

# Přímá spektrometrie piva a jeho destilátů

## Direct Spectroscopy of Beer and its Distillate

JAN ŠAVEL, PETR KOŠIN, ADAM BROŽ

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

Budweiser Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice, Czech Republic

jan.savel@budvar.cz

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Přímá spektrometrie piva a jeho destilátů.** Kvasny Prum. 57, 2011, č. 6, s. 143–148.

Sledovala se absorpční spektra v UV oblasti modelových sloučenin, nealkoholického piva, světlého a tmavého ležáku a světlého ležáku po 10 letech stárnutí. Absorpční spektra zředěného piva vykazovala v UV oblasti typické absorpční maximum v oblasti okolo 260 nm, na jehož tvorbě se podílejí polyfenoly i reduktory piva, pocházející ze sacharidů. Při další oxidaci piva se projevuje nárůst absorbance ve viditelné oblasti, roste podíl oligomerů a polymerů polyfenolů nebo reduktů, přičemž může následovat jejich další oxidace a degradace. Podobný vzor vykazovaly i další látky, např.  $\alpha$ -fenylylalanin a z něj vytvořené aldehydy. Ethanol mohl zejména v počátcích oxidace inhibovat tyto nežádoucí reakce. Těkavé produkty sacharidů a  $\alpha$ -fenylylalaninu poskytovaly podobná maxima jako netěkavé složky, ze kterých vznikla.

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Direct spectroscopy of beer and its distillate.** Kvasny Prum. 57, 2011, No. 6, p. 143–148.

The UV absorption spectra of model compounds, non-alcoholic beer, fresh pale and dark lager and pale lager after 10 years of storage were measured. Absorption spectra of diluted beer showed a typical UV absorption maximum around 260 nm, which responded to polyphenols and beer reductones coming from carbohydrates. The increase of absorbance in the visible region is probably caused by growing proportion of dimers and polymers of reductones and/or polyphenols but further decomposition of such compounds may also occur. Other substances e.g.  $\alpha$ -phenylalanine provided similar spectrum pattern. Ethanol could inhibit oxidation and polymerization reactions. Reductones and  $\alpha$ -phenylalanine had similar spectra as their oxidation products.

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Direkte Spektrometrie des Bieres und seines Destillaten.** Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 6, S. 143–148.

Es wurden die Absorption-Spektren im UV Bereich von Modellverbindungen, alkoholfreien Bieren, vom hellen und dunklen Lagerbier und vom 10 Jahre alten Lagerbier verfolgt. Die Absorption-Spektren eines verdünnten Bieres wiesen im UV Bereich im Bereich rund um 260 nm ein typisches Absorptionsmaximum auf, auf dem die aus Sacchariden stammenden Polyphenols und Reduktions teilgenommen hatten. Während der weiteren Oxidation des Bieres nimmt im Sichtbereich die Extinktion zu, weiter wächst der Anteil an Polymer- Oligomer und Polymer-Redukton und weiterhin kann ihre weitere Oxidation und Degradation verfolgen. Ein ähnliches Muster wiesen auch die weitere Stoffe z.B.  $\alpha$ -Phenylalanin und die aus den gebildeten Aldehyden auf. Insbesondere am Anfang dieser Oxidation konnte diese unerwünschten Reaktionen durch Ethanol inhibiert werden. Die flüchtigen Produkte aus Sacchariden oder  $\alpha$ -Phenylalanin wiesen ähnliche Maxime wie die aus denen entstehenden unflüchtige Produkte auf.

**Klíčová slova:** pivo, stárnutí, reduktory, polyfenoly, UV spektrofotometrie piva, polymerace aldehydů, neenzymové hnědnutí, antioxi-danty.

**Keywords:** beer, aging, reductones, polyphenols, UV spectrophotometry, aldehyde polymerization, nonenzymatic browning, antioxidants

## 1 ÚVOD

Spektroskopické metody jsou v pivovarské a sladařské analytice velmi oblíbené. Představují rozšíření vizuálního posuzování piva a po přidavku vhodných činidel je možné získat informace o jednotlivých sloučeninách i jejich skupinách. Analytika EBC obsahuje spektroskopické metody ve viditelné nebo UV oblasti, většinou po přidavku specifických činidel k pivu nebo mezivodům jeho výroby.

Výhodou těchto metod je především rychlost a snadná dostupnost spektrometrů v relativně nízkých cenových hladinách. Proto jsou tyto metody velmi oblíbené v laboratorní i provozní kontrole, často v podobě automatických analyzátorů.

Měření absorpčních spekter piva ve viditelné oblasti se využívá v podrobné analýze barvy piva, měření jeho oxidačně redukcí vlastností, v diferenciální spektrofotometrii, v UV spektrometrii při stanovení tzv. absorpčního integrálu [1,2].

Pro získání dalších informací je nutné použít pokročilejší metody s využitím plynové i kapalinové chromatografie, tyto metody však nacházejí zřídka uplatnění v jednoduchých rutinních metodách. Na UV a VIS metody navazují spektrometrické metody v infračervené (IČ) oblasti, s uplatněním při analýzách piva a především surovin pro jeho výrobu [3].

Absorpční spektrum piva představuje klesající funkci ve viditelné oblasti světla, přičemž z praktických důvodů lze využívat oblast 380 až 700 nm, neboť v ní lze bez dalších úprav koncentrace vzorku zaznamenat viditelné spektrum piva v skleněné kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

U tmavých piv se vzorky musí ředit, nebo použít kyvetu s ještě kratší optickou dráhou. Naopak v oblasti delších vlnových délek se mohou použít kyvetu s optickou dráhou až 10 cm, přičemž se zde

## 1 INTRODUCTION

Spectroscopic methods are very popular in brewing and malting. They represent an extension of the visual examination of beer and can describe individual compounds and their groups. Analytica EBC describes spectroscopic methods in the visible or UV region, mostly after the addition of specific reagents to beer or production intermediates.

The advantage of these methods is primarily low time consumption and easy availability of spectrometers at relatively low prices. Therefore, these methods are very popular in the laboratory and production control, often with the help of automated analyzers.

Measurement of absorption spectra of beer in the visible region is used in the advanced analysis of the beer color as well as in study of beer ageing by differential spectrophotometry. UV spectroscopy of beer distillate enables determination so-called absorption integral [1,2].

For detailed estimation of beer aging is necessary to use more advanced methods using gas and liquid chromatography, but these methods are rarely applied in simple routine methods. The UV/VIS spectroscopic methods are complemented by infrared spectroscopy, with application to the analysis of beer and especially raw materials for its production [3].

The absorption spectrum of beer in visible region is a decreasing function of its absorbance against wavelength which is usually measured at 380–700 nm in a glass cuvette with the optical path of 1 cm.

For dark beers, the samples must be diluted or placed in a cell with shorter optical path. For longer wavelengths the cells with optical paths of up to 10 cm may be used but the beer haze can disturb the determination. Absorption spectra of diluted beer in the UV region

výrazněji uplatňuje i zákal piva. Spektrometrie zředěného piva v UV oblasti se v poslední době používala k charakterizaci a rozlišení různých piv [4].

Cílem tohoto článku je prověřit možnosti využití spektrometrie v UV oblasti ke studiu změn při stárnutí piva.

## 2 MATERIÁLY A METODIKA

### 2.1 Chemikálie

L-askorbová kyselina, galová kyselina, (-)-epikatechin, o-dihydroxybenzen, o-diaminobenzen,  $\alpha$ -fenylalanin, manganistan draselný, peroxodisíran draselný (Sigma Aldrich), peroxid vodíku 30 % (Chemické závody Sokolov), ethanol 96 % (Lihovar Chrudim).

### 2.2 Suroviny, meziprodukty a produkty

Světlý a tmavý ležák odebraný po stočení (původní extrakt 12 % hm.), nealkoholické pivo s obsahem pod 0,5 % obj. alkoholu. Pro porovnání se použil stejný druh světlého ležáku po 10 letech skladování při 20 °C.

Černý (Ceylon), zelený (gun powder) čaj nebo chmel (0,25 g) se přelil 100 ml vroucí vody a po 25 min se nerozpuštěné podíly odstranily filtrací.

### 2.3 Přístroje a postupy

#### Spektrofotometr

Spektrofotometr UV/VIS Hach Lange DR 5000 pro měření spekter v rozsahu 190–1100 nm. Jednotlivé sloučeniny, substráty i produkty se rozpustily, nebo se z nich připravily extrakty v deionizované vodě a po případném naředění se snímala absorpční spektra v UV nebo VIS oblasti s automatickým přepínáním rozsahu při 330 nm v křemenné kytvě s optickou dráhou 10 mm proti deionizované vodě.

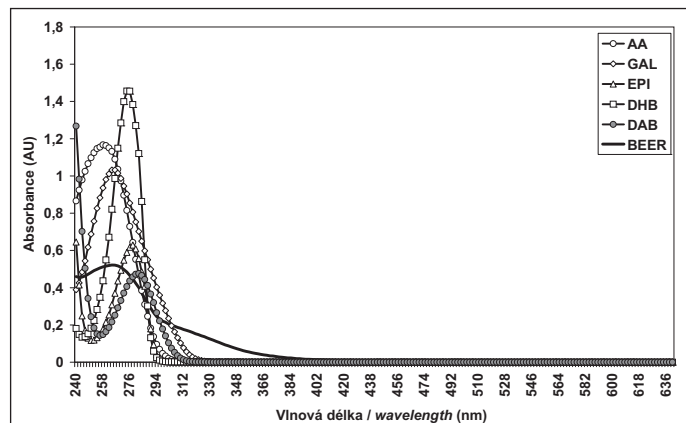
#### Destilátor 1-CUBE

Vzorek (50 ml) se vpravil do destilační baňky přístroje pro přehánění vodní párou s elektrolytickým vyvíječem, po 3 min přehánění se získalo 30 ml destilátu, který se doplnil deionizovanou vodou na původní objem 50 ml.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Absorpční spektra vybraných sloučenin po oxidaci manganistanem draselným

Spektra roztoků askorbové a galové kyseliny (obě 25 mg/l), (-)-epikatechinu, o-dihydroxybenzenu, o-diaminobenzenu (všechny 50 mg/l), a světlého piva (1:50) se měřila v rozsahu 240–640 nm (obr. 1a). K těmto roztokům se přidal roztok manganistanu draselného (1000 mg/l) v poměru 1:100 (výsledná koncentrace 10 mg/l) a po 1 h při 25 °C se proměřila absorpční spektra roztoků ve stejném rozsahu (obr. 1b).



Obr. 1a Absorpční spektra roztoků vybraných sloučenin a piva. AA – askorbová kyselina (25 mg/l), GAL – galová kyselina (25 mg/l), EPI – (-)-epikatechin (50 mg/l), DHB – o-dihydroxybenzen (50 mg/l), DHA – o-diaminobenzen (50 mg/l) a piva (1:50) / Fig. 1a Absorption spectra of beer and selected compounds. AA – ascorbic acid (25 mg/l), GAL – gallic acid (25 mg/l), EPI – (-)-epicatechin (50 mg/l), DHB – o-dihydroxybenzene (50 mg/l), DHA – o-diaminobenzene (50 mg/l) and beer (1:50).

have recently been used to characterize and differentiate between different beers [4].

This article aims to examine the possibility of using UV spectrometry to study changes in aging beer.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals

L-ascorbic acid, gallic acid, (-)-epicatechin, o-dihydroxybenzen, o-diaminobenzene,  $\alpha$ -phenylalanine, potassium permanganate, potassium peroxodisulfate (Sigma Aldrich), hydrogen peroxide 30% (Chemical Works Sokolov), ethanol 96% (Distillery Chrudim).

### 2.2 Raw materials, intermediates and products

Non-alkoholic beer (alcohol 0.5 % w/w), pale and dark lager (the original extract of 12% w/w) were sampled immediately after bottling. For comparison, the same kind of pale lager was stored for 10 years at 20 °C.

Black (Ceylon), green (gun powder) tea or hop (0.25 g) was overfilled with 100 ml of boiling water and the suspensions were filtered after 25 min to remove suspended particles.

### 2.3 Apparatus and procedures

#### Spectrophotometer

Spectrophotometer UV/VIS Lange Hach DR 5000 enables the measurement of spectra in the range of 190–1100 nm. Individual compounds, substrates and products were dissolved in deionized water and after possible dilution the absorption spectra were taken in the UV or VIS region in a quartz tube with 10 mm optical path against deionized water.

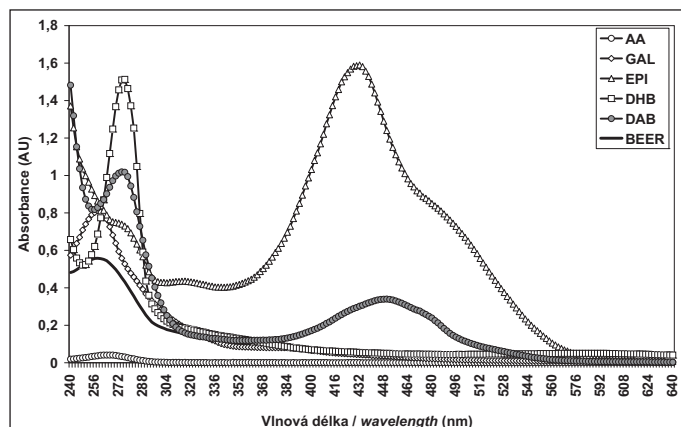
#### Steam distiller 1-CUBE

The sample (50 ml) was put in the distillation flask of the apparatus for the steam distillation with electrolytic steam generator. After 3 minutes 30 ml of distillate was obtained and refilled by deionized water to the original volume of 50 ml.

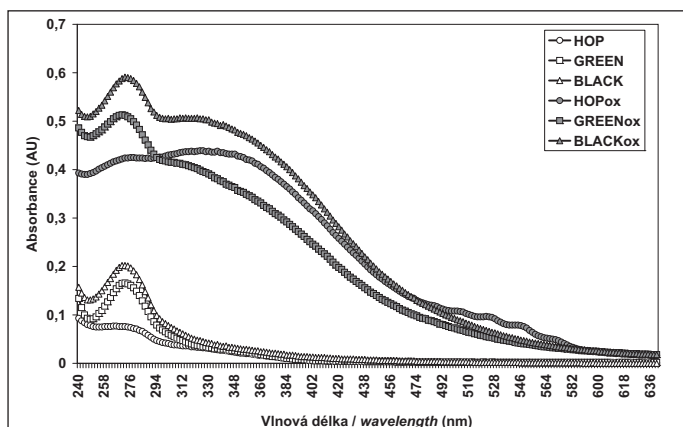
## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Absorption spectra of selected compounds oxidized by potassium permanganate

Absorption spectra of gallic and ascorbic acid (both 25 mg/l), (-)-epicatechin, o-dihydroxybenzene, o-diaminobenzene (all 50 mg/l), and pale beer (diluted 1:50) were measured in the range 240–640 nm (Fig. 1a). The solution of potassium permanganate (1000 mg/l) was added in a ratio of 1:100 (final concentration of 10 mg/l) and after 1 h at 25 °C the absorption spectra of the solutions were taken in the same extent (Fig. 1b).



Obr. 1b Absorpční spektra roztoků vybraných sloučenin a piva. AA – askorbová kyselina (25 mg/l), GAL – galová kyselina (25 mg/l), EPI – (-)-epikatechin (50 mg/l), DHB – o-dihydroxybenzen (50 mg/l), DHA – o-diaminobenzen (50 mg/l) a piva (1:50) po 1 h oxidace manganistanem draselným (10 mg/l) / Fig. 1b Absorption spectra of beer and selected compounds after 1 h oxidation with potassium permanganate (10 mg/l). AA – ascorbic acid (25 mg/l), GAL – gallic acid (25 mg/l), EPI – (-)-epicatechin (50 mg/l), DHB – o-dihydroxybenzene (50 mg/l), DHA – o-diaminobenzene (50 mg/l) and beer (1:50).



Obr. 2 Absorpční spektra výluhů chmele, zeleného a černého čaje (1:50) před a po oxidaci manganistanem draselným (10 mg/l) / Fig. 2 Absorption spectra of the hops, green and black tea (1:50) before and after oxidation with potassium permanganate (10 mg/l).

V oblasti 240–340 nm vykazovalo zředěné pivo absorpční maximum okolo 260 nm, což odpovídá např. také absorpčnímu maximu askorbové kyseliny. V téže oblasti leží i absorpční maximum polyfenolů i v pivu nepřítomných látek jako jsou o-dihydroxybenzen a o-diaminobenzen, které se mohou považovat za modelový polyfenol a jeho analog s náhradou hydroxylových skupin aminoskupinami. Tato látka se využívá k stanovení  $\alpha$ -dikarbonylových látek. Na rozdíl od čistých sloučenin lze na absorpční křivce piva pozorovat postupný pokles absorbance za maximem křivky (obr. 1a).

Polyfenoly se mohou snadno oxidovat roztokem manganistanu draselného, na čemž se zakládají některé metody jejich stanovení v potravinách. Hydroxylové skupiny v o- poloze se tak mění v chinony s typickými absorpčními maximy okolo 260, 400 a 560 nm [5]. Tomuto vzoru odpovídá i průběh oxidace, např. epikatechinu, který vykazoval silnou absorbanci při 430 nm a o-diaminobenzenu (při 450 nm), zatímco o-dihydroxybenzen neposkytoval výraznou změnu absorpčního maxima, ale pozvolnější pokles absorbance po jeho dosažení. V roztoku galové kyseliny poklesla hodnota absorpčního maxima a pak následoval pozvolný pokles absorbance bez výraznějších maxim ve viditelné oblasti.

Nárůst absorbance po oxidaci polyfenolů je dobře známým projevem u enzymového i neenzymového hnědnutí potravin i nápojů, jako piva, vína i čaje. S navýšením barvy také souvisí dimerizace až polymerace polyfenolů.

Naproti tomu oxidací téměř vymizelo absorpční maximum askorbové kyseliny, u piva se nepatrně zvýšila hodnota absorpčního maxima, a jeho poloha se posunula k nižším vlnovým délkám (obr. 1a, b). Změny obsahu askorbové kyseliny po jeho přidavku k pivu mohou sloužit jako jednoduchý marker oxidačních procesů piva. Do piva se přitom přidá při stáčení roztok askorbové kyseliny v koncentraci 10–30 mg/l a sledují se oxidační změny jednoduchým měřením poklesu absorpčního maxima zředěného piva.

### 3.2 Absorpční spektra výluhu chmele a čajů po oxidaci manganistanem draselným

Výluhy chmele a čajů se zředily v poměru 1:50 a změřila jejich spektra v rozmezí 240–640 nm. K těmto roztokům se přidal roztok manganistanu draselného (1000 mg/l) v poměru 1:100 a po 1 h při 25 °C se proměřila absorpční spektra roztoků ve stejném rozsahu.

Oxidovatelnost přírodních polyfenolů se ověřovala u výluhů chmele a čajů, které po zředění vykazovaly také maxima v UV oblasti a jejichž hodnoty se oxidací výrazně zvýšily s pozvolným poklesem absorbance po dosažení maxim (obr. 2).

### 3.3 Absorpční spektra pív a jejich destilátů

Nealkoholické pivo, světlý a tmavý ležák po stočení a světlý ležák po 10 letech skladování se zředily 1:50 a změřilo se absorpční spektrum v rozmezí 240–640 nm (obr. 3a). Stejným způsobem se změřila spektra vzorků, přeháněných vodní párou (obr. 3b).

Absorpční spektra zředěných pív vykazovala maxima okolo 260 nm, která jsou typická pro produkty rozkladu sacharidů i oxidace polyfenolů. Podle očekávání odpovídal tento trend i barvě pív ve viditelné oblasti, přičemž čerstvé tmavé pivo mělo výrazně vyšší barvu než velmi staré světlé pivo.

Naproti tomu u destilátů se výrazné absorpční maximum prokázalo

The diluted beer showed absorption maximum around 260 nm, which corresponds to absorption maximum e.g. of ascorbic acid as a model reductone. The absorption maximum of natural polyphenols as typical beer compounds showed similar pattern as well as o-dihydroxybenzen and o-diaminobenzene which are absent in beer. They could be considered as a model of polyphenol and its analogue with a substitution of hydroxyl groups by amino groups. 1,2-diaminobenzene is usually used to determine  $\alpha$ -dikarbonyl compounds. The absorption curve of beer showed gradual decrease after the absorption maximum had been reached (Fig. 1a).

Polyphenols can be easily oxidized by potassium permanganate, which is used in methods of their determination in foods. Hydroxyl groups in the o-position are changed to the quinones with typical absorption maxima around 260, 400 and 560 nm [5].

This pattern was observed in the course of oxidation of epicatechin or o-diaminobenzene, which showed a strong absorbance at 430 nm resp. 450 nm, while o-dihydroxybenzene did not give a significant change in absorption maxima, but showed a gradual decreasing curve in region of longer wavelengths. The absorption maximum of gallic acid decreased, which was followed by a gradually decreasing curve without any significant peaks in the visible region.

Absorbance increase of polyphenols in visible region presents a well-known phenomenon of enzymatic or nonenzymatic browning of foods and beverages such as beer, wine and tea. It is also usually linked to dimerization and polymerization of polyphenols. In contrast, absorption maximum of ascorbic acid almost disappeared after oxidation. The absorption maximum of beer slightly increased and its position was shifted to lower wavelengths (Fig. 1, b).

Changes in ascorbic acid content after its addition to beer can serve as a simple marker of oxidative processes of beer. Ascorbic acid is dosed into beer at a concentration of 10–30 mg/l and the decrease of the resulting maximum is followed during beer storage, which responds to oxidative changes in beer.

### 3.2 Absorption spectra of the hop and tea extracts after oxidation with potassium permanganate

Extracts of hops and the tea were diluted in a ratio of 1:50 and their spectra in the range 240–640 nm were taken. The solution of potassium permanganate (1000 mg/l) was added to these extracts (1:100) and after 1 h at 25 °C the absorption spectra were measured.

The ability of natural polyphenol to be oxidized was verified by permanganate oxidation, at which the absorption maximum at around 260 nm increased which was accompanied by decreasing absorption curve after the maximum had been reached (Fig. 2).

### 3.3 Absorption spectrum of beers and its distillates

Non-alcoholic beer, pale and dark lager as well as pale lager after 10 years of storage were diluted in ratio 1:50 and the absorption spectra in the range of 240–640 nm were taken (Fig. 3a). In the same way, the absorption spectra of the volatiles were examined (Fig. 3b).

Absorption spectrum of diluted beer showed a maximum around 260 nm, which is typical for saccharide or polyphenol oxidation and/or degradation products. As expected, this trend continued in the visible range of beers but the color of fresh dark beer was significantly higher than that one of old pale lager.

In contrast, the distillates showed strong absorption maximum at 277 nm, that corresponds to absorption spectrum of furfural which proves a significant degradation of saccharide components during beer aging. The increase in absorbance around 210 nm has been also observed, which probably refers to volatile components, such as phenylacetaldehyde.

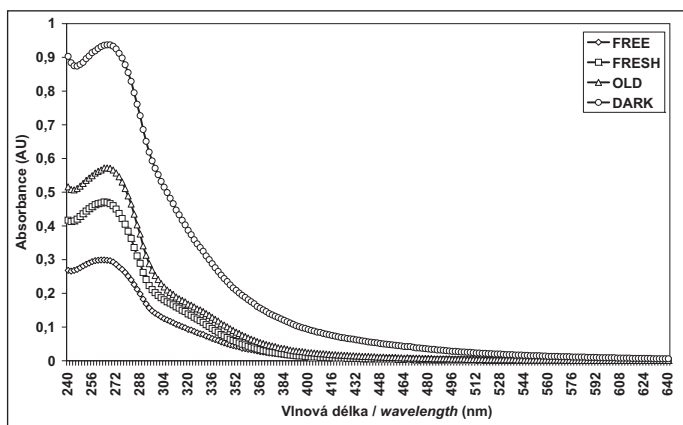
### 3.4 Absorption spectra of volatile compounds of maltose and non-alcoholic beer

Maltose solutions (5% w/w), decarbonised non-alcoholic beer with and without addition of 0.2% potassium peroxodisulfate or ethanol (5% by volume) was steam distilled and absorption spectra of distillates at 240–340 nm were measured (Fig. 4).

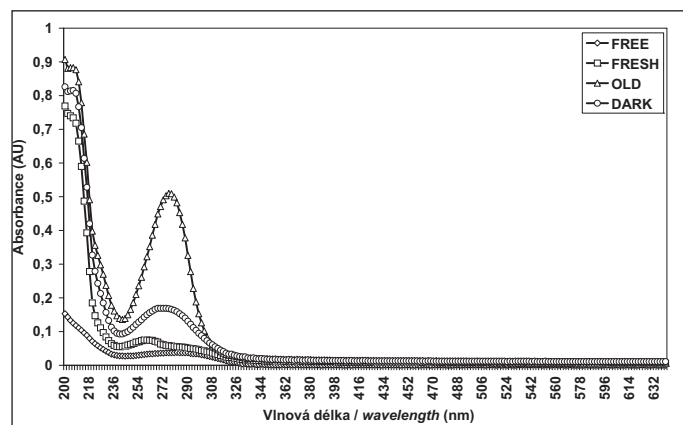
Beer oxidation using oxidation agents was called destructive analysis of beer (ODA), to highlight the different changes in the properties of beer after model oxidation of beer. The typical attributes of beer aging were observed after storage with the addition of potassium or ammonium peroxodisulfate [6]. They comprises increased color, turbidity and a significant presence of aged smell and taste.

Volatile compounds with absorption maxima at 216 and 265 nm were also obtained by oxidation of maltose, whereas 265 nm maximum occurred even in non-alcoholic beer, which is close to the wort. Addition of ethanol increased the content of volatile compounds in





Obr. 3a Absorpční spektra nealkoholického, čerstvého, starého (10 let) a tmavého piva (1:50) / Fig. 3a Absorption spectra of non-alcoholic, fresh, old (10 years) and dark lager beer (1:50).



Obr. 3b Absorpční spektra destilátů nealkoholického, čerstvého, starého (10 let) a tmavého piva / Fig. 3b Absorption spectra of distillates of non-alcoholic, fresh, old (10 years) and dark beer.

při 277 nm, což odpovídá zvýšenému obsahu furfuralu a svědčí o výrazném rozpadu sacharidických složek piva při jeho stárnutí. Zajímavé je i zvýšení absorbance okolo 210 nm, které odpovídá absorpčnímu maximu těkavých složek, např. fenylacetaldehydu.

### 3.4 Absorpční spektra těkavých látek po oxidaci maltosy a nealkoholického piva

Roztoky maltosy (5 %), dekarbonizované nealkoholické pivo bez a s přidavkem 0,2 % peroxodisíranu draselného nebo ethanolu (5 % obj.) se přehánělo vodní párou a změnila absorpční spektra destilátů při 240 až 340 nm (obr. 4).

Techniky oxidace roztoků piva oxidačními činidly využívá oxidačně destrukční analýza piva (ODA), která upozornila na rozdílné změny vlastností piva po přidavku oxidačních činidel. Po skladování piva s přidavkem peroxodisíranu draselného, nebo amonného se prokázaly všechny typické znaky rychlého stárnutí piva, jako jsou zvýšená barva, tvorba zákalu i výrazný výskyt cizí vůně a chuti [6].

Oxidací maltosy se získaly těkavé látky s absorpčními maximy při 216 a 265 nm, přičemž maximum při 265 nm se vyskytovalo i u nealkoholického piva, které je blízké mladině. Přidavek ethanolu zvyšoval obsah těchto látek v pivu s přidavkem peroxodisíranu draselného i bez něj, což lze vysvětlit buď jejich silnějším rozkladem i inhibicí jejich tvorby. Oxidací tohoto piva peroxodisíranem draselným se také zvyšoval obsah těkavých složek charakterizovaných zvýšením absorbance v okolí 210 nm. Tyto změny odpovídají dříve pozorovaným spektrům při oxidaci sladiny, mladiny a piva [7].

### 3.5 Vliv ethanolu na tvorbu zákalů oxidací fenylalaninu

Roztok  $\alpha$ -fenylalaninu (100 mg/l) s přidavkem 0,1 % peroxodisíranu draselného, popř. s přidavkem ethanolu (5 % obj.) se po 20 min probublávání dusíkem nebo vzduchem zahřívá 7 dní při 45 °C a zaznamenala se spektra vzorků i jejich destilátů při 200–640 nm (obr. 5a, b).

Při oxidaci fenylalaninu v anaerobním prostředí dříve tvořil zákal, jehož tvorbu bránil přidavek ethanolu. Tomuto pozorování odpovídá tvorba nerozpustných, pravděpodobně aldehydických, polymerů složek poskytujících zákal. Samovolná polymerace aldehydů je dobře dokumentována [8].

Kromě očekávaného nárůstu obsahu těkavých složek je zajímavá podobnost se spektrem benzaldehydu s maximem okolo 250 nm. Tato látka se z fenylalaninu může získat oxidací glyoxalem i peroxodisíranem draselným, přičemž peroxodisíran poskytoval oproti glyoxalu vyšší výtěžek. Podobně měl peroxodisíran draselný proti glyoxalu vyšší oxidační účinek při oxidaci sacharidů [9,10,11].

### 3.6 Vznik barevných pigmentů z askorbové kyseliny

Roztoky askorbové kyseliny (100 ml, 10 %) bez a s přidavkem peroxidu vodíku, peroxodisíranu draselného, manganistanu draselného (všechny 0,01 %) a ethanolu (5 %) v Erlenmeyerových baňkách (celkový objem 120 ml) se udržovaly 4 dny při 45 °C ve tmě a potom se proměřila spektra neředěných vzorků ve viditelné oblasti 400–640 nm (obr. 6).

Obvykle se silný antioxidant jako je askorbová kyselina považuje za látku schopnou zachycovat silná oxidační činidla, např. kyslíkové radikály. Méně se přihlíží ke skutečnosti, že oxidací askorbové kyseliny vznikají nežádoucí oxidační produkty, jako je dehydroaskorbová kyselina, jejíž rozklad dále vede k tvorbě nežádoucích pokročilých

beer after the oxidation with potassium peroxodisulfate, which can be explained either by stronger sacharide degradation or on the contrary by inhibition of volatile degradation. Peroxodisulfate oxidation of beer also increased the content of volatile components with high absorbance around 210 nm. These changes closely resembled the observed spectra during the oxidation of wort, wort and beer [7].

### 3.5 Effects of ethanol on the turbidity of phenylalanine oxidation

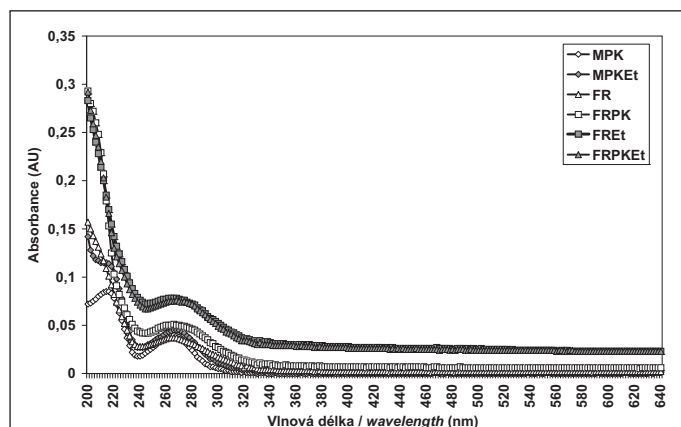
The solution of  $\alpha$ -phenylalanine (100 mg/l) containing potassium peroxodisulfate (0.1%) with the addition of ethanol (5 %v/v) was bubbled with nitrogen or air for 20 min. The spectrum of samples and their distillates was recorded after heating at 45 °C (Fig. 5a, b).

The oxidation of phenylalanine in the absence of oxygen provided a haze, which was prevented by the addition of ethanol. This observation corresponds to the formation of insoluble polymers. Spontaneous polymerization of aldehydes is well documented [8].

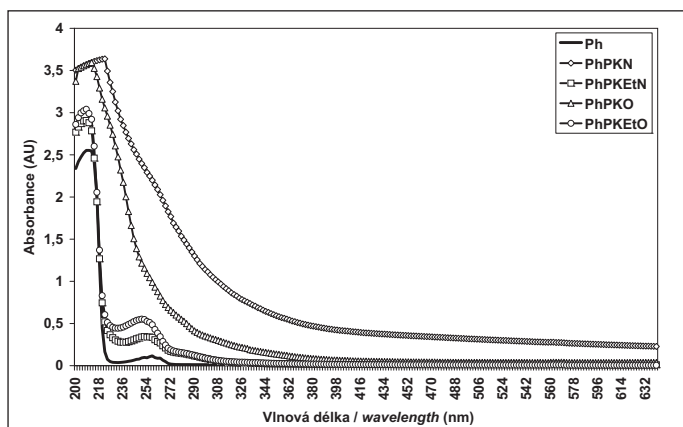
The spectrum of benzaldehyde showed a maximum around 250 nm. This substance can be obtained from phenylalanine by oxidation with glyoxal or potassium peroxodisulfate which provided higher yield than glyoxal. Similarly, potassium peroxodisulfate had higher oxidation effect in comparison to glyoxal during the oxidation of saccharides [9,10,11].

### 3.6 The formation of color pigments of ascorbic acid

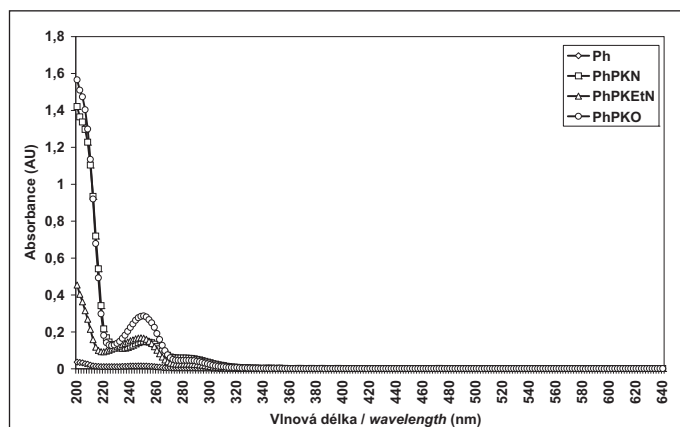
Ascorbic acid solution (100 ml, 10% w/w) with and without addition of hydrogen peroxide, potassium persulphate, potassium permanganate (all 0.01%) and/or ethanol (5% v/v) were put into Erlenmeyer flasks (total volume 120 ml) and kept in the dark for 4 days at 45 °C. The spectra of undiluted sample were taken in the visible range 400–640 nm (Fig. 6).



Obr. 4 Absorpční spektra po oxidaci roztoků maltosy (M, 5 %) a nealkoholického piva (FR) s přidavkem peroxodisíranu draselného (PK, 0,2 %) a ethanolu (Et, 5 % obj.) při přehánění vodní párou / Fig. 4 Absorption spectra of distillates after the oxidation of maltose (M, 5 % w/w) and non-alcoholic beer (FR) with and without addition of potassium peroxodisulfate (PK, 0.2 % w/w) and ethanol (Et, 5 % v/v) after steam distillation.



Obr. 5a Absorpční spektra po oxidaci roztoků fenylalaninu (Ph, 100 mg/l) s přidavkem peroxidisíranu draselného (PK, 0,2 %) a ethanolu (Et, 5 % obj.), skladovaných 7 dní při 45 °C za přítomnosti (O) a nepřítomnosti vzduchu. (N). Pro porovnání spektrum fenylalaninu (Ph, 100 mg/l) ve vodném roztoku (100 mg/l) / Fig. 5a Absorption spectra of phenylalanine (Ph, 100 mg/l) containing potassium peroxodisulfate (PK, 0,2 % w/w) and ethanol (Et, 5 % v/v), stored 7 days at 45 °C in the presence (O) and absence air (N). Absorption spectrum of phenylalanine (Ph, 100 mg/l) in aqueous solution (100 mg/l) is shown for the comparison.



Obr. 5b Absorpční spektra těkavých látek po oxidaci roztoků fenylalaninu (Ph, 100 mg/l) s přidavkem peroxidisíranu draselného (PK, 0,2 %) a ethanolu (Et, 5 % obj.), skladovaných 7 dní při 45 °C za přítomnosti (O) a nepřítomnosti vzduchu. (N) / Fig. 5b Absorption spectra of volatile compounds after the oxidation of solutions of phenylalanine (Ph, 100 mg/l) containing peroxidisíranu potassium (PK, 0,2 % w/w) and ethanol (Et, 5 % v/v), stored 7 days at 45 °C in the presence (O) and the absence of air (N).

glykačních produktů (AGEs – advanced glycation endproducts). K těmto produktům patří jednoduché aldehydy, opět snadno podléhající polymeraci. Při aerobní a anaerobní oxidaci sacharidů navíc vznikají rozdílné produkty [12].

## 4 ZÁVĚR

Podle výsledků této studie lze nalézt společné rysy samovolně probíhajících procesů oxidace piva. Po jeho stočení se silně posune oxidačně redukční rovnováha odstraněním kvasnic s aktivními dehydrogenasami, což umožňuje další přenos elektronů z redukčních látek piva na oxidační látky, přičemž mohou vzniknout reaktivní radikály nebo reaktivní formy oxidačních činidel, jako jsou peroxidy a chinony, které dále mohou oxidovat další složky piva. Současně se spotřebovává kyslík přítomný v pivu a hrdlovém prostoru láhve.

Při postupných změnách oxidačně redukčního potenciálu přecházejí aerobní oxidace na anaerobní, což vede k tvorbě rozdílných oxidačních produktů, a tím i různě se projevujícím příznakům stárnutí piva. Zajímavý je i obecný sklon k polymeraci vznikajících složek, oxidovaných polyfenolů, degradačních produktů sacharidů a těkavých aldehydů. Vznik polymerních sloučenin a jejich další oxidační degradace jsou typické i pro oxidaci lipidických látek, jejichž oxidací může vznikat malondialdehyd, který vzniká i oxidací sacharidů.

U některých složek může převod nedostatečného množství kyslíku přispívat k tvorbě nežádoucích produktů, nebo naopak se tyto produkty další oxidací mohou měnit na relativně neškodné sloučeniny. Je zde určitá analogie se spalováním paliva, kdy za nepřístupu vzduchu vzniká škodlivý dým, zatímco produkty hoření za dostatečného přístupu vzduchu poskytují relativně neškodné produkty jako jsou voda a oxid uhličitý. Těchto analogií lze při aerobním a anaerobním stárnutí nalézt mnohem více.

Zajímavý je inhibiční vliv ethanolu na oxidační procesy, přičemž ale vznikají nežádoucí produkty jako radikály ethanolu,

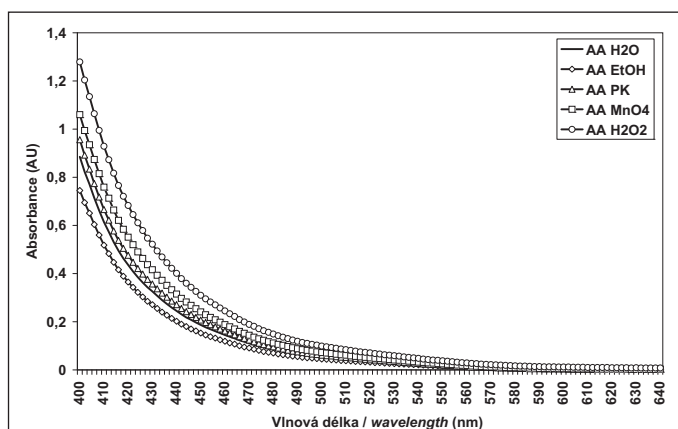
Powerful antioxidant such as ascorbic acid is usually considered as a scavenger of oxygen radical. On the other hand the oxidation of ascorbic acid leads to undesirable oxidation products such as dehydroascorbic acid, the decomposition of which leads to the undesirable glycation products (AGEs – advanced glycation endproducts). These products also include simple aldehydes, once again susceptible to polymerization. The aerobic and anaerobic oxidation of carbohydrates provided a broad scale of different products [12].

## 4 CONCLUSIONS

The aim of this study was to find common features of spontaneous oxidation of beer. After the bottling process beer redox balance strongly decreases thanks to the removal of active dehydrogenases of yeast, which is followed by further electron transfer from reducing substances to oxidizing ones. Oxidative agents which may also form reactive species such as peroxides and quinones. These oxidants then can oxidize other ingredients of beer. Oxygen dissolved in beer and gas oxygen in head space of bottle present a reserve of further oxidation agent.

The successive changes in redox potential lead to the formation of different oxidation products which is felt as a symptom of aging beer. General tendency to polymerization of oxidized polyphenols, degradation products of saccharides and volatile aldehydes is typical of this process. Formation of polymer compounds and their further oxidative degradation are also typical of the oxidation of lipid substances, which may be terminated by malondialdehyde formation, which is also generated by the oxidation of carbohydrates.

Uninsufficient supply of oxygen can paradoxically contribute to the formation of unwanted products, or vice versa, the further oxidation products may form relatively harmless compounds. There is some analogy with the burning fuel, which if partially protected from air creates harmful smoke, while the products of combustion in sufficient amount of air provides relatively harmless products like water



Obr. 6 Absorpční spektra roztoků askorbové kyseliny (AA, 10 %) s přidavkem oxidačních činidel peroxidisíranu draselného (PK, 0,01 %), manganistanu draselného (KMnO<sub>4</sub>, 0,01 %), peroxidu vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,01 %) a ethanolu (EtOH, 5 % obj.) po zahřívání 7 dní při 45 °C / Fig. 6 Absorption spectra of volatile compounds after oxidation of ascorbic acid (AA, 10 % w/w) with potassium peroxodisulfate (PK, 0,01 % w/w), potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>, 0,01 % w/w), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,01 % v/v) and ethanol (EtOH, 5 % v/v) 7 days after heating at 45 °C).

acetaldehyd a konečně jeho další oxidační produkty jako kyselina octová. V konečné fázi se opět ethanol může měnit na vodu a oxid uhličitý. Závisí ovšem na stupni škodlivosti těchto látek v porovnání se škodlivými oxidačními produkty sacharidů, např. glyoxalu a methylglyoxalu. Radikálové mechanismy redukce dále umožňují tvorby i redukčních produktů, jako superoxidového radikálu, nebo ethylenu. Také dalším rozkladem sacharidů vznikají silně redukující látky.

Obecně se redukční činidla považují za prostředek k oddálení nežádoucích změn, jejich působením však mohou vznikat nežádoucí senzorycké sloučeniny jako jsou thiole a redukovat kyslík za vzniku nebezpečných reaktivních oxidačních druhů.

Silné oxidační nebo redukční činidlo předává elektrony ostatním složkám piva různou rychlostí, kterou lze zvýšit aktivačními zásahy, jako jsou vyšší teplota, světlo a přísun dalšího množství kyslíku např. pohybem. Po stočení obsahuje pivo v obalu rozpuštěný kyslík, plyný kyslík a jeho sloučeniny v podobě dříve vytvořených látek, které mohou také oxidačně působit v průběhu stárnutí.

Sklon k stárnutí piva tedy vzniká již při ukládání kyslíku do jednotlivých sloučenin již při růstu ječmene.

and carbon dioxide. There are many of these analogies during aerobic or anaerobic aging.

The ethanol had inhibitory effect on oxidative processes, during which the side products such as ethanol radicals, acetaldehyde and oxidation products such as acetic acid may be formed. In the final stage the ethanol can change into water and carbon dioxide. Harmful oxidative products such as glyoxal and methylglyoxal are usually formed. Reductive oxygen reactive species such as superoxide radical or highly reduced compounds such as ethylene can also be formed. Strong reducing agents as products of carbohydrate degradation may be also involved.

In general, the reduction processes, which are involved in the production of beer may provide adverse sensory compounds such as thiols and the reduction of oxygen leads to the undesirable production such as dangerous reactive oxidative species.

Strong oxidizing or reducing agents transmit electrons to the other components of beer at different speeds, which can increase in the presence of activation factors, such as higher temperature, light and oxygen supply. After the package process the beer contains dissolved and gaseous oxygen and oxidative compounds in the form of previously created materials. The tendency to beer aging is embedded already in various organic compounds formed during barley growth in the presence of oxygen.

## LITERATURA / REFERENCES

1. Klein, H., Krammer, R., Natter, M.: Schnellbestimmung zur Vorhersage der Geschmacksstabilität von Bier. Eur. Brew. Conv. Proc. 26 th Congress, Maastricht 1997, příspěvek 66, 556-560. Oxford: IRL Press, 1997. ISBN 0-19-963690-7.
2. Savel, J., Kosin, P., Broz, A.: New oxidation destructive analysis (NODA). Monatsschr. Brauwiss. **62**, 2009, 155-163.
3. Brož, A.: Vliv jakostních znaků surovin na požadované parametry piva. Doktorandská disertační práce, VŠCHT, ÚKCHB, Praha, 2010.
4. Weerananthaphan, J., Downey, G.: Identity confirmation of a branded, fermented cereal product by UV spectroscopy: A feasibility study involving a trappist beer. J. Inst. Brew. **116**, 2010, 56-61.
5. Večeřa, M., Gasparovič, J.: Důkaz a identifikace organických látek. 2. vyd., Praha, 1973.
6. Šavel, J., Zdvihalová, D.: Oxidative destruction analysis of beer and intermediates. Eur. Brew. Conv. Proc. 27 th Congress, Cannes 1999, příspěvek 34, 267-279. Zoeterwoude EBC: 1999. ISBN 90-70143-20-8.
7. Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T.: Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva.. Vyd. VŠCHT Praha, 1. vyd. 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
8. Vogl, O.: Addition polymers of aldehydes. J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chem. **38**, 2000, 2293-2299.
9. Adamiec, J., Cejpek, K., Rössner, J., Velíšek, J.: Novel Strecker degradation products of tyrosine and dihydroxyphenylalanine. Czech J. Food Sci. **19**, 2001, 13-18.
10. Adamiec, J., Rössner, J., Velíšek, J., Cejpek, K., Šavel, J.: Minor Strecker degradation products of phenylalanine and phenylglycine. Eur. Food Res. Technol. **212**, 2001, 135-140.
11. Novotný, O., Cejpek, K., Velíšek, J.: Formation of  $\alpha$ -hydroxycarbonyl and  $\alpha$ -dicarbonyl compounds during degradation of monosaccharides. Czech J. Food Sci. **25**, 2007, 119-130.
12. O'Brien, J., Nursten, H. E., Crabbe M. J. C., Ames, J. M.: The Maillard reaction in foods and medicine. Royal Soc. Chem., Cambridge, UK. 1998. ISBN 0-85404-733-6.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 24. 2. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 7. 4. 2011

## Zpráva o činnosti komise MEBAK za rok 2010

V roce 2010 se konala dvě zasedání komise MEBAK, jedno na pozvání Brau-Union Österreich AG ve dnech 14. až 16. dubna v Linci (Rakousko) a druhé ve dnech 15. až 17. října na pozvání pivovaru Feldschlösschen v Rheinfelden (Švýcarsko).

Během jarního zasedání v Linci proběhla pravidelná volba předsednictva MEBAK. Předsedou byl zvolen Dr. Fritz Jacob (Forschungszentrum für Brau- und Lebensmittelqualität, Freising), místopředsedou Dr. Gerd Bender (Karlsberg Brauerei GmbH, Homburg). Pozici pokladníka převzal Dr. Gerold Reil (Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse, Freising) a zapisovatelem dále zůstává Ing. Martin Zarnkow (Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, Freising). Dlouholetý předseda MEBAK Dr. Anger (dříve Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin) byl zvolen čestným předsedou. Tiskovým

mluvčím MEBAK byl jmenován Dr. August Gresser (BergnerBräu GmbH, Eppan).

Práce na novém vydání příručky MEBAK Obaly a obalový materiál, která zahrnuje základní normy, předpisy a postupy zkoušení, jejímiž koordinátory byli Ing. Ingrid Weber (Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin) a Dr. Gerd Bender, byly úspěšně dokončeny a její digitální forma je k dispozici. Současně byly dokončeny práce na překladu poměrně obsáhlého svazku Suroviny do angličtiny, tak že by měl být již v roce 2011 na trhu v tištěné formě. Na veletrhu Brau 2010 byla současně zveřejněna směrnice MEBAK týkající se výčepních zařízení (koordinátoři Dr. Gresser a Ing. Johannes Tippman).

V současné době je připravován bývalý svazek II. (Mladina, Pivo a míchané nápoje na bázi piva). Koordinátorem části týkající se piva je Dr. Anger a části pojednávající o mí-

chaných nápojích Dr. Elsbeth Jüllich (Döhler GmbH, Darmstadt). Zveřejnění je plánováno na rok 2011. Další výstupy komise MEBAK se týkají vypracování směrnic pro vyhodnocování a kontrolu filtračních zařízení (koordinátor Stefan Kreis (Carlsberg A/S Group Research, Kodaň), in-line měřících zařízení (Dr. Roland Folz) a analytiky DMS (Dr. Mehmet Coelhan, Forschungszentrum für Brau- und Lebensmittelqualität, Freising).

Nyní jsou připravovány předpisy pro extrakci kationtů z filtračních materiálů a postupy stanovení DMS. V jejich rámci probíhají mnohé mezilaboratorní porovnávací testy.

Obě metody týkající se stanovení gushingu byly přepracovány a jsou nyní zveřejněny v aktuální formě jako „Modifizierter Carlsbergtest 2.0“ a „Guschingschnelltest für Malz- und Rohfrucht“ na internetových stránkách MEBAK ([www.mebak.org](http://www.mebak.org)).

Dr. Fritz Jacob (předseda MEBAK)

Přeložil: Ing. Jiří Čulík, CSc.