPČ) gehopften Würze gewesen. Ein eindeutiger Einfluss auf die aus den Fettsäuren entstehenden Marker´s Gruppe von Karbonylen wurde jedoch nicht nachgewiesen. Die durch Verschlechterung des gesamten subjektiv

tiven Eindrucks oder durch die Intensität des Oxidations-, Kellers (Muffig)-, Altengeschmacks und Geruches ausgewertete sensorische Bieralterung war bei den mit hochhaltigen Hopfensorten oder mit Hopfenextrakt gehopften Bieren schneller als bei den Bieren die mit Hopfensorten feinem aromatischen Saazer halbbrüh Rotenthopfen (ŽPČ), Sládek und Premiant gehopft wurden. Die Versuche haben einen erheblichen Einfluss des Hopfentyps, der Menge an Hopfenoxidants auf die Bierantioxidationsseigenschaften und auf die Minderung der sensorischen Alterung des Bieres nachgewiesen.

Klíčová slova: *antioxidanty, antiradikálová aktivita, chmel, polyfenoly, pivo, senzorická stabilita*

Key words: *antioxidants, antiradical activity, hops, polyphenols, beer, sensorial stability*

1 ÚVOD

Polyfenolové látky, cukerné reduktory, melanoidiny a v průběhu kvašení tvořený oxid siřičitý jsou bezesporu nejdůležitějšími přírodními antioxidanty (reduktory) působícími při výrobě a skladování piva. Hlavními antioxidanty ve chmelu jsou polyfenolové a fenolové látky, slabá redukční schopnost byla prokázána i u hořkých kyselin [1]. Obsah celkových polyfenolů ve chmelu je přibližně 2 až 6 % hm. a závisí na odrůdě chmele [1–3]. Polyfenolové látky chmele ovlivňují antioxidační aktivitu piva a tím potenciálně i senzorickou stabilitu piva [4–6]. Senzorické stárnutí piva je způsobeno oxidačními změnami. Karbonylové látky staré chuti jsou tvořeny v řetězci radikálových reakcí, kde vznikají působením aktivních forem kyslíku na některé látky, jako jsou mastné kyseliny, aminokyseliny, vyšší alkoholy a sacharidy [7]. Průběh reakcí závisí na redukčním potenciálu reagujících látek v řetězci reakcí, některé polyfenoly mohou proto v některých reakcích být i prooxidanty [8].

Polyfenoly mohou působit třemi mechanismy [9]:

1. Jako lapáče kyslíkových volných radikálů, reaktivních forem kyslíku (ROS).
2. Jako inhibitory lipoxygenas, katalyzujících oxidaci mastných kyselin.
3. Jako chelatační činidlo omezující přenos kovových iontů, katalyzátorů oxidačních reakcí (železo, měď).

Někteří autoři usuzují, že zpomalení nežádoucích procesů v průběhu skladování piva je ovlivněno zejména oxidem siřičitým tvořeným při kvašení a význam polyfenolových a cukerných antioxidantů je podstatně menší [10–14]. Jiní autoři našli jasné závislosti mezi antioxidačními vlastnostmi pivovarských surovin, piva a tvorbou karbonylů staré chuti i senzorickou stabilitou piva [4–6, 15–18]. Na rozdíl od sladu má pro hodnocení polyfenolových antioxidantů ve chmelu zásadní význam poměr obsahu α -hořkých kyselin a polyfenolů.

Pro hodnocení redukční (antioxidační, antiradikálové) schopnosti je používána řada chemických metod založených na redukci specifického činidla. Každá z metod stanovuje poněkud odlišné spektrum antioxidantů v závislosti na hodnotě redukčního potenciálu činidla. Použili jsme tři v pivovarství často citované a používané metody, stanovení pomocí 2,6-dichlorofenolindofenolu (RK-DCPI), stanovení pomocí volného radikálu 1,1-difenylnitroxylu (ESR-DPPH) a stanovení endogenní antiradikálové kapacity (ESR-lag time, ESR T150). Redukční kapacita RK-DCPI (redukční potenciál -0,67 V) zahrnuje zejména cukerné reduktory a melanoidiny. Redukční aktivita ESR-DPPH (redukční potenciál -1,2 V) zahrnuje zejména pomalu redukující látky, především polyfenoly. Stanovení endogenní antiradikálové kapacity piv, hodnoty lag-time postihuje především redukční schopnost oxidu siřičitého (siřičitanů) [9, 10, 19, 20, 21]. Důvodem je pH piva. Nakamura et al. [13] našli při pH = 7 antiradikálovou aktivitu proti hydroxylovému a superoxidovému radikálu jak u siřičitanu, tak téměř u všech testovaných polyfenolů a fenolových kyselin. Při pH = 4,3 měl tuto antiradikálovou aktivitu pouze siřičitan.

Cílem této studie bylo přinést více poznatků o dopadu chmelu rozdílnými typy chmelových odrůd na obsah polyfenolů a volných fenolových látek, antioxidační aktivitu a tvorbu karbonylových látek ve skladovaném pivu.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Poloprovozní varní pokusy

Byly provedeny varní pokusy na zařízení s objemem horké mladiny 240 l, ve kterých bylo připraveno šest variant várek 12% světlého ležáku s opakováním. Sladina byla vyrobená dvourmutovým dekokčním postupem ze sladu odrůdy Tolar.

Várky byly chmeleny 100 % testované suroviny, chmelových pelet (P90) z pěti rozdílných odrůd – Žatecký červeňák (jemná hořká od-

1 INTRODUCTION

Polyphenol compounds, sugar reductons, melanoidins and sulphure dioxide formed in the course of fermentation are without question the most important natural antioxidants (reductons) acting by a production and a storage of beer. The main antioxidants in hops are polyphenolic and phenolic substances, the weak reducing ability was demonstrated even in bitter acids [1]. Content of total polyphenols in hops is approximately 2–6 % w. and depends on the variety of hops [1–3]. Polyphenolic substances in hops affect the antioxidant activity of beer, and thus potentially sensory stability of beer [4–6]. Sensory aging of beer is caused by oxidative modifications. Carbonyl substances of stale flavour are formed in the chain of radical reactions, where are created by active oxygen species action on certain substances such as fatty acids, amino acids, higher alcohols and carbohydrates [7]. Reaction path depends on the reducing potential of reactive substances in the chain reaction. Some polyphenols may therefore be prooxidants in some reactions [8].

Polyphenols can act via three mechanisms [9]:

1. As traps for oxygen free radicals, reactive oxygen species (ROS).
2. Inhibitors of lipoxigenas, catalyzing the oxidation of fatty acids.
3. As a chelating agent, limiting the transfer of metal ions, oxidation reactions of catalysts (iron, copper).

Some authors conclude that the slowdown undesirable process during beer storage is particularly affected by sulfur dioxide formed during fermentation and the importance of polyphenol antioxidants and sugar is much smaller [10–14]. Other authors found a clear dependence between the antioxidant properties of brewing raw materials and beer and stale flavour carbonyls forming and sensory stability of beer [4–6, 15–18]. Unlike malt for evaluation of polyphenol antioxidants in hops is fundamental ratio of α -bitter acids and polyphenols.

Many chemical methods based on reducing of specific reagent are used for the evaluation of reducing (antioxidant, antiradical) capability. Each method determines a somewhat different spectrum of antioxidants, depending on the value of the reducing potential of agents. We used three in the brewing industry often cited and used methods of determination, assay using 2,6-dichlorophenol indofenol (RC-DCPI), assay using free radical 1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl (ESR-DPPH) and determination of endogenous antiradical capacity (ESR-lag time, ESR T150). Reducing capacity of the EC-DCPI (reducing potential -0.67 V) includes, in particular sugar reductons and melanoidins. Reducing capacity of the ESR-DPPH (reducing potential -1.2 V) includes, in particular slowly reducing substances, especially polyphenols. Determination of endogenous antiradical capacity of beers, the value of the lag-time, mainly affects reducing ability of the sulphure dioxide (sulphite) [9, 10, 19, 20, 21]. The reason is the pH of beer. Nakamura et al. [13] found at pH = 7 antiradical activity against hydroxyl and superoxid radical as the sulphite, and almost all tested polyphenols and phenolic acids. At pH = 4.3 was the only sulfite antiradical activity found out.

The aim of this study was to generate more knowledge about the impact of hopping by different types of hop varieties on polyphenols and free phenolic compounds content, antioxidant activity and the formation of carbonyl compounds in stored beer.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Pilot brewing trials

Brewing experiments were performed on equipment with hot wort volume 240 L, in which options have been prepared, batches of 12% pale lager beer with repetition. Wort was produced by two mash decoction process of malting barley variety Tolar.

Brews were hopped by 100% of testing raw materials, hop pellets (P90) of five different varieties – Saaz hops (fine aroma variety),

růda), Sládek (aromatická odrůda), Premiant (jemná hořká odrůda), Agnus (hořká odrůda), Magnum (vysokoobsažná odrůda) a chmelovým CO₂ extraktem z odrůdy Agnus. Chmelovar trval 90 min, dávka chmele byla 10,0 g α -kyselin na 1 hl sladiny. Pelety byly aplikovány ve třech dávkách: 20 % 10 min po zavaření, 60 % po 30 min varu a 20 % 20 min před koncem chmelovaru. Chmelový extrakt byl aplikován v první dávce. Hořkost piv se pohybovala v rozmezí 27 až 32 j.h.

Hlavní kvašení proběhlo v cylindrických tancích (CKT). Mladiny byly po odkalení v sedimentační nádobě a zchlazení provzdušněny na obsah rozpuštěného kyslíku 8–9 mg/l a zakvašeny dávkou 210 g/hl lisovaných násadních kvasnic kmene č. 95 sbírky VÚPS. Teplota hlavního kvašení byla nastavena na 9,5 °C \pm 0,1 °C. Po prokvašení 60 % zdanlivého extraktu bylo mladé pivo sudováno. Ke konci hlavního kvašení byla snižována teplota rychlostí 1,5 °C / 24 h na 5 °C, při níž bylo mladé pivo sudováno do ležáckých tanků. Dokvašování při teplotě 1 až 2 °C trvalo 40 dní. Piva byla stočena do lahví na plniči s dvojitou evakuací pod ochrannou atmosférou oxidu uhličitého. Stočené pivo bylo pasterováno na úroveň 20 PU.

2.2 Analýzy chmele a piva

Běžné analýzy chmele, sladin, mladín a piv včetně stanovení celkových polyfenolů byly provedeny podle Analytiky EBC [22], obsah anthokyanogenů byl analyzován postupem podle Pivovarsko-sladařské analytiky [23]. Antioxidační vlastnosti byly hodnoceny třemi metodami. Stanovením redukční kapacity s 2,6-dichlofenolindofenolem (RK-DCPI) spektrofotometrickou metodou podle analytiky MEBAK [24] (mladina, pivo), stanovením redukční aktivity pomocí volného radikálu 1,1-difeny-2-pikryl hydrazylu (ESR-DPPH) (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) metodami vypracovanými na VÚPS [19,20] (chmel, mladina, pivo) a endogenní antiradikálové kapacity piv (ESR-lag-time), chmelů a mladín (ESR-T 150) metodou publikovanou Ushidou et al [25, 26]. Dělení a stanovení volných fenolových látek (gallová kyselina, protocatechová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, eskulin, 4-hydroxyfenylacetová kyselina, vanilová kyselina, catechin, chlorogenová kyselina, kávová kyselina, syringová kyselina, vanilin, salicylová kyselina, p-kumarová kyselina, umbelliferon, skopoletin, epikatechin, ferulová kyselina, sinapová kyselina, 4-hydroxykumarin, rutin, kvercetin-3-arabinosid, naringin, myricetin, kvercetin, apigenin) bylo provedeno metodou HPLC s CoulArray detektorem [27]. Obsah polyfenolů ve chmelu a stejně tak antioxidační vlastnosti chmelů byly stanoveny v extraktech chmelové suroviny vroucí vodou podle postupů popsaných dříve [19].

Karbonylové látky (12 markerů – 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, benzaldehyd, fenylacetaldehyd, (E)-2-nonenal, (E)-2-oktenal, (E)-butenal, hexanal, heptanal, oktanal, 2-furfural) byly v čerstvém pivu, tepelně stařeném pivu a tři měsíce skladovaném pivu stanoveny plynovou chromatografií [28, 29]. Senzorická stabilita připravených piv byla testována jak zrychleným stařením piv při teplotě 45 °C po dobu šesti dnů, tak skladováním lahvého piva v laboratoři v přepravech při teplotě 20 °C, tedy za podmínek blízkých

Sládek (aroma variety), Premiant (fine bitter variety), Agnus (bitter variety), Magnum (high-alpha variety) and CO₂ hop extract variety Agnus. Wort boiling lasted 90 min, hops dose was 10.0 g of α -acids per 1 hl of wort. Pellets were applied in three doses: 20 % 10 min. after the start of boiling, 60 % after 30 min. of wort boil and 20 % 20 min. before the end of the wort boiling. Hop extract was applied in the first dose. Bitterness of beers ranged from 27–32 BU.

The main fermentation was carried out in cylinder – conical tanks (CCT). Wort were after chill removing in the sedimentation tank and aeration on dissolved oxygen level 8–9 mg/L inoculated by a dose of 210 g/hl pitching pressed yeast of strain No. 95 RIBM collections. The temperature of fermentation was set at 9.5 °C \pm 0.1 °C. After fermentation 60 % of the apparent extract was green beer transferred into lager tanks. At the end of fermentation the temperature was lowered, rate was 1.5 °C/24 hours at 5 °C, in which the young beer was pumped in lager tanks. The secondary fermentation at the temperature of 1–2 °C lasted 40 days. Beer was bottled in the filler with double evacuation under a protective atmosphere of carbon dioxide. Bottled beer was pasteurized at the level of 20 PU.

2.2 Hop and beer analyses

Routine analysis of hops, malt, wort and beer, including the determination of total polyphenols were performed according to Analytica EBC [22], anthocyanogens content was analyzed according to Pivovarsko-sladařská analytika [23]. Antioxidant properties were evaluated by three methods. Determination of reducing capacity with 2,6-dichlorophenol indophenol (RC-DCPI) by spectrophotometric method according to Analytica MEBAK [24] (wort, beer), determination of reducing activity by free radical 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl (ESR-DPPH) by methods developed at RIBM [19,20] (hops, wort, beer) and endogenous antiradical capacity of beers (ESR-lag-time), hops and wort (ESR T-150) using method published by Ushida et al [25,26]. Separation and identification of free phenolic compounds (Gallic acid, Protocatechuic acid, p-Hydroxybenzoic acid, Esculin, 4-Hydroxyphenylacetic acid, Vanillic acid, Catechin, Chlorogenic acid, Caffeic acid, Gentisic acid, Syringic acid, Vanillin, Salicylic acid, Coumaric acid, Umbelliferon, Scopoletin, Epicatechin, Ferulic acid, Sinapic acid, 4-Hydroxycoumarin, Rutin, Quercetin-3-arabinoside, Naringin, Myricetin, Quercetin, Apigenin) was performed by HPLC coupled with CoulArray detector [27]. Content of polyphenols in hops, as well as antioxidant properties of hops were determined in extracts of hops raw material with boiling water according to procedures described previously [19].

Carbonyl substances (12 markers: 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, benzaldehyde, phenylacetaldehyde, (E)-2-nonenal, (E)-2-oktenal, (E)-butenal, hexanal, heptanal, octanal, 2-furfural) were in fresh beer, heat forced aged beer and three months stored beer determined by gas chromatography [28,29]. Sensory stability of beer prepared was tested as an accelerated aging of beer at 45 °C for six days, and storage of bottled beer in crates in the laboratory at 20 °C, ie under conditions close to conditions at retail out-

Tab. 1 Výsledky rozboru chmelových surovin / Results of hop raw material analyses

Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
Alfa-kyseliny / Alpha-acids (%)	3.9	4.5	7.6	12.1	16.1	48.0
Celkové polyfenoly / Total polyphenols (mg/g)	55.2	28.6	32.2	23.8	24.4	1.4
Anthokyanogeny / Anthocyanogens (mg/g)	28.6	12.1	13.7	9.8	12.7	1.7
Volné fenolové látky / Free phenolic compounds (mg/g)	6.4	2.7	3.3	3	2.3	0.2
ESR-DPPH* (% rel.)	83	47	57	52	54	2
ESR-T150*	1.98	2.12	2.52	2.88	3.05	0.10

ŽPČ: Žatecký červeňák / Saaz hops AGN: Agnus
SLA: Sládek MAG: Magnum
PRE: Premiant E-CO2: chmelový extrakt / hop extract
SW: Sladina / Sweet wort * ve výluhu 5 g/l

Tab. 2 Volné fenolové látky chmelů (ve výluhu 5 g/l) / Free phenolic compounds of hops (in water extract 5 g/l)

Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
A – Flavanoidy / Flavanoids (mg/l)	20.4	5.1	6.5	6.5	2.3	0.0
B – Flavonoidy / Flavonoids (mg/l)	5.22	3.03	3.1	2.88	2.91	0.33
C – Hydroxy skořicové kyseliny / Hydroxy cinnamic acids (mg/l)	2.1	1.17	0.91	0.86	0.79	0
D – Hydroxybenzoové kyseliny / Hydroxy benzoic acids (mg/l)	0.54	0.96	2.84	1.2	0.64	0

podmínkách v obchodní síti. Senzorická analýza čerstvého piva, zrychleně stařeného piva a piva po 3 měsících skladování byla provedena devítičlennou degustační komisí VÚPS deskriptivní metodou a stanovením celkového dojmu [30].

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Chmel

Škála typů odrůd chmele byla zvolena s cílem pokrýt celé spektrum od jemné aromatické odrůdy (ŽPČ) po vysokoobsažnou odrůdu (Magnum) a chmelový CO₂ extrakt. Výrazně nejvyšší obsah celkových polyfenolů, anthokyanogenů i sumy volných fenolových látek byl stanoven v Žateckém červeňáku. Rozdíly mezi dalšími odrůdami byly podstatně menší (tab. 1). Rozdíly mezi chmelů byly nalezeny i v obsahu různých skupin volných fenolových látek. Nejvyšší obsah látek ze skupiny flavanoidů (catechin, epicatechin) i flavonoidů (rutin, kvercetin, kvercetin-3-arabinosid, myricetin) byl stanoven pro Žatecký červeňák. Obsah flavanoidů a flavonoidů u českých odrůd Sládek, Premiant a Agnus byl podobný, u odrůdy Magnum bylo stanoven výrazně nižší množství flavanoidů. Chmel odrůdy Premiant měl relativně vysoký obsah látek ze skupiny hydroxyskořicových kyselin (chlorogenová kyselina, kávová kyselina, kumarová kyselina, ferulová kyselina, sinapová kyselina). Chmelový extrakt obsahoval řádově nižší množství volných fenolových látek oproti peletám (tabulka 2). Názory na význam volných fenolů jako antioxidantů se různí, jedním z důvodů mohou být i metody stanovení redukční aktivity použité při experimentech. Pascoe et al. [31] zjistili, že 45–61 % rozdílů mezi výsledky metod ABTS a FRAP závisí na obsahu ferulové, vanilové a chlorogenové kyseliny a catechinu. Walters et al. [16,17] ve varních pokusech s přidávkou catechinu a ferulové kyseliny prokázali vliv těchto látek na antioxidační aktivitu a senzoričnou stabilitu piva, Goiris et al. [32] zjistili zlepšení senzoričké stability piv po aplikaci extraktu chmelových polyfenolů s významným podílem volných fenolových látek ve varně.

Redukční aktivita ESR-DPPH chmelů reflektovala rozdílný obsah polyfenolových látek ve chmelech. Výrazně nejvyšší hodnota byla stanovena pro Žatecký červeňák (ESR-DPPH = 83 %), vzorky ostatních odrůd se navzájem odlišovaly méně (ESR-DPPH = 47–57 %), zanedbatelná hodnota byla nalezena pro chmelový extrakt (tab. 2). Antiradikálová aktivita ESR-T150 mírně klesala od Žateckého červeňáku po chmel Magnum, u kterého byla naměřena nejvyšší, nejhorší hodnota. Reakční kinetika stanovení ESR-T150 chmele se liší od stanovení ve sladině či mladině (obr. 1). Ve sladině obsah termicky generovaných volných radikálů v průběhu stanovení stoupá. Ve výluhu chmele vroucí vodou, ve kterém jsou přítomny prakticky jen polyfenoly a hořké látky, po počátečním nárůstu obsah volných radikálů klesá působením „lapačů“ volných radikálů. Atypický průběh mělo stanovení ESR-T150 chmelového CO₂ extraktu, signál volných radikálů byl od počátku do konce měření nízký, na limitu detekce.

Pro hodnocení chmelů z hlediska obsahu antioxidantů je zásadní poměr obsahu těchto látek a obsahu hořkých kyselin ve chmelu. Na obrázku 2 je znázorněna hmotnostní bilance polyfenolů při chmelování testovanými typy chmelů. Množství chmelových polyfenolů dávovaných při chmelování Žateckým červeňákem je srovnatelné s ob-

lets. Sensory analysis of fresh beer, forced aged beer and beer after 3 months of storage was performed by nine-member panel of trained tasters of the RIBM by the use of descriptive method and determination of the overall impression [30].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Hops

Range of different types of hop varieties were chosen to cover the entire spectrum from fine aroma varieties (Saaz hops) to high-alpha variety (Magnum) and CO₂ hop extract. Significantly highest content of total polyphenols, anthocyanogens and the sum of free phenolics was determined in Saaz hops. Differences among the other varieties were significantly smaller (Tab. 1). Differences between the hops were found in the content of the various groups of free phenolics. The highest content of substances from the group of flavanoids (catechin, epicatechin) and flavonoids (rutin, quercetin, quercetin-3-arabinosid, myricetin) was determined for Saaz hops. Content of flavanoids and flavonoids in the Czech varieties Sladek, Premiant and Agnus were similar in the variety Magnum was determined much lower quantities of flavanoids. Hop variety Premiant had a relatively high content of substances from the group of hydroxycinnamic acids (chlorogenic acid, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid). Hop extract contained much lower amounts of free phenolics in comparison with hop pellets (Tab. 2). Views on the importance of free phenols as antioxidants vary; one reason may be the method of determining reducing activities used in the experiments. Pascoe et al. [31] found that 45–61% of the difference between the results of the ABTS and FRAP methods depends on the content of ferulic, chlorogenic and vanilic acids and catechin. Walters et al. [16, 17] in the brewing experiments with additions of catechin and ferulic acid showed the influence of these substances on the antioxidant activity and sensory stability of beer, Goiris et al. [32] found improved sensory stability of beer extract after addition of hop polyphenols extract with a significant proportion of free phenolic compounds in the brewhouse.

Reducing activity ESR-DPPH of hop reflects the different content of polyphenol compounds in hops. Significantly the highest value was accessed for Saaz hops (ESR-DPPH = 83 %), samples of other varieties are mutually differed less (ESR-DPPH = 47–57 %), marginal value was found for the hop extract (Tab. 2). Antiradical activity, ESR-T150 decreased slightly from the Saaz hops to Magnum hops, in which was measured the highest, the worst value. Reaction kinetics of the ESR-T150 determination of hop is different from the determination of sweet wort or wort (Fig. 1). Content of thermally generated free radicals in the wort increases in the course of ESR-T150 determination. In boiling water extract of hops, in which are present practically polyphenols and bitter substances after the initial increase free radicals content decreases by the action of “traps” of free radicals. Atypical course had determination ESR-T150 of CO₂ hop extract. The signal of free radicals from the beginning to the end of the measurement was low, on the detection limit.

For the evaluation of hops in terms of content of antioxidants ratio of these substances content and the contents of bitter acids in hops is essential. Fig. 2 shows the mass balance of hop polyphenols in the

Tab. 3 Výsledky rozboru mladiny / Results of hopped wort analyses

Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
Celkové polyfenoly / Total polyphenols (mg/l)	252	206	153	160	160	141
Anthokyanogeny/ Anthocyanogens (mg/l)	54.6	55.7	51.9	41.2	37.6	33.1
Volné fenolové látky / Free phenolic compounds (mg/l)	35.6	36.1	25.8	28.5	23.5	19.6
ESR-DPPH (%)	95	84	77	76	70	69
RK-DCPI (%)	70	75	73	77	73	72
ESR-T150	6.6	6.8	6.5	6.7	7.5	9.50

Tab. 4 Volné fenolové látky v mladině / Free phenolic compounds in hopped wort

Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
A – Flavanoidy / Flavanoids (mg/l)	15.4	13.2	10.4	9.8	6.4	7.8
B – Flavanoidy / Flavonoids (mg/l)	9.2	8.8	2.5	4.1	0.3	0.5
C – Hydroxy skořicové kyseliny / Hydroxy cinnamic acids (mg/l)	6.1	6.3	6.1	8.4	8.8	6.2
D – Hydroxybenzoové kyseliny / Hydroxy benzoic acids (mg/l)	1.6	2.7	4.2	2.5	1.8	1.4

sahem sladových polyfenolů ve sladince, přídavek chmelových polyfenolů prudce klesá od aromatických odrůd po vysokoobsažné odrůdy a při chmelení chmelovým CO₂ extraktem je přídavek polyfenolů zanedbatelný.

3.2 Mladina a pivo

V průběhu chmelovaru se část chmelových a sladových polyfenolů vyloučí z roztoku ve formě kalů, třísloproteinových komplexů. Obsah celkových polyfenolů, anthokyanogenů a volných fenolových látek v mladince klesá od várek chmelených Žateckým červeňákem po chmelení chmelovým extraktem (tab. 3). Procentické zvýšení obsahu polyfenolových látek aplikací testovaných typů chmelů v porovnání s nulovou variantou, chmelením chmelovým CO₂ extraktem dokumentuje obr. 3. Obsah celkových polyfenolů a sumy volných fenolových látek byl u varianty chmelené ŽPČ o 80 % vyšší. Závislost na typu chmele byla patrná u skupin flavanoidů a flavonoidů, obsah látek ze skupin skořicové a p-hydroxybenzoové kyseliny na chmelení nezávisel (tab. 4). Deriváty skořicové kyseliny (ferulová, kumarová, chlorogenová, sinapová kyselina) se vyskytují především ve sladu.

Redukční aktivita ESR-DPPH mladiny (tab. 3) klesala od Žateckého červeňáku (ESR-DPPH = 95 %) po várky chmelené chmelovým extraktem (ESR-DPPH = 69 %). Hodnota ESR-DPPH byla u varianty chmelené ŽPČ o 38 %, u varianty chmelené odrůdou Sládek o 22 % vyšší v porovnání s nulovou variantou (obr. 3). Redukční aktivita mladiny silně korelovala s obsahem celkových polyfenolů ($r = 0,906$, $n = 12$), slaběji s obsahem anthokyanogenů ($r = 0,718$, $n = 12$). Z volných fenolových látek s hodnotou ESR-DPPH silně koreloval obsah flavanoidů a flavonoidů ($r = 0,925$, $r = 0,887$, $n = 12$). Průkazné korelace nebyly nalezeny pro skupinu látek odvozených od skořicové ($r = 0,478$) hydroxybenzoové kyseliny ($r = 0,019$). Antiradikálová aktivita ESR-T150 várek chmelených chmelů Žatecký červeňák, Sládek, Premiant a Agnus byla srovnatelná (T150 = 6,5–6,7), hodnota u várek chmelených chmelem Magnum (T150 = 7,5) a chmelovým extraktem byla méně příznivá (T150 = 9,5). Rozdíl mezi variantou chmelenou ŽPČ a nulovou variantou byl 30 %. Redukční kapacita DCPI nejevila žádnou závislost na chmelení.

K dalšímu snížení obsahu polyfenolových látek dochází při zrání piva. Vyloučeny jsou hlavně zákalotvorné polyfenoly ze skupiny anthokyanogenů. Obsah celkových polyfenolů, anthokyanogenů a volných fenolových látek klesá od várek chmelených Žateckým červeňákem po várky chmelené chmelovým extraktem, piva chmelená aromatickými odrůdami Žatecký červeňák a Sládek obsahovala výrazně vyšší množství těchto látek v porovnání s pivem chmeleným chmelovým extraktem (tab. 5, obr. 4).

Stanovení redukční aktivity ESR-DPPH piva ukázalo významnou závislost tohoto parametru na chmelení, hodnota ESR-DPPH klesala od Žateckého červeňáku po piva chmelená chmelovým extraktem (tabulka 5). Pro Žatecký červeňák byla stanovena hodnota o 38 % a pro Sládek o 27 % vyšší v porovnání s chmelovým extraktem (obr. 4). Redukční aktivita ESR-DPPH piva korelovala s obsahem polyfenolů (Celkové polyfenoly $r = 0,961$, $n = 12$). Slabý trend k obdobnému poklesu měla hodnota redukční kapacity RK-DCPI. Hodnoty ESR-DPPH a RC-DCPI vzájemně korelovaly ($r = 0,796$). Žádný trend ve vztahu ke chmelení nebyl zjištěn pro endogenní antiradikálovou kapacitu

tested types of hops. Dosed quantity of hop polyphenols in Saaz hop is comparable with the malt content of polyphenols in wort, the addition of hop polyphenols decreases intensely from aromatic varieties to high-alpha varieties of hops and addition of polyphenols with CO₂ hop extract is negligible.

3.2 Worts and beers

In the course of wort boiling the part of hop and malt polyphenols is eliminated from the solution in the form of break, tannin-protein complexes. Content of total polyphenols, anthocyanogens and free phenolic compounds in worts decreased from brews hopped by Saaz hops hop to hopping by the hop extract (Tab. 3). Percentage increases in the polyphenolic compounds content by applications of tested types of hops compared to the zero variant, hopping by CO₂ hop extract are documented in Fig. 3. Content of total polyphenols and total free phenolics was for variant hopped by Saaz hops in 80 % higher. Depending on the type of hops was evident in groups of flavanoids and flavonoids, content of substances in groups of cinnamic and p-hydroxybenzoic acid did not depend on the hopping (Tab. 4). Derivatives of cinnamic acid (ferulic, coumaric, chlorogenic, sinapic acid) are found mainly in the malt.

Reducing activity ESR-DPPH of wort (Tab. 3) decreased from Saaz hops (ESR-DPPH = 95 %) to brews hopped by the extract (ESR-DPPH = 69 %). The value of ESR-DPPH was in variant hopped with Saaz hops 38% higher, in variant hopped by Sládek 22% higher compared with the zero variant (Fig. 3). Reducing activity of wort strongly correlated with the total polyphenol content ($r = 0,906$, $n = 12$), weaker with the anthocyanogens ($r = 0,718$, $n = 12$). From the free phenolic compounds content of flavanoids and flavonoids strongly correlated with a value of ESR-DPPH ($r = 0,925$, $r = 0,887$, $n = 12$). Conclusive correlations have been not found for a group of substances derived from cinnamic acid ($r = 0,478$) and hydroxybenzoic acid ($r = 0,019$). Antiradical activity ESR-T150 of brews hopped by Saaz hops, Sládek, Premiant and Agnus was comparable (T150 = 6.5 to 6.7), the value of brews hopped by Magnum hops (T150 = 7.5) and the extract was less favorable (T150 = 9.5). The difference between Saaz hop and zero variant was 30%. Reducing capacity DCPI showed no dependence on the hopping.

To further reduce of the content of polyphenolic substances occur in the maturation of beer. Haze-active polyphenols from the group of anthocyanogens are mostly excluded. Content of total polyphenols, and anthocyanogens free phenolics decreased from brews hopped by Saaz hops to the brew hopped by extract, beer hopped by aroma varieties Saaz hops and Sládek contained significantly higher levels of these substances compared with beer hopped by hop extract (Tab. 5, Fig. 4).

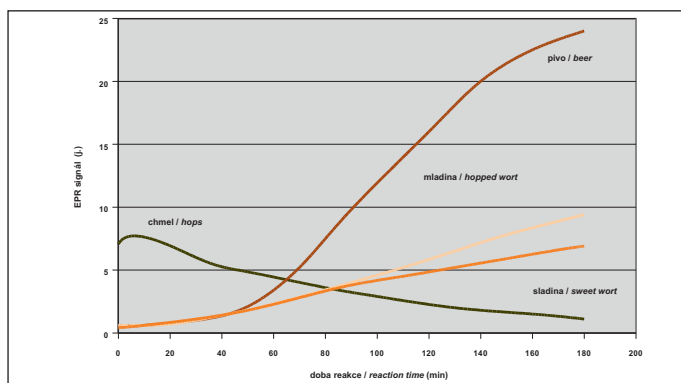
Determination of the ESR-DPPH reducing activity of beers showed a significant dependence of the hopping parameter, the value of ESR-DPPH decreased from Saaz hops to beer hopped by hop extract (Tab. 5). The value 38 % higher for Saaz hops and 27 % higher for Sládek was determined compared with the hop extract (Fig. 4). Reducing activity ESR-DPPH of beers correlated with polyphenol content (total polyphenols $r = 0,961$, $n = 12$). Weak trend to a similar decrease in value should the reducing capacity of RC-DCPI. The values

Tab. 5 Výsledky rozboru pív / Results of beer analyses

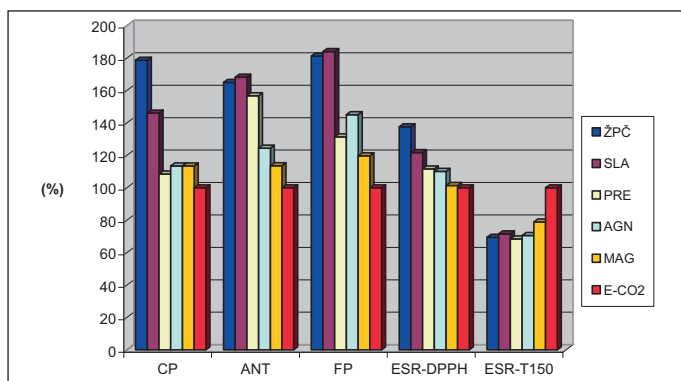
Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
Celkové polyfenoly / Total polyphenols (mg/l)	210	189	151	142	131	130
Anthokyanogeny / Anthocyanogens (mg/l)	38.1	32	33.7	32.2	31.7	31.1
Volné fenolové látky / Free phenolic compounds (mg/l)	46.0	34.4	28.9	29.1	20.6	25.4
ESR-DPPH (%)	76	70	60	58	50	55
RK-DCPI (%)	83	86	81	81	77	77
ESR lag-time (min)	13	20	13	37	10	20
Oxid siřičitý (mg/l) / Sulphur dioxide	0.7	1.4	1.8	3.7	0.4	1.8

Tab. 6 Volné fenolové látky v pív / Free phenolic compounds in beer

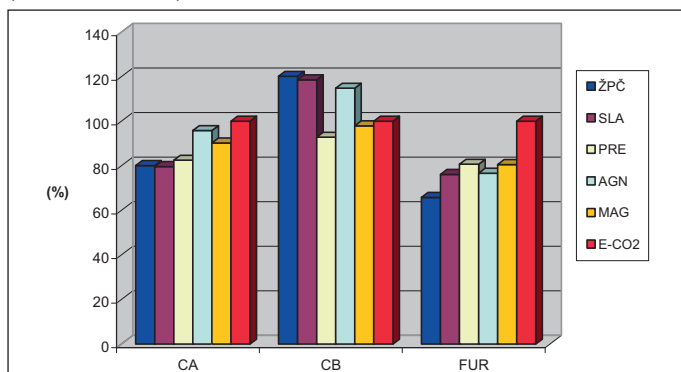
Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
A – Flavanoidy / Flavanoids (mg/l)	15.4	15.2	9.6	10.5	8.4	5.9
B – Flavonoidy / Flavonoids (mg/l)	7.9	6.7	5.0	3.0	2.6	0.4
C – Hydroxy skořicové kyseliny / Hydroxy cinnamic acids (mg/l)	16.2	11.3	11.9	12.5	5.6	8.3
D – Hydroxybenzoové kyseliny / Hydroxy benzoic acids (mg/l)	3.4	3.2	1.5	2.1	2.1	1.9



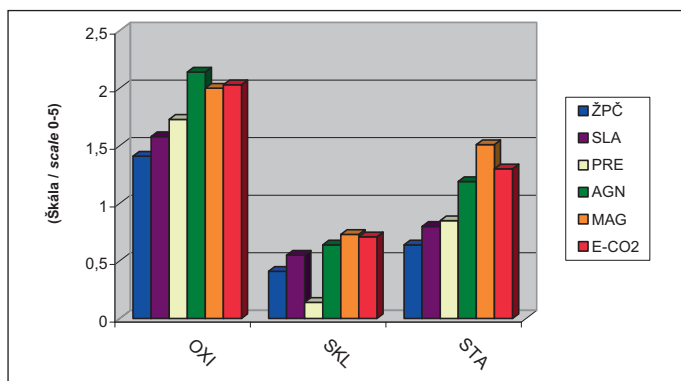
Obr. 1 Reakční kinetika stanovení ESR-T150 / Fig. 1 Reaction kinetics of ESR-T150 assessment



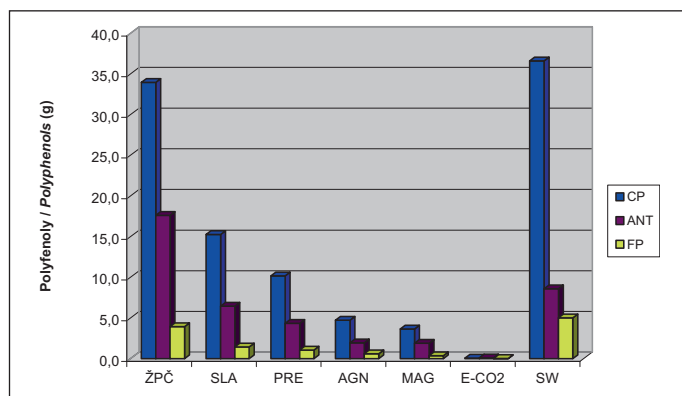
Obr. 3 Rozdíly v obsahu polyfenolů a redukční aktivita v mladině / Fig. 3 Differences in polyphenols and reducing activity in hopped wort (E-CO2 = 100 %)



Obr. 5 Porovnání obsahu karbonylů v urychleně stařených pivech / Fig. 5 Comparison of carbonyls content in force-aged beer (E-CO2 = 100 %) CA: Karbonyly A – 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, benzaldehyd, fenylnacetaldehyd / Carbonyls A – 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, benzaldehyde, phenylacetaldehyde; CB: Karbonyly B – (E)-2-nonenal, (E)-2-oktenal, (E)-butenal, hexanal, heptanal, oktanal / Carbonyls B – (E)-2-nonenal, (E)-2-oktenal, (E)-butenal, hexanal, heptanal, oktanal; FUR: 2-Furfuraldehyd / 2-Furfuraldehyde

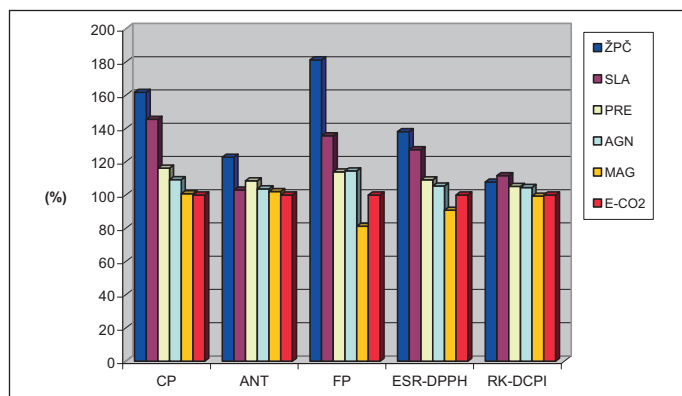


Obr. 7 Senzorická kvalita urychleně stařených piv (vybrané parametry, škála 0-5) / Fig. 7 Sensory stability of beers (selected descriptors, scale 0-5) OXI – Oxidovaná / Oxidized, SKL – Sklepní – zatuchlá / moldy – musty, STA – Stará / Stale

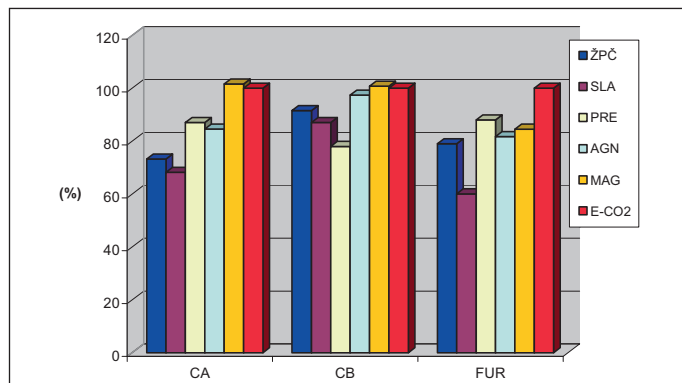


Obr. 2 Bilance množství polyfenolů ve chmelu na várku a ve sladince (g) / Fig. 2 Balance of polyphenols content in a hop dose of a brew and in a sweet wort (g)

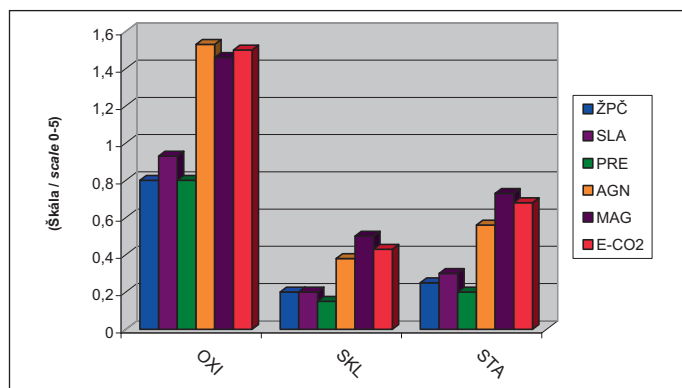
CP – Celkové polyfenoly / Total polyphenols; ANT – Anthokyanogeny / Anthocyanogens; FP – Volné fenolové látky / Free phenolic compounds; ŽPČ – Žatecký červeňák / Saaz hops; SLA – Sládek; PRE – Premiant; AGN – Agnus; MAG – Magnum; E-CO2 – Chmelový extrakt / Hop extract; SW – Sladina / Sweet wort



Obr. 4 Rozdíly v obsahu polyfenolů a redukční aktivita v pivech / Fig. 4 Differences in polyphenols and reducing activity in beer (E-CO2 = 100 %)



Obr. 6 Porovnání obsahu karbonylů v pivech po 3 měsících skladování / Fig. 6 Comparison of carbonyls content in beers after 3 months storage (E-CO2 = 100 %)



Obr. 8 Senzorická kvalita 3 měsíce skladovaných piv (vybrané parametry, škála 0-5) / Fig. 8 Sensory stability of 3 months stored beers (selected descriptors, scale 0-5)

ESR – lag time. Hodnota lag time je závislá kromě jiného na obsahu oxidu siřičitého v pivu, což bylo potvrzeno i v těchto pokusných várkách ($r = 0,842$). Oxid siřičitý vzniká v průběhu kvašení, jeho tvorba je závislá především na kmenu kvasinek a jejich fyziologickém stavu. Obsah oxidu siřičitého v pokusných pivech byl relativně nízký (0,7–3,7 mg/l) a kolísá.

3.3 Senzorická stabilita pív

Pokusná piva byla připravena z odrůd chmele velmi odlišných v poměru α - a β -hořkých kyselin i množství a složení chmelových silic. V senzorickém profilu pív se tak mohl projevit i vliv těchto faktorů. Senzorická stabilita pív byla proto chemicky hodnocena na základě rozdílů v obsahu markerů karbonylových látek ve skladovaných pivech a pivech tepelně stařených. Senzorické hodnocení stability pív bylo provedeno na základě stanovení vybraných cizích chutí a vůní v pivu – oxidační, staré, sklepní/zatuchlé a zhoršení celkového subjektivního dojmu.

Karbonylové látky, které jsou přítomny v pivu a dále se tvoří nebo uvolňují ze senzoricky neaktivních komplexů s oxidem siřičitým v průběhu skladování piva, jsou pokládány za hlavní příčinu senzorického stárnutí piva. Pro hodnocení surovinových a technologických vlivů na tvorbu karbonylů a senzorické stárnutí jsme již dříve rozdělili stanovené markery karbonylů staré chuti podle příslušných prekurzorů. Do skupiny Karbonyly A – „karbonyly z aminokyselin a vyšších alkoholů“ byly zařazeny 2-metylpropanal, 2-metylbutanal, 3-metylbutanal, benzaldehyd a fenylacetaldehyd. Do skupiny Karbonyly B – „karbonyly z mastných kyselin“ byly zařazeny aldehydy vznikající z nenasycených – (E)2-nonenal, (E)2-oktenal, (E)2-butenal a nasycených – hexanal, heptanal, oktanal mastných kyselin. Prekurzorem 2-furfuralu jsou sacharidy, tento marker je indikátorem tepelné zátěže. Pro většinu jmenovaných markerů nejnověji potvrdili jejich vztah k senzorické stabilitě Maffliet et al. [33].

Obsah markerů karbonylových látek skupiny A ve zrychleně stařeném pivu i pivu po 3 měsících skladování klesal od pív chmelených CO_2 extraktem po piva chmelená aromatickými odrůdami. Ve skladovaných pivech z odrůd Žatecký červeňák a Sládek byl obsah karbonylů A o přibližně 30 % nižší v porovnání s nulovou variantou (obr. 5, 6). Obsah karbonylů skupiny B jeví obdobný, ale slabší trend k poklesu u skladovaných pív, pro tepelně stařená piva byl trend opačný. Vliv chmelení, chmelových antioxidantů na potlačení tvorby 2-furfuraldehydu byl zjištěn jak u tepelně stařených, tak i skladovaných pív.

Zhoršení celkového subjektivního dojmu u skladovaných i tepelně stařených pív bylo větší pro varianty chmelené hořkými odrůdami chmele a chmelovým extraktem (tab. 7). Rovněž tak se v závislosti na chmelení zvyšovala intenzita tří hodnocených cizích vůní a chutí. U tepelně stařených pív bylo nalezeno poměrně plynulé zvýšení intenzity oxidační, staré a sklepní chuti a vůně v řadě pív od chmelení Žateckým červeňákem po piva chmelená chmelovým extraktem (obr. 7). U skladovaných pív se vydělily dvě skupiny, piva chmelená odrůdami Žatecký červeňák, Sládek, Premiant a piva chmelená odrůdami Agnus, Magnum a chmelovým extraktem. Hodnoty stanovené pro druhou skupinu byly přibližně dvojnásobné (obr. 8).

of ESR-DPPH and RC-PCPI cross correlated ($r = 0.796$). No trend in relation to the hopping was found for endogenous antiradical capacity ESR – lag time. The value of the lag time is dependent, inter alia, on the sulfur dioxide content in beer, which was confirmed in these experimental brews ($r = 0.842$). Sulphure dioxide is produced in the course of fermentation; its formation is mainly dependent on the strain of yeast and their physiological state. Sulfur dioxide content in the experimental beers was relatively low (0.7 to 3.7 mg/l) and fluctuated.

3.3 Sensorial stability

Experimental beers were prepared from hop varieties a very different in the ratio of α - and β -bitter acids, the quantity and composition of hop oils. So the influence of these factors could show impact in the sensory profile of beers. Sensory stability of beer was therefore chemical assessed on the base of differences in the content of markers of carbonyl compounds in stored beers and heat aged beers. Sensory evaluation of the stability of beer was made on the basis of the determination of selected off-flavors in beer – oxidized, moldy-musty and stale and deterioration of overall subjective impression.

Carbonyl substances which are present in beer and then formed or released from sensory inactive complexes with sulphure dioxide during storage of beer are considered the main cause of sensory aging beer. For the evaluation of raw material and technological influences on carbonyls forming and sensory aging, we have previously divided the accessed carbonyls markers of stale flavor according to their precursors. The group of carbonyls A – “carbonyls of amino acids and higher alcohols,” were included 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, benzaldehyde and phenylacetaldehyde. To the carbonyl group B – “carbonyls of fatty acids” have been included aldehydes arising from unsaturated – (E) 2-nonenal, (E) 2-oktenal, (E) 2-butenal and saturated – hexanal, heptanal, octanal fatty acids. Precursors of 2-furfural are carbohydrates, this marker is an indicator of heat charge. For the most appointed markers recently confirm their relationship to physiological stability Maffliet et al. [33].

The content of carbonyl markers compounds of group A in forced aged beer and beer after 3 months of storage decreased from beers hopped by CO_2 extract to beers hopped by aroma hop varieties. The content of carbonyls in stored beers from varieties Saaz hops and Sládek was about 30 % lower compared with the zero variant (Fig. 5, 6). Content of carbonyl group B appeared to be similar, but weaker trend to a decrease in stored beer, the opposite trend was in heat-aged beer. Effect of hopping, hop antioxidants to inhibition the formation of 2-furfuraldehyde was detected in both heat aged and stored beers.

Deterioration in the overall subjective impression of the stored as well as heat aged beer was greater for variant hopped by bitter varieties of hops and hop extract (Tab. 7). Similarly, depending on the hopping increased intensity of three investigated off-flavors. The relatively smooth increase in the intensity of oxidized, moldy-musty and stale flavor was found out for heat aged beers in a scale of beers from Saaz hops hop to the beer hopped by extract (Fig. 7). The stored beer divided in the two groups, beer hopped by varieties Saaz hops

Tab. 7 Senzorická stabilita pív / Sensorial stability of beer

Odrůda / Variety	ŽPČ	SLA	PRE	AGN	MAG	E-CO2
Zrychleně stařené pivo / Forced-aged beer *	1.6	1.6	1.6	2.4	2.2	2.3
Pivo skladované 3 měsíce / Beer stored for 3 months *	0.9	1.1	1.1	1.3	1.3	1.2
Koloidní stabilita (měsíce) / Colloidal stability (months)	3.7	3.2	3.2	5.8	4.2	5.1

*Senzorická stabilita – nárůst hodnoty celkového dojmu / Sensorial stability – increase of overall impression value
Sestupná škála kvality 1–9 bodů / Decreasing scale of quality 1–9 points

Tab. 8 Korelace antiradikálové aktivity s obsahem karbonylů a senzorickou stabilitou pív / Correlation of antiradical activity with carbonyls content and sensorial stability of beer

	Stařené pivo / Force-aged beer			Skladované pivo / Stored beer		
	RC-DCPI	ESR-DPPH	ESR-Lag-time	RC-DCPI	ESR-DPPH	ESR-Lag-time
Karbonyly / Carbonyls A	-0.54	-0.57	0.19	-0.78	-0.70	-0.29
Karbonyly / Carbonyls B	0.46	0.55	-0.34	-0.41	-0.31	0.03
2-Furfuraldehyd / 2-Furfuraldehyde	-0.48	-0.58	0.27	-0.69	-0.42	-0.27
Senzorická stabilita / Sensorial stability	-0.56	-0.67	-0.15	-0.05	-0.52	-0.10

Tučně: korelace významná na hladině $\alpha = 0,05$ / Bold: correlation significant on the level $\alpha = 0,05$

Senzorická stabilita: nárůst hodnoty celkového dojmu / Sensorial stability: increase of overall impression value

Statistické vyhodnocení výsledků senzorické analýzy pív a analýz karbonylových látek ve starých pivech prokázalo vztah antioxidantů chmele a senzorického stárnutí pív (tab. 8). Obsah karbonylových látek A v tepelně stařených i skladovaných pivech koreloval s redukční aktivitou ESR-DPPH a redukční kapacitou DCPI čerstvých pív. Obdobný závěr je možno učinit pro 2-furfuraldehyd a tepelně stařené pivo. Hodnota ESR-DPPH silně korelovala s obsahem polyfenolů v pivu, chmelením různými typy chmelů. Hodnota ESR-lag time nezávisela na chmelení, korelovala s obsahem oxidu siřičitého v pivu ($r = 0,83$, $n = 12$). Pro tepelně stařená piva byla nalezena slabá přímo úměrná korelace mezi hodnotou karbonylů B a hodnotou ESR-DPPH, u skladovaných pív byla závislost nepřímo úměrná, ale neprůkazná na hladině $\alpha = 0,05$. Působení antioxidantů na bázi polyfenolů a volných fenolů na tvorbu karbonylů a senzorické stárnutí pív je odlišné u přirozeně stárnoucího, skladovaného piva a piva zrychleně stařeného působením tepla [16, 17].

Senzorická stabilita pív hodnocená nárůstem hodnoty celkového dojmu mezi čerstvým a starým pivem nepřímo úměrně korelovala s redukční aktivitou ESR-DPPH. Vztah redukční kapacity DCPI a senzorické stability pív byl průkazný pouze u tepelně stařených pív. Vztah mezi hodnotou ESR-lag time a senzorickou stabilitou nebyl v této sérii pokusných pív průkazný.

Zvýšení antiradikálové aktivity pív a zpomalení senzorického stárnutí aplikací vyššího množství chmelových polyfenolů se ovšem odrazilo ve zhoršení přirozené koloidní stability pív (tab. 7). Výsledky jiné naší práce ukazují, že stabilizaci piva sorbentem polyfenolů je sniženo především obsahem základových polyfenolů bez výrazného dopadu na antioxidační vlastnosti piva [34]. V praxi je proto nutno volit suroviny a technologie s ohledem na ekonomiku výroby a požadované garance koloidní a senzorické stability.

4 ZÁVĚR

Varní pokusy zaměřené na zjištění vlivu typu chmelové suroviny, odrůdy chmele na antioxidační vlastnosti a senzorickou stabilitu piva byly provedeny na široké škále chmelů od jemné aromatické odrůdy, Žateckého červeňáku po vysokoobsažnou odrůdu Magnum a chmelový CO₂ extrakt. Výsledky je možno shrnout následovně:

- Množství chmelových antioxidantů, polyfenolů i volných fenolových látek dávovaných při chmelení prudce klesá od aromatických po vysokoobsažné odrůdy. Důležitý je poměr hořkých kyselin a polyfenolů ve chmelu.
- Redukční aktivita ESR-DPPH mladín klesala od várek chmelených aromatickými odrůdami (Žatecký červeňák – ESR-DPPH = 95 %) po várky chmelené chmelovým extraktem (ESR-DPPH = 69 %).
- Hodnota antiradikálové aktivity ESR-T150 mladín do určité míry závisela na chmelení, u mladín chmelených chmelu Žatecký červeňák, Sládek, Premiant a Agnus byla srovnatelná (T150 = 6,5–6,7), hodnota u várek chmelených chmelom Magnum (T150 = 7,5) a chmelovým extraktem byla méně příznivá (T150 = 9,5).
- Redukční aktivita ESR-DPPH pív významně závisela na chmelení, hodnota ESR-DPPH klesala od pív chmelených aromatickými chmelu po piva chmelená chmelovým extraktem. Pro Žatecký červeňák byla hodnota o 38 % a pro Sládek o 27 % vyšší v porovnání s chmelovým extraktem. Obdobná, ale slabší závislost byla stanovena pro redukční kapacitu DCPI pív.
- Obsah skupiny markerů karbonylových látek vznikajících z aminokyselin a vyšších alkoholů a rovněž tak obsah 2-furfuraldehydu ve starém pivu závisel na chmelení, redukční aktivitě (ESR-DPPH, RC-DCPI) a klesal od pív chmelených chmelovým extraktem po piva chmelená aromatickými odrůdami Žatecký červeňák a Sládek. Korelace mezi redukční aktivitou a obsahem karbonylů byly průkazné na hladině $\alpha = 0,05$, leč slabé. Na tvorbu karbonylů ve starém pivu mají vliv i další faktory, obsah oxidu siřičitého, zatížení piva kyslíkem.
- Senzorická stabilita (zhoršení subjektivního dojmu) slabě korelovala s redukční aktivitou ESR-DPPH skladovaných ($r = -0,52$) a zrychleně stařených pív ($r = -0,67$). Senzorické stárnutí pív, ať již hodnocené zhoršením celkového subjektivního dojmu, nebo intenzitou oxidační, sklepní a staré chuti a vůně, bylo rychlejší u pív chmelených hořkými odrůdami chmele Agnus a Magnum či chmelovým extraktem v porovnání s pivy chmelenými odrůdami Žatecký červeňák, Sládek a Premiant.
- Pokusy prokázaly nezanedbatelný vliv typu chmele, množství chmelových antioxidantů na antioxidační vlastnosti a zpomalení senzorického stárnutí pív.

hop, Sládek, Premiant and beers hopped by varieties Agnus, Magnum and hop extract. The values accessed for the second group were approximately twice (Fig. 8).

Statistical evaluation of the results of sensory analysis of beer and analysis of carbonyl compounds in the age beers showed the relationship of hop antioxidants and sensory aging beers (Tab. 8). Carbonyl substances content of the heat aged and stored beers correlates with reducing activity ESR-DPPH and reducing capacity DCPI of fresh beers. A similar conclusion can be made for 2-furfuraldehyde and heat-aged beer. The ESR-DPPH value strongly correlated with the content of polyphenols in beer, hopping by different types of hops. ESR lag-time value was independent of the hopping, correlated with the sulfur dioxide content in beer ($r = 0,83$, $n = 12$). Weak directly proportional correlation between the amount of carbonyls B in beer and ESR-DPPH value was found for heat-aged beers, the stored beer had inversely proportional relationship, but inconclusive at the level $\alpha = 0,05$. Effect of antioxidants on the basis of free phenols and polyphenols on the formation of carbonyls and sensory aging of beers is different for the natural aging, the stored beer and beer forced aged by the heat [16, 17].

Sensory stability of beers assessed by the increase in overall impression value between fresh and age beer inversely correlated with ESR-DPPH reducing activity. Relationship DCPI reducing capacity and sensory stability of beer was significantly only in the heat-aged beers. Relationship between the value of the ESR-lag time and sensory stability was not conclusive in this series of experimental beers.

Increase of antiradical activity of beers and sensory aging deceleration by application of a higher amount of hop polyphenols, however, resulted in the deterioration of natural colloidal stability of beer (Tab. 7). Results of our other study show that the stabilization of beer by polyphenols sorbent mainly haze active polyphenol content is reduced without any significant impact on the antioxidant properties of beer [34]. In practice, it is therefore necessary to choose the raw materials and technology with regard to the economics of production and required guarantees of colloidal and sensory stability.

4 CONCLUSIONS

Brewing experiments aimed at determining the influence of the type of hop raw material, hop varieties on the antioxidant properties and sensorial stability of beer were performed on a wide range from fine aroma hop variety Saaz hops to high-alpha variety Magnum and CO₂ hop extract. The results can be summarized as follows:

- Quantity hop antioxidants, polyphenols and free phenolic compounds in the hop dose have intensely decreased from aroma varieties to high-alpha varieties. Important is the ratio of bitter acids and polyphenols in hops.
- Reducing activity ESR-DPPH of worts decreased from brews hopped by aroma varieties (Saaz hops – (ESR-DPPH = 95 %) to brews hopped by CO₂ hop extract (ESR-DPPH = 69 %).
- The antiradical activity ESR-T150 of worts dependent on the hopping to a certain extent, the worts hopped by Saaz hops, Sládek, Premiant and Agnus was comparable (T150 = 6.5 – 6.7), value of brews hopped by Magnum hops (T150 = 7.5) and the hop extract was less favorable (T150 = 9.5).
- Reducing activity ESR-DPPH of beers significantly depended on the hopping, the value of ESR-DPPH decreased from beer hopped by aroma varieties to beer hopped by hop extract. The value of Saaz hops was in 38% and of Sládek in 27 % higher compared with the hop extract. A similar but weaker relationship was established for the reducing capacity DCPI of beers.
- The content of carbonyl markers substances of group generated from amino acids and higher alcohol, as well as the content of 2-furfuraldehyde of age beers depended on the hopping, reducing activity (ESR-DPPH, RC-DCPI) and decreased from beer hopped by hop extract to beers hopped by aroma varieties Saaz hops and Sládek. Correlation between reducing activity and carbonyl content were evident at the level $\alpha = 0,05$, but weak. The creation of carbonyls in the age beer affects likewise other factors e.g. sulfur dioxide and oxygen charge of beer.
- Sensorial stability (worsening of the subjective impression) weakly correlated with the reducing activity ESR-DPPH of stored beers ($r = -0,52$) and heat-aged beers ($r = -0,67$). Sensorial aging of beers either rated by the deterioration of the overall subjective impact or intensity of oxidized, moldy-musty and stale flavor was faster

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem MSM6019369701 „Výzkum sladařských a pivovarských surovin a technologií“.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 5. 4. 2010

Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 5. 2010

for beers hopped by bitter hop varieties Agnus and Magnum or hop extract in comparison with beers hopped by varieties Saaz hops, Sládek and Premiant.

- Experiments have shown a significant effect of hop type, hop antioxidants quantities on antioxidant properties and deceleration of sensorial aging of beers.

Acknowledgements

This work was supported by the grant MSM6019369701 „Research of malting and brewing raw materials and technologies“.

LITERATURA / REFERENCES

1. Lermusieau, G., Liégeois, C., Collin, S.: Reducing power of different hop variants. *Cerevisia* **26**, 2001, 33–41.
2. Mikyška, A., Krofta, K. and Hašková, D.: Evaluation of antioxidant properties of raw hop and hop products. *Acta Horticulturae (ISHS)* 778. Leuven, International Society for Horticultural Science (D. Havkin-Frenkel) 2008, 97–110.
3. Krofta, K., Mikyška, A. and Hašková, D.: Antioxidant characteristics of hops and hop products. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 160–166.
4. Boivin, P.: Relationship between polyphenols and beer flavour stability. *Cerevisia* **33**, 2008, 188–195.
5. Dostálek, P., Karabín, M.: Impact of hop polyphenols and antioxidant properties of wort on formation carbonyl compounds during boiling process and storage of beer. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Venice 2007*, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD-ROM, 2007, 923–930.
6. Mikyška, A., Hrabák, M., Hašková, D., Šrogl, J.: The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. *J. Inst. Brew.* **108**, 2002, 78–85.
7. Irwin, A. J., Barker, R. L., Pipats, P.: The role of copper, oxygen, and polyphenols in beer flavour instability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **49**, 1991, 140–149.
8. Wackenbauer, K., Hardt, R.: Radikalreaktionen und die Geschmacksstabilität des Bieres. *Brauwelt* **136**, 1996, 1880–1889.
9. Andersen, M., Outtrop, H., Skibsted, L.: Potential antioxidants in beer assessed by spin trapping. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2000, 3106–3111.
10. Back, W., Franz, O., Nakamura, T.: Das Antioxidative Potenzial von Beer. *Brauwelt* **141**, 2001, 209–215.
11. Franz, O., Back, W.: Stability index – a new approach to measure the flavor stability of beer. *Technical Quarterly MBAA* **40**, 2003, 20–24.
12. Kautovirta-Noira, A., Virtanen, H., Poyri, S., Lehtinen, P., Nurmi, T., Hartwaal, P., Reinikainen, P., Siirila, J., Home, S.: The increase of antioxidant activity during mashing – does it improve beer flavor stability? *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Prague*, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD-ROM, 2005, 709–720.
13. Nakamura, T., Franz, O., Back, W.: pH dependence of radical scavenging activity of polyphenols, phenolic acid and sulfite. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Budapest*, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD-ROM, 2001, 612–620.
14. Araki, S., Kimura, T., Shimizu, Ch., Furusho, S., Takashio, M., Shinotsuka, K.: Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavor stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**, 1999, 34–37.
15. Liégeois, C., Lermusieau, G., Collin, S.: Measuring antioxidant efficiency of wort, malt and hops against AAPH induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2000, 1129–1134.
16. Walters, M. T., Heasman, A. P., Hughes, P. S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 1: Forced-aging. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 1997, 83–89.
17. Walters, M. T., Heasman, A. P., Hughes, P. S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: Extended storage trials. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 1997, 91–98.
18. Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H., Koshino, S.: Reducing activity and flavor stability of beer. *Technical Quarterly MBAA* **32**, 1995, 90–94.
19. Mikyška, A., Krofta, K., Hašková, D.: Evaluation of antioxidant properties of hop and hop products. *Kvasny Prum.* **52**, 2006, 214–218.
20. Mikyška, A., Hašková, D., Prokeš, J.: Antiradical properties of malt accessed by EPR methods. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Prague*, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD-ROM, 2005, 764–773.
21. Kellner, V., Mikyška, A., Prokeš, J., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P.: The Influence of Malt Polyphenols and Individual Phenolic Substances on Beer Quality, Colloidal and Sensory Stability. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Prague 2005*, 30, CD ROM 2005, Contribution 61.
22. Analytica EBC, 5th edition, European Brewery Convention, Carl-Hans Verlag, Nuremberg, 1998.
23. Basařová G.: Pivovarsko sladařská analytika, Merkanta, Praha, 1994.
24. Brautechnische Analysenmethoden, Band II, Freissing-Weihenstephan, 1987, 96–97.
25. Ushida, M., Ono, M.: Improvement of oxidative flavor stability of beer – Role of OH-radicals in beer oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, 198–204.
26. Ushida, M., Suga, S., Ono, M.: Improvement of oxidative flavor stability of beer – Rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, 205–211.
27. Kellner, V., Jurková, M., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P.: Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsner type. *Brewing Science, Jan./Feb.*, 2007, 5–10.
28. Čulík, J., Jurková, M., Horák, T., Kellner, V.: Zkušenosti s využitím nových technik plynové chromatografie při analýze senzoricky aktivních látek. Část. II. Stanovení karbonylových sloučenin pomocí derivatizace nebo detekce detektorem GC-ECD a GC-MS. Využití HPLC při stanovení 2-furfuralu. *Kvasny Prum.* **44**, 1998, 7–11.
29. Ojala, M., Kotiaho, T., Siirila, J., Sihvonen, M.-L.: Analysis of aldehydes and ketones from beer as PFBOA derivatives. *Talanta* **41**, 1994, 1297–1309.
30. Čejka, P., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M.: Modern methods of sensorial analysis results evaluation. *Kvasny Prum.* **48**, 2002, 114–119.
31. Pascoe, H. M., 1 and Jennifer M. Ames J. M.: Critical Stages of the Brewing Process for Changes in Antioxidant Activity and Levels of Phenolic Compounds in Ale. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **61**, 2003, 203–209.
32. Goiris, K., Syryn, E., Jaskula, B., Van Opstaele, F., De Rouck, G., Aerts, G., De Cooman, L.: Hop polyphenols: potential for beer flavour and flavour stability. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Venice 2007*, 31, CD ROM 2007, Contribution 87.
33. Malfliet, S., Van Opstaele, F., De Clippeleer, J., Syryn, E., Goiris, K., De Cooman, L., Aerts, G.: Flavor instability of pale lager beers: Determination of analytical markers in relation to sensory ageing. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 180–192.
34. Mikyška, A., Hašková, D., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P.: Study of an influence of beer colloidal stabilization by sorbent Polyclar AT on polyphenolic antioxidants and sensorial stability of beer. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 167–174.