

Vliv redukujících látok na rychlosť redukce vzdušného kyslíku v modelových roztocích

The Influence of Reducing Substances on the Oxygen Consumption in Model Solutions

JAN ŠAVEL, PETR KOŠIN, ADAM BROŽ

Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice / Budweiser Budvar, N.C., Karolíny Světlé 4, CZ 370 21 Ceske Budejovice

e-mail: jan.savel@budvar.cz

Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Vliv redukujících látok na rychlosť redukce vzdušného kyslíku v modelových roztocích. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 3, s. 73–81.

Měřila se rychlosť redukce vzdušného kyslíku roztoky siřičitanu sodného, disiřičitanu sodného a askorbové kyseliny v deionizované a varní vodě. Rychlosť redukce závisela na pH a ústojné kapacitě vody, na přítomnosti iontů mědi, železa, kobaltu a přídavku modelových oxidačních činidel, např. dvojchromanu draselného a peroxidu vodíku. Ethanol a maltosa snižovaly rychlosť redukce kyslíku v modelových roztocích siřičitanu, ale zvyšovaly ji v roztocích askorbové kyseliny. Přidávek peroxidu vodíku k roztokům askorbové kyseliny urychloval její přeměnu na žluté a hnědé produkty a jejich následnou degradaci.

Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: The influence of reducing substances on the oxygen consumption in model solutions. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 3, p. 73–81.

The consumption of oxygen in the solution of sodium sulfite, sodium disulfite, and ascorbic acid in deionized and brewing water was measured. The rate of consumption depended on the pH and buffer capacity of water, the presence of copper, iron or cobalt ions, and on the addition of model oxidizing agents such as potassium dichromate and hydrogen peroxide. Ethanol and maltose reduced the rate of oxygen consumption in sulfite solutions, but increased in the solution of ascorbic acid. Hydrogen peroxide accelerated the conversion of ascorbic acid into yellow and brown pigments, which was followed by their degradation.

Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Der Einfluss der reduzierenden Substanzen auf die Geschwindigkeit der Luftsauerstoffreduktion in den Modellsolutions. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 3, S. 73–81.

Die Reduktionsgeschwindigkeit des Luftsauerstoffs durch die Natriumsulfit-, Natriumdithionit- und Askorbinsäurenlösungen im deionisierten Wasser und im Brauwasser wurde gemessen. Die Reduktionsgeschwindigkeit hängte vom pH Wert, von der Pufferkapazität des Wassers, von der Anwesenheit von Kupfer-, Eisen-, Kobaltionen und von der Zugabe der Modelloxydationszugaben (z.B. Kaliumdichromat und Wasserstoffperoxyd) ab. Ethanol und Maltose haben zwar die Reduktionsgeschwindigkeit des Sauerstoffes in den Sulfitmodellösungen reduziert aber in den Askorbinsäurenlösungen erhöht. Eine Peroxydzugabe zu den Lösungen der Askorbinsäure hat ihre Umwandlung auf gelb- und braune Produkte und eine folgende Degradation beschleunigt.

Klíčová slova: spotřeba kyslíku, redukton, Fentonova reakce, dehydroaskorbová kyselina, peroxid vodíku, dvojchroman draselný, disiřičitan disodný, neenzymové hnědnutí, pivo

Keywords: oxygen consumption, reductone, Fenton reaction, dehydroascorbic acid, hydrogen peroxide, potassium dichromate, sodium disulfite, nonenzymatic browning, beer

1 ÚVOD

Úloha jednotlivých látok v neenzymových reakcích potravin, zejména při degradaci sacharidů, není dosud objasněna. Existuje mnoho příkladů, že typické přírodní antioxidanty, např. kyselina askorbová nebo polyfenoly, mohou vykazovat antioxidační i prooxidační vlastnosti. Kromě toho jsou značné rozdíly v hodnocení úlohy těchto látok *in vitro* a *in vivo* (Halliwell a Clement 2000, Halliwell 2008). Mezi redukující látky patří reduktony, což jsou látky s endiolovými skupinami, které vznikají rozpadem sacharidů. Kyselina askorbová se může považovat za modelový redukton, jejíž oxidovaná forma, kyselina dehydroaskorbová (DHA) je příkladem oxidovaného reduktonu, podléhajícího další degradaci (Deutsch 2000).

Základní představa o škodlivosti procesů, podílejících se na civilizačních chorobách a stárnutí, se zakládá na mechanismu oxidačního a karbonylového stresu. Podstatou oxidačního stresu je tvorba reaktivních druhů kyslíku, u karbonylového stresu tvorba dikarbonylových sloučenin, schopných reagovat s důležitými přírodními látkami, jako jsou aminokyseliny, bílkoviny a nukleové kyseliny za ztráty jejich aktivity.

Mechanismy postupné redukce kyslíku a jeho meziproduktů, např. peroxidu vodíku, byly v literatuře podrobnej popsány stejně jako u karbonylového stresu. Jako výsledek karbonylového stresu se uvádí tvorba pokročilých glykačních produktů (AGEs – advanced glycation end products), často žlutě až hnědě zbarvených.

Tyto produkty se mohou tvořit jako důsledek odbourávání sacharidů v lidském těle, ale mohou do něj vstupovat s přijímanými potravami (Xanthis a Hatzitolios 2007, Zhu a Lan 2011). Lékařský výzkum se orientuje na látky inhibující Maillardovu reakci a tvorbu AGEs (Reddy a Beayz 2006, Rahbar a Figarola 2003). Glykační reakce

1 INTRODUCTION

The role of reducing substances in nonenzymatic reactions, particularly in degradation of carbohydrates, has not been fully clarified. There are many examples that typical natural antioxidants such as ascorbic acid or polyphenols can show both antioxidant and prooxidant properties. In addition, there are considerable differences in the role of these compounds *in vitro* and *in vivo* (Halliwell and Clement 2000, Halliwell 2008). Sugar reductones are substances with endiol groups, which are formed by the degradation of carbohydrates. Ascorbic acid can be considered to be a model reductone, whose oxidized form dehydroascorbic acid (DHA) undergoes further degradation (Deutsch 2000).

Harmful processes involved in aging and civilization diseases are based on the mechanisms of oxidative or carbonyl stress. The principle of oxidative stress is the formation of reactive oxygen species. Carbonyl stress is caused by dicarbonyl compounds, which can react with important natural substances such as amino acids and proteins and nucleic acids and usually is associated with the loss of their activities.

Oxygen free radicals (OFRs) or nonradical reactive species such as hydrogen peroxide are intermediate products of oxygen reduction. Advanced glycation end products (AGEs), often yellow or brown colored, are products of carbonyl stress.

These products can be formed during oxidative sugar degradation in the human body, but they can also be accepted with food (and Xanthis Hatzitolios 2007, Zhu and Lan 2011). Medical research has focused on the agents that inhibit the Maillard reaction and AGE formation (Reddy and Beayz 2006, Rahbari and Figarola 2003). Glycation reactions and the AGEs formation is also involved in beer aging (Bravo and Herrera 2008, Pfeifer and Kroh 2010).

a tvorba AGE probíhají i při stárnutí piva (Bravo a Herrera 2008, Pfeifer a Kroh 2010).

Nejasnosti dále existují v základních neenzymových mechanismech přeměny sacharidů, jako jsou Maillardova reakce, karamelička, reakce nebo tvorba melanoidních látok. Málo informací je o oxidačně redukčních reakcích polyfenolů a jejich radikálové považe. Polyfenoly oxidací poskytují semichony a chinony. Za reaktivní meziprodukty při oxidaci na chinony se považují methidy (Wan a Brousmiche 2001).

S oxidací polyfenolů je spojena tvorba dimerů a oligomerů, které se mohou alespoň částečně vrátit rozkládat thiolsou na původní složky (Callemin a Collin 2007). Látky vznikající rozpadem askorbové kyseliny nebo sacharidů mohou vytvářet kopolymeru s polyfenoly a aldehydy (Bradshaw a Prenzler 2001).

Na společné rysy oxidačních procesů lze usuzovat ze společných produktů rozpadu přirodních látok přítomných v pivu, jako jsou těkové aldehydy, charakteristické např. pro stárnutí potravin, nebo malonaldehyd jako marker nezádoucího rozpadu sacharidů v lipidu, zjištěvané oblíbenou reakcí s kyselinou thiobarbiturovou. Tyto produkty jsou obvykle barevné (Zamora a Hidalgo 2008).

Kyslík v pivu ovlivňuje jeho stárnutí rozhodujícím způsobem. Na postupné redukci kyslíku se podílejí redukční látky piv, mezi něž patří cukerné reduktoky, melanoidní látky, sirné sloučeniny a polyfenoly, přičemž klesá redukční kapacita piv. Za přítomnosti kyslíku se tvoří peroxid vodíku, který může oxidovat aminokyseliny i alkoholy za tvorby těkových aldehydů (Uchida a Ono 1999, Miller a Buettner 1990).

Lze očekávat, že zastoupení výsledných produktů bude záviset na rychlosti spotřeby kyslíku. Cílem tohoto článku je sledovat vlivy redukčních látok piv na rychlosť spotřeby kyslíku.

Jako modelové látky se zvolily askorbová kyselina, která představuje jednoduchý redukton, a siřičitan vykazující podobné reakce jako v pivu přítomný oxid siřičitý. Tyto látky se také mohou použít k stabilizaci piv.

Existují různé mechanismy degradace kyseliny askorbové, rozdílné pro aerobní, nebo anaerobní podmínky (Shi a Zhan 2007). Průběh degradace askorbové kyseliny závisí na druhu vody a může při ní vznikat peroxid vodíku, přičemž se mohou tvořit různé degradacní produkty. Protože lze tento výsledný efekt modelovat přídavkem jednotlivých iontů jen obtížně, je studium rychlosťi spotřeby kyslíku v použité vodě užitečné. Zastoupení jednotlivých kovů rozhoduje o prooxidačním nebo antioxidačním účinku (Jansson a Lindqvist 2005, Juan a Jian-Ping 1998, Shi a Zhan 2007).

2 MATERIÁLY A METODIKA

2.1 Chemikálie

L-askorbová kyselina, siřičitan sodný, disiřičitan sodný, chlorid měďnatý, chlorid železnatý, chlorid železitý, dichromat draselný, manganistan draselný (Sigma Aldrich, ČR), peroxid vodíku 30% (Chemické závody Sokolov), ethanol 96% (Lihovar Chrudim).

Jednotlivé látky se rozpustily v deionizované vodě na zásobní roztoky: $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10%), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (10%), askorbová kyselina (10%), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1%), KMnO_4 (1%), H_2O_2 (3%), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0268 g/l = 10 mg/l Cu^{2+}), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (0,0356 g/l = 10 mg/l Fe^{2+}), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0459 g/l = 10 mg/l Fe^{3+}), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0404 g/l = 10 mg/l Co^{2+}).

Pracovní roztoky se připravily obvykle ředěním zásobních roztoků 1:100, popř. i v jiných poměrech. Koncentrace roztoků se udává v % hm., pokud není uvedeno jinak.

2.2 Suroviny, meziprodukty a produkty

Deionizovaná voda měla vodivost menší než 0,2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$. Varní voda obsahovala Ca^{2+} a Mg^{2+} v celkové koncentraci 0,7 až 0,8 mmol/l, Fe (pod 0,1 mg/l) a Cu (pod 0,05 mg/l), pH vody bylo 6,9. Voda se sytila probubláváním vzduchem po dobu 10 min.

2.3 Přístroje

Oximetru

Rozpuštěný kyslík se měřil fluorescenční sondou Hamilton VISIFERM DO (Reno, Nevada, USA) v kombinaci s vyhodnocovací jednotkou 1-CUBE (Havlíčkův Brod, ČR). Sonda (průměr 12 mm) byla po celé délce (120 mm) ponořena do válečku s vnitřním průměrem 18 mm obsahujícím 20 ml vzorku, čímž kapalina vystoupila po okraj a výrazně se omezil přístup vzduchu ke dnu válečku.

2.4 Postupy

Všechna měření se opakovala nejméně dvakrát s 14denním odstupem a v tabulkách i grafech se uvádějí průměry těchto měření.

The detailed mechanisms of Maillard reaction, caramel or melanoidin formation have not been fully understood. There is little information about radical or nonradical redox reactions of polyphenols. Polyphenols can provide reactive semiquinones and quinones and methides are considered to be reactive intermediates in the oxidation of the quinones (Wan and Brousmiche 2001).

The oxidation of polyphenols accompanies production of their dimers and oligomers, which can be partially reversed by thiolysis (Calemien and Collin 2007). Similarly, the degradation products of the sugars or ascorbic acid can produce copolymers with polyphenols and aldehydes (Bradshaw and Prenzler 2001).

The common features of the oxidation processes can be derived from final degradation products of natural compounds, such as volatile or nonvolatile aldehydes formed from sugars and aminoacids, or malondialdehyde formed from lipids, which can be measured by favorite thiobarbituric acid method. These products of degradation reactions are usually colored (Zamora and Hidalgo 2008).

Oxygen in beer is considered to be the main reason of its aging. The gradual reduction of oxygen is involved in the redox changes of beer substances, such as sugar reductones, melanoidines, sulfur compounds and polyphenols. It is supposed that the total reducing capacity of beer continuously decreases. In the presence of oxygen hydrogen peroxide is formed, that can oxidize amino acids and alcohols into volatile aldehydes (Uchida and Ono 1999, Miller and Buetner 1990).

It can be expected that the resulting products will depend on the rate of oxygen consumption. The aim of this article is to monitor the effects of reducing substances of beer on the rate of oxygen consumption.

As a model substance was chosen ascorbic acid as simple sugar reductone, and sulfites exhibiting similar reactions as sulfur dioxide naturally present in beer. These substances can also be used to stabilize beer.

Various aerobic or anaerobic degradation mechanisms of ascorbic acid have been described (Shi and Zhang 2007). Hydrogen peroxide can be formed in the course of ascorbic acid degradation, which is influenced by the type and the composition of water. The effect of individual ions in water is difficult to study because of its complex composition. The presence of various metals plays important role in prooxidant or antioxidant effects (Lindqvist and Jansson 2005, Juan and Jian-Ping 1998, Shi and Zhang 2007).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

L-ascorbic acid, sodium sulfite, sodium disulfite, copper(II) chloride, ferrous chloride, ferric chloride, potassium dichromate, potassium permanganate (Sigma Aldrich, CR), 30% hydrogen peroxide (30%, Chemical plants Sokolov), ethanol 96% (Distillery Chrudim).

The compounds were dissolved in deionized water to get stock solutions: $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10%), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (10%), ascorbic acid (10%), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1%), KMnO_4 (1%), H_2O_2 (3%), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0268 g/L = 10 mg/L Cu^{2+}), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.0356 g/L = 10 mg/L Fe^{2+}), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.0459 g/L = 10 mg/L Fe^{3+}), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.0404 g/L = 10 mg/L Co^{2+}).

Working solutions were usually prepared by diluting stock solutions in the ratio 1:100. Concentration of solutions is usually given in % (w/w), if not stated otherwise.

2.2 Raw materials, intermediates and products

Deionized water had conductivity less than 0.2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$. Brewing water contained Ca^{2+} and Mg^{2+} in total concentration from 0.7 to 0.8 mmol/L, total Fe (below 0.1 mg/L) and total Cu (below 0.05 mg/L), pH of brewing water was 6.9. Water was aerated by bubbling air for 10 min.

2.3 Instruments

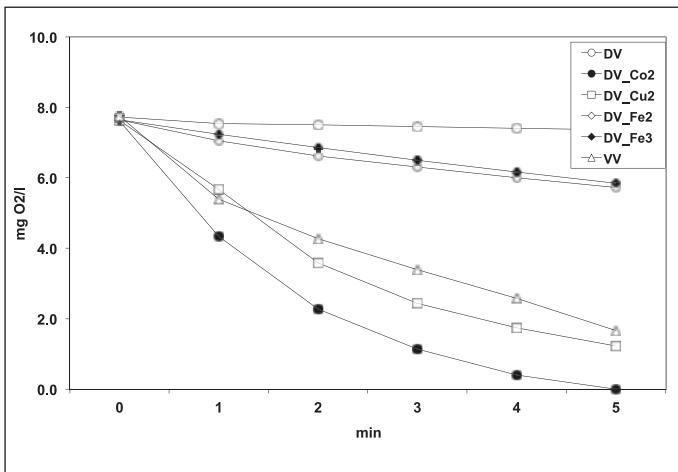
Oximeter

Dissolved oxygen was measured by fluorescent probe VISIFERM DO (Hamilton (Reno, Nevada, USA) in combination with the electronic unit 1-CUBE (Havlíčkův Brod, CZ). The probe (length 120 mm, diameter 12 mm) was immersed in a glass cylinder with inner diameter of 18 mm containing 20 ml of the sample, which reached the rim of the cylinder after probe immersion and it significantly limited access of air.

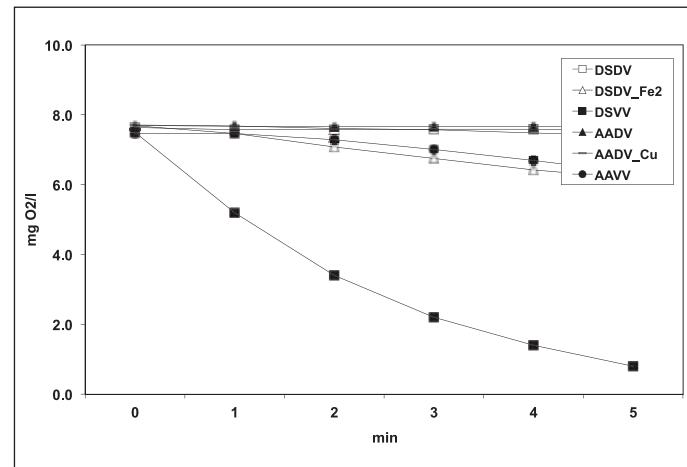
2.4 Procedures

All measurements were repeated at least twice after two weeks, tables and graphs contain the average of these measurements.

Obr. 1a Spotřeba kyslíku v roztoku siřičitanu sodného (0,1 %) ve varní vodě (VV) nebo v deionizované vodě (DV) s přídavkem kovů (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , všechny 0,1 mg/l) / Fig. 1a Oxygen consumption in sodium sulfite solution (0.1%) in brewing water (VV) or in deionized water (DV) with metals ions addition (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , all 0.1 mg/L)



Obr. 1b Spotřeba kyslíku v roztoku disiřičitanu sodného (DS, 0,1 %) a askorbové kyseliny (AA, 0,1 %) ve varní vodě (VV) nebo deionizované vodě (DV) s přídavkem kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+} , 0,1 mg/l). / Fig. 1b Oxygen consumption in sodium disulfite solution (DS - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0.1% in deionized water - DV, or brewing water - VV) and ascorbic acid (AA, 0.1% AA in deionized water - DV or brewing water - VV) with and without metal ions addition (Fe^{2+} , Cu^{2+} , both 0, 1 mg/L)



3 VÝSLEDKY

3.1 Spotřeba kyslíku v roztocích redukčních činidel s přídavkem kovů

Po zředění zásobních roztoků siřičitanu sodného, disiřičitanu sodného nebo askorbové kyseliny (výsledná koncentrace 0,1%) varní (VV) nebo deionizovanou (DV) vodou nasycenou vzduchem se po přídavku kovových iontů (0,1 mg/l) zaznamenával pokles obsahu rozpuštěného kyslíku (obr. 1a, b).

Přídavek iontů různých kovů k roztoku disiřičitanu sodného v deionizované vodě ovlivňoval rychlosť spotřeby kyslíku, což je všeobecně známé z rozsáhlé literatury. Také použití varní vody zrychlovalo spotřebu kyslíku, což může být způsobeno jak kombinací kovových iontů, nebo její ústojnou kapacitou a hodnotou pH.

Rychlosť spotřeby kyslíku v redukčním roztoku závisela rovněž na druhu redukující látky v kombinaci s hodnotou pH, ústojné kapacity a vlastnostech použité vody (obr. 1b).

3.2 Spotřeba kyslíku v roztocích redukčních činidel s přídavkem oxidantů

Po zředění zásobních roztoků siřičitanu sodného, disiřičitanu sodného nebo askorbové kyseliny (výsledná koncentrace 0,1%) varní (VV) nebo deionizovanou (DV) vodou nasycenou vzduchem se po přídavku nízké koncentrace oxidačních činidel (0,01%) zaznamenával pokles obsahu rozpuštěného kyslíku (obr. 2).

Rychlosť spotřeby kyslíku zrychloval kromě kovových iontů také přídavek nízké koncentrace oxidačních činidel, např. dichromatu draselného, ačkoliv by se mohlo naopak očekávat snížení spotřeby kyslíku související s poklesem koncentrace reduktonu.

3.3 Spotřeba kyslíku v redukčních roztocích s přídavkem ethanolu a maltosy

Po zředění zásobních roztoků siřičitanu sodného, disiřičitanu sodného a askorbové kyseliny roztokem ethanolu (5% obj.) nebo maltosy (4% hm.) v deionizované vodě nasycené vzduchem (výsledná koncentrace redukčních činidel 0,1%) se po přídavku kovových iontů (Co^{2+} , Fe^{2+} 0,1 mg/l, Cu^{2+} 0,1–10 mg/l) nebo dichromatu draselného (0,01%) zaznamenávala koncentrace rozpuštěného kyslíku. Stupeň snížení, nebo zvýšení spotřeby kyslíku v závislosti na přídavku ethanolu nebo maltosy se vyjadřoval indexem spotřeby (zpomalení) $i_5(\%)$ podle úbytku původního obsahu kyslíku po 5 minutách reakce

$$(1) \quad i_5(\%) = 100 \cdot \frac{c_5(\text{MAL}, \text{EtOH}) - c_5}{c_0 - c_5}$$

kde $i_5(\%)$ je index inhibice spotřeby kyslíku, c_0 je počáteční koncentrace kyslíku ihned po smíchání složek roztoku a c_5 je koncentrace rozpuštěného kyslíku v roztoku redukčního činidla v deionizované

3 RESULTS

3.1 Oxygen consumption in solutions of reducing agents with the addition of metals

The stock solutions of sodium sulfite, sodium disulfite or ascorbic acid (final concentration 0.1%), were diluted by brewing (BW) or deionized (DI) water saturated with air and after the addition of metal ions (0.1 mg/L) the decrease of dissolved oxygen was measured (Fig. 1a, b).

The addition of various metal ions to the solution of sodium disulfite in deionized water influenced the rate of oxygen consumption, which is well known from literature. Brewing water also showed accelerated oxygen consumption, which may be caused by combination of metal ions, buffer capacity and pH value (Fig. 1b).

3.2 Consumption of oxygen in solutions of reducing agents with the addition of oxidation agents

The stock solutions of sodium sulfite, sodium disulfite or ascorbic acid (final concentration 0.1%), were diluted by brewing (BW) or deionized (DI) water saturated with air and after the addition of oxidation agents (0.01%) the decrease of dissolved oxygen was recorded (Fig. 2).

The rate of the oxygen consumption was accelerated by the addition of oxidation agents such as potassium dichromate, although the opposite effect might be expected connected to decreasing concentration of reducing substance.

3.3 Consumption of oxygen in solution with the addition of ethanol and maltose

The stock solutions of sodium sulfite, sodium disulfite or ascorbic acid (final concentration 0.1%), were diluted by the solutions of maltose (4%) or ethanol (5% v/v) in deionized (DI) water saturated with air and after the addition of metal ions (Co^{2+} , Fe^{2+} both at 0.1 mg/L, Cu^{2+} 0.1–10 mg/l) or potassium dichromate (0.01%) and the decrease of dissolved oxygen was measured. The inhibition of oxygen consumption in ethanol or maltose solution was expressed as an inhibition index $i_5(\%)$ according to dissolved oxygen concentration after 5 min reaction

$$(1) \quad i_5(\%) = 100 \cdot \frac{c_5(\text{MAL}, \text{EtOH}) - c_5}{c_0 - c_5}$$

where $i_5(\%)$ is inhibition index of oxygen consumption, c_0 is the initial oxygen concentration immediately after mixing the components of the solution and c_5 is the concentration of dissolved oxygen in the solution of reducing agent in deionized water, with the addition of maltose $c_5(\text{MAL})$ or ethanol $c_5(\text{EtOH})$ after 5 minutes of reaction (Tab. 1).

vodě, popř. s přídavkem maltosy $c_5(MAL)$ nebo ethanolu $c_5(EtOH)$ po 5 min reakce (tab. 1).

Přídavek maltosy a ethanolu snižoval rychlosť spotřeby rozpuštěného kyslíku v redukčním roztoku siřičitanu ($i > 0\%$), až úplného zastavení reakce ($i = 100\%$). Nulová hodnota indexu i by znamenala, že přídavek látky dobu spotřeby kyslíku neovlivňoval. Při době spotřeby kyslíku kratší než 5 minut se použil podobně počítaný index i_3 .

Při výrazném zvýšení koncentrace katalyzátoru (mědnatých iontů) v roztoku askorbové kyseliny se rychlosť přenosu kyslíku zvýšila ($i < 0\%$). Grafické znázornění vlivu ethanolu na průběh reakce znázorňuje tab. 2 a obr. 3.

3.4 Tvorba barevných pigmentů po oxidaci kyseliny askorbové

Roztoky askorbové kyseliny (1 a 10%) ve varní vodě a také s přídavkem peroxidu vodíku (0,3%) se zahřívaly 1 měsíc při 45 °C ve tmě (obr. 4a,b). V druhé sérii pokusů se k roztokům askorbové kyseliny (10% hm.) v deionizované vodě přidal peroxid vodíku ve výsledné koncentraci 0,01, 0,1, a 1% a roztoky se autoklávovaly 10 min při 121 °C (obr. 5).

Reakce představuje systém se silným redukčním činidlem, askorbovou kyselinou, v přítomnosti vzduchu a peroxidu vodíku. Žlutou až hnědou barvu degradačních produktů kyseliny askorbové lze považovat za projev výskytu karbonylových látek, vzniklých jejím rozpadem.

4 DISKUSE A ZÁVĚR

Výsledky pokusů alespoň částečně vysvětlují kontroverzní úlohu prooxidačních a antioxidačních látek v silně redukčním prostředí, které může redukovat kyslík a snižovat sice jeho koncentraci v roztoku, ale současně produkovat jeho vysoce reaktivní druhy (odst. 3.1, 3.2). Klíčovou úlohu kovů při přenosu kyslíku zmiňují četné práce. Kovové ionty také silně ovlivňují oxidaci piva a jeho stárnutí (Zuffal a Tyrell 2008).

The addition of maltose and ethanol decreased the rate of consumption of dissolved oxygen in sodium sulfite ($i > 0\%$) up to a complete stop of the reaction ($i = 100\%$). Zero value of the index might respond to the complete oxygen exhaustion in the time shorter than 5 min. If oxygen was consumed in shorter than 5 minutes interval, the index i_3 was similarly used.

High concentration of copper ion increased oxygen consumption rate in a solution of ascorbic acid ($i < 0\%$) (Tab. 2, Fig. 3).

3.4 Production of pigments from ascorbic acid by hydrogen peroxide oxidation

Solutions of ascorbic acid (1 and 10%) in brewing or deionized water with the addition of hydrogen peroxide (0.3%) was heated for 1 month at 45 °C in the dark (Fig. 4 a,b). The solutions of ascorbic acid (10%) in deionized water with hydrogen peroxide addition (0.01, 0.1, and 1%) were also autoclaved for 10 min at 121 °C (Fig. 5).

The reaction represents a system of strong antioxidant combined with an oxidant such as air or hydrogen peroxide. The yellow to brown color of degradation products indicate that a mixture of carbonyl compounds is formed during ascorbic acid oxidative degradation.

4 DISCUSSION AND CONCLUSION

Experimental results may partly explain the controversial role of prooxidant and antioxidant substances in strongly reducing environment, which can reduce oxygen and diminished its concentration, but also produce the highly reactive species (paragraph 3.1, 3.2). The key role of metals in oxygen transfer has been mentioned in numerous articles. Metal ions also influence the oxidation and aging of beer (Zuffal and Tyrell 2008).

Rate of oxygen consumtion is strongly depended on the type of water used. The effect of the complete composition of brewing water has not been fully explained especially during brewing process. The composition of the brewing water determines the final quality of beer

Tab. 1 Koncentrace rozpuštěného kyslíku (c) v roztoku reduktonů (0,1 %) s přídavkem maltosy (4 %) nebo ethanolu (5 % obj.) v deionizované (DV) vodě po 5 min reakce / Dissolved oxygen (c) in the solutions of reducing compounds (0.1 %) with the addition of maltose (4 %) or ethanol (5 % v/v) in deionized water (DV) after 5 min of reaction

Reakce / Reaction	$c_5(\text{mg O}_2/\text{l})$, $c_0 = 7,6$			Index spotřeby / Consumption index (%)	
	-	MAL	EtOH	MAL	EtOH
Na_2SO_3 , Co^{2+} (0,1 mg/l)	0	7.4	7.5	97.4	98.6
Na_2SO_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,01 %)	6.6	7.5	7.2	90.0	60.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,01 %)*	0.1	0.6	0.7	6.7	8.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Fe^{2+} (0,1 mg/l)	6.2	7.5	7.4	92.9	85.7
AA, Cu^{2+} (10 mg/l)	2.1	1.4	1.5	-12.7	-10.9

AA: askorbová kyselina, * c (mg O₂/l) po 3 min (i_3) / AA: ascorbic acid, * c(mg O₂/L) after 3 min (i_3)

Tab. 2 Koncentrace rozpuštěného kyslíku (c) v roztoku askorbové kyseliny (0,1 a 1 %) s přídavkem ethanolu (5 % obj.) v deionizované (DV) vodě po 5 min reakce / Dissolved oxygen (c) in the solution of ascorbic acid (0.1 a 1 %) with the addition of ethanol (5 % v/v) in deionized (DV) water after 5 min of reaction

Reakce / Reaction	$c(\text{mg O}_2/\text{l})$, $c_0 = 7,6$		Index spotřeby / Consumption index (%)	
	-	EtOH	EtOH	
AA (0,1 %)	7.4	7.3	-33.3	
AA (0,1 %), Cu^{2+} (0,1 mg/l)	7.2	7.0	-33.3	
AA(0,1 %), Cu^{2+} (1,0 mg/l)	6.4	6.1	-20.0	
AA(0,1 %), Cu^{2+} (10 mg/l)	2.1	1.5	-9.8	
AA (1 %), Cu^{2+} (10 mg/l)	7.0	0.2	-91.8	

AA: askorbová kyselina / AA: ascorbic acid

Rychlosť redukce kyslíku také silně závisela na druhu použité vody. Pro nemožnost jednoznačně stanovit vliv komplexního složení varní vody uvádíme jen její základní parametry. Složení varní vody rozhoduje o výsledné kvalitě piva, přičemž zdaleka nejsou známé všechny faktory, které ovlivňují následné technologické změny. Důsledkem této skutečnosti je nemožnost přípravy stejného piva mimo místo jeho původu. Výsledek výroby nezávisí totiž jen na dosud známých vědeckých poznatcích (De Clerk 1964).

Velmi účinné redukovadlo jako je oxid siřičitý nebo disiřičitan sodný může tak v přítomnosti vzduchu a kovových iontů snadno oxidovat fenylalanin nejen na fenylacetaldehyd, ale také na benzaldehyd (Basařová et al. 2011, Šavel a Košin 2011).

Hlavním mechanismem tohoto procesu je pravděpodobně zvýšení počtu oxidačně redukčních páru vzniklých redukcí kyslíku nebo oxidací redukující látky, čímž se zvyšuje počet možných kinetických mechanismů, umožňujících přechod elektronů z redukujících látek na kyslík.

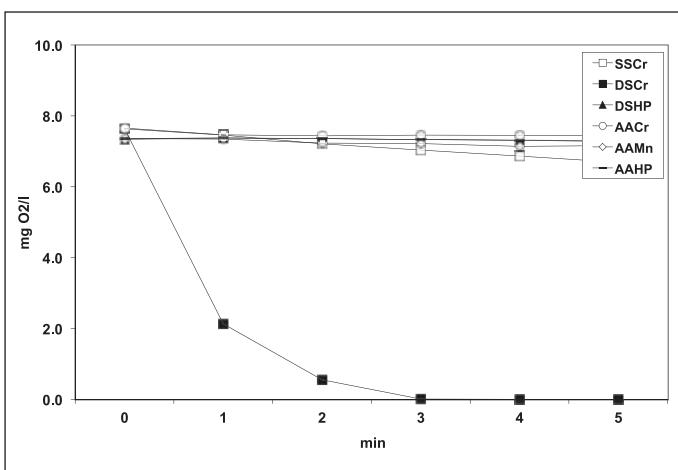
through the subsequent technological changes. Because of these facts it is impossible to prepare the same beer out of his place of origin. The beer production does not depend only on the known scientific facts (De Clerk 1964).

Strong reducing compounds such as sulphur dioxide or sodium disulfite can in the presence of air and metal ions form reactive oxygen species, which can readily oxidize phenylalanine not only to phenylacetaldehyde but also to benzaldehyde (Basarova et al. 2011, Savel and Kosin 2011).

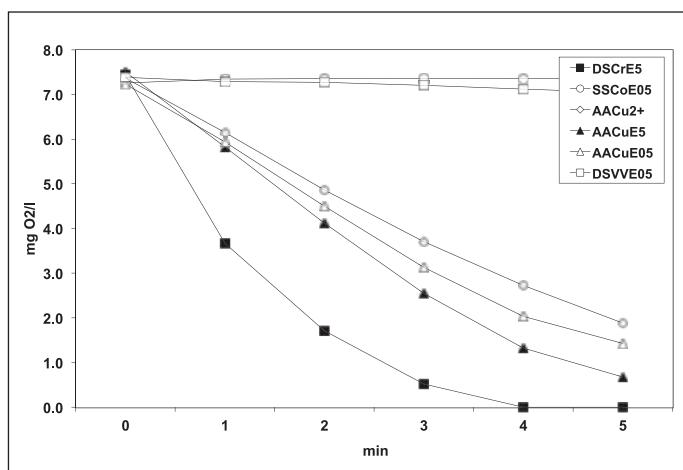
The main mechanism of this process is likely based on increasing number of redox couples, which results in increasing number of possible kinetic mechanisms, enabling the transfer of electrons between redox pairs.

An example of such mechanism is the autocatalysis by metal ion (e.g. Mn^{2+} formed from $KMnO_4$), but the speed of oxygen consumption can also increase without the presence of other non metallic oxidizing agents.

Obr. 2 Spotřeba kyslíku v roztoku siřičitanu sodného (SS, 0,1 %), disiřičitanu sodného (DS, 0,1 %) a askorbové kyseliny (AA, 0,1 %) v deionizované vodě s přídavkem dichromatu draselného (Cr, 0,01 %), manganistanu draselného (Mn, 0,01 %) a peroxidu vodíku (HP, 0,01 %) / Fig. 2 Oxygen consumption in solution of sodium sulfite (SS, 0,1%), sodium disulfite (DS 0,1%) and ascorbic acid (AA, 0,1%) in deionized water with the addition of potassium dichromate (Cr, 0, 0,1%), potassium permanganate (Mn, 0,01%) and hydrogen peroxide (HP, 0,01%)



Obr. 3 Spotřeba kyslíku v roztoku siřičitanu sodného (SS, 0,1 %), disiřičitanu sodného (DS, 0,1 %) a askorbové kyseliny (AA, 0,1 %) ve varní (VV) a deionizované vodě (DV) s přídavkem měďnatých (Cu^{2+} , 10 mg/l), kobaltnatých (Co^{2+} , 0,1 mg/l) iontů nebo dichromatu draselného (Cr, 0,01 %) a ethanolu (E, 0,5 a 5,0 % obj.) / Fig. 3 Oxygen consumption in a solution of sodium sulfite (SS, 0,1%), sodium disulfite (DS 0,1%) and ascorbic acid (AA, 0,1%) in the brewing water (VV) and deionized water with the addition of ions (Cu^{2+} , 10 mg/L, Co^{2+} , 0,1 mg/L) ions or potassium dichromate (Cr, 0,01%) or ethanol (E, 0,5 and 5,0 vol%)



Obr. 4a Barevné změny roztoků askorbové kyseliny s koncentrací 1% (vlevo) a 10% hm. (vpravo) ve varní vodě po 1 měsíci při 45 °C ve tmě / Fig. 4a Color changes of ascorbic acid solutions with a concentration of 1% (left) and 10% (right) in the brewing water for 1 month at 45 °C in the dark



Obr. 4b Barevné změny roztoků askorbové kyseliny 1% (vlevo) a 10% hm. (vpravo) ve varní vodě s přídavkem peroxidu vodíku (0,3%) po 1 měsíci při 45 °C ve tmě / Fig. 4b Color changes of ascorbic acid solutions 1% (left) and 10% (right) in the brewing water with the addition of hydrogen peroxide (0,3%) after 1 month at 45 °C in the dark



Obr. 5 Barevné změny roztoků kyseliny askorbové (10% hm.) autoclávované v deionizované vodě s přídavkem peroxidu vodíku (zleva 0, 0,01, 0,1 a 1%) po 10 min zahřívání při 121 °C / Fig. 5 Color changes of solutions of ascorbic acid (10%) after autoclaving in deionized water with addition of hydrogen peroxide (from left 0, 0.01, 0.1 and 1%) after 10 min heating at 121 °C



Možným vysvětlením je i autokatalýza vznikajícím kovovým ionem (např. Mn²⁺ pro KMnO₄), zvýšení rychlosti spotřeby se však vykazuje i u oxidačních činidel bez přítomnosti kovů.

Rychlosť spotřeby kyslíku se přídavkem ethanolu nebo maltosy může zvýšit i snížit (odst. 3.3). Zpomalení spotřeby kyslíku pravděpodobně souvisí se záchytem kyslíkových radikálů a svědčí o antioxidačním působení. Produkty redukce kyslíku reagují s maltosou nebo ethanolem, čímž se pravděpodobně přeruší kaskáda oxidačních reakcí spojených s oxidací redukující látky.

Zvýšení rychlosťi spotřeby kyslíku lze vysvětlit prooxidačním i antioxidačním účinkem. Po vyčerpání kyslíku se sice zastaví tvorba reaktivních druhů kyslíku, a tím se zabrání další oxidaci, výsledkem ale může být tvorba dalších oxidačních látek, schopných postupně oxidovat zbyvající redukční látky. Označení antioxidant, nebo prooxidant závisí na produktech oxidační reakce a jejich vnímání spotřebitelem.

Zpomalení spotřeby kyslíku oddálí oxidaci složek a má tedy stejný význam, jako snížení přístupu kyslíku např. omezením pohybu piva v láhvích, nesmí se ale přitom zanedbávat povaha produktů, vznikajících z látek zpomalujících oxidaci kyslíkem a také povaha látek vytvářených touto pomalou oxidací.

Také v pivu se rychlosť spotřeby kyslíku liší v závislosti na přítomnosti redukčních nebo oxidačních činidel. O výsledném efektu rozdružuje také tvorba peroxidu vodíku a jeho odbourávání (Blockmans a Heilporn 1987). Peroxid vodíku lze považovat za meziprodukt odbourávání kyslíku.

Oxidační produkty organických sloučenin, např. chinony a peroxidy mohou opět působit jako oxidační činidla v kaskádě reakcí oxidačně redukčních reakcí. Primárně vzniklé karbonylové sloučeniny mohou např. reagovat s aminoskupinami bílkovin nebo aminokyselin za tvorby komplexů, např. Schiffových bází a Amadoriho meziproduktu. Tyto látky se mohou oxidovat až na konečné produkty, např. jednoduché aldehydy, které ovlivňují organoleptické vlastnosti piva, a další oxidací se mohou měnit na senzoricky málo aktivní složky.

Anorganické redukující látky se také mohou oxidovat za vzniku radikálů a dalších meziproduktů, kterých je ale ve srovnání s organickými látkami méně, čímž klesá rozsah nežádoucích reakcí. Kromě toho se oxidací siřičitanu získá síran, který s ostatními složkami piva nereaguje.

Oxidací askorbové kyseliny jako modelového sacharidového reduktoru ve varní vodě vznikaly barevné oxidační produkty během stárnutí při 45 °C, přičemž přídavek peroxidu vodíku podporoval jejich tvorbu (odst. 3.4). Při stárnutí roztoku askorbové kyseliny se předpokládá redukce kyslíku a tím i vznik kyseliny dehydroaskorbové, která se pak rozkládá za tvorby barevných produktů.

Ethanol or maltose may increase or decrease rate of oxygen consumption (Section 3.3). The decrease of oxygen consumption is likely related to the capture of oxygen radicals, which proves their antioxidant activity. Reactive oxygen species react with maltose or ethanol, which probably interrupt the cascade of oxidation reactions associated with oxidation of the reducing substances.

The increase of oxygen consumption rate can be explained by prooxidant or antioxidant effect. After depletion of oxygen ends the production of reactive oxygen species, which prevents further oxidation by oxygen, but the reduction of other oxidizing agents formed during previous oxidation can continue. The term antioxidant or prooxidant depends on consumer perception of reaction products.

The decrease of rate of oxygen consumption in food will delay the oxidation of its natural components and has apparently the same importance as the oxygen removal, but the nature of products arising from slower oxygen reduction cannot be neglected.

An example is beer oxidation by oxygen from air. The rate of oxygen consumption varies, which depends on the presence of reducing or oxidizing agents (Blockmans and Heilporn and 1987). Hydrogen peroxide can be considered as intermediate product of oxygen reduction.

Oxidation products of organic compounds such as quinones or peroxides can again act as oxidizing agents in the cascade of redox reactions. Carbonyl compounds can react with amino groups of proteins or amino acids to form complexes such as Schiff and Amadori base and their intermediates. These substances can be transformed to the final products, such as simple aldehydes, which affect the organoleptic properties of beer, but they can be further overoxidized into sensory inactive compounds.

Inorganic reducing agents can also be oxidized to form radicals and other intermediates, but the number of suitable intermediates with sensory adverse effects is smaller in comparison to organic compounds. In addition, the oxidation of sulfite provides sulfate, which is sensorially neutral.

On the other hand the oxidation of ascorbic acid as a model carbohydrate reductone provided colored oxidation products formed during aging at 45 °C where the addition of hydrogen peroxide promoted their formation (section 3.4). During aging, the solution of ascorbic acid is expected to be oxidized into dehydroascorbic acid, which is then decomposed to form colored products.

Formation of reactive oxygen species during oxidation of ascorbic acid in the presence of metal ions is generally mentioned in literature (Buettner and Jurkiewicz 1996). Degradation of ascorbic acid in the presence of hydrogen peroxide is a sequence of reactions in which several compounds with different oxidation properties are formed

Tvorba reaktivních druhů kyslíku při oxidaci askorbové kyseliny za přítomnosti kovových iontů se obecně zmiňuje v literatuře (Jurkiewicz a Buettner 1996). Odbourávání kyseliny askorbové za účasti peroxidu vodíku je sled reakcí, při němž se tvoří několik sloučenin s různými oxidačními vlastnostmi (Deutsch 1998). Předpokládáme, že stárnutí roztoku sacharidických reduktonů se chová obdobně.

Reakce jsou příklady systémů, ve kterých ani přítomnost silného antioxidantu ve vysoké koncentraci nezabrání tvorbě nežádoucího produktu, existuje-li v systému další oxidovadlo, v tomto případě průběžně dodávaný vzdušný kyslík (obr. 4a). Vlivem peroxidu vodíku se stupeň tmavnutí u nízké koncentrace askorbové kyseliny (1%) snížil, u vyšší koncentrace naopak zvýšil (obr. 4b). Tmavnutí roztoku askorbové kyseliny lze výrazně zrychlit jeho autoklávováním (obr. 5). Při dalším zvyšování koncentrace peroxidu vodíku (nad 3%) lze barevný roztok dále odbarvit (nezobrazeno).

Podobné změny barvy vykazoval i roztok askorbové kyseliny s přídavkem oxidačních činidel, přičemž ethanol snižoval tvorbu barevných látek (Šavel a Košín 2011). Ethanol lze v tomto případě považovat za antioxidant.

Při použití kyslíku jako oxidačního činidla mohou vedle sebe působit současně aerobní (před jeho vyčerpáním) i anaerobní způsoby oxidace redukující látky, např. kyseliny askorbové. Askorbová kyselina se může rozkládat aerobním i anaerobním způsobem, pokaždé za tvorby jiných produktů, např. diketogulonové kyseliny nebo furfuralu (Shi a Zhan 2007).

Při postupně klesající koncentraci kyslíku se aerobní odbourávání askorbové kyseliny může měnit na anaerobní. Podobné rysy vykazuje postupný rozpad redukujících degradačních produktů sacharidů v pivu při jeho stárnutí (Bravo a Herrera 2008). Redukční povaha májí i původní sachardy v pivu, které se mohou tvořit hydrolyticky štěpením při jeho výrobě. Je obtížné odhadnout, v jakém stupni se již výrazně uplatňuje vznik reduktomů.

Úloha α -aminodusíku při těchto reakcích není dosud zcela objasněna. Kyslík se může redukovat na reaktivní druhy kyslíku, které mohou přímo oxidovat aminokyseliny na aldehydy. Dále mohou vznikat komplexy sacharidů s aminokyselinami, které se mohou opět oxidovat, dokonce za vzniku peroxidu vodíku (Elgawish a Glomb 1996).

Možným mechanismem je Streckerova oxidace aminoskupiny dikarbonylovými sloučeninami a chinony, vzniklými oxidací reduktonů a polyfenolů. Podíl jednotlivých reakcí není známý, a nelze je vysvětlit pouze jedním z uvedených mechanismů (Suda a Yasuda 2007).

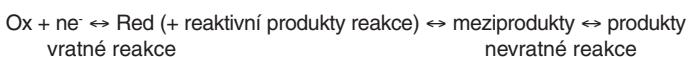
Spolehlivé není také vysvětlení zrychlení redukce kyslíku po přídavku 1,2-diaminobenzenu (DAB) do piva nebo cukerných reduktónů. V souhlasu s tím se zvyšuje i rychlosť reakce s přídavkem jiného oxidačního činidla, např. methylenové modři.

Methylenová modr se dalším přístupem kyslíku reoxiduje, ale po přídavku DAB se opět redukuje (Savel a Košín 2009). Jedním z možných vysvětlení je katalýza spotřeby kyslíku aminokyselinou, jak se to prokázalo u methioninu (Pfeifer a Kroh 2010).

Složení reakční směsi se mění vlivem výměny elektronů mezi oxidacním a redukčním činidlem, aníž by se dosáhlo konečného rovnovážného složení. Kyslík vstupuje do dalších sloučenin, jako jsou oxidované polyfenoly nebo dikarbonylové sloučeniny, schopné reagovat s přítomnými redukujícími látkami. Výsledkem je vratká rovnováha, mezi oxidovanými a redukoványmi polyfenoly, posunující se podle výsledné hodnoty redox potenciálu.

Podstatným rysem tohoto systému je koexistence silných oxidačních a redukčních činidel, ve stavu vzdáleném od rovnováhy. Takové systémy se vyznačují netypickým kinetickým chováním, např. oscilačními reakcemi (Strizhak a Basylchuk 2000). V pomalých reakcích se postupně redukují oxidované formy. Stárnutí piva je tedy samovolný oxidační proces, jehož průběh lze částečně zpomalit nebo zrychlit přídavkem dalších oxidačních nebo redukčních činidel.

Popsané reakce zahrnují postupnou přeměnu látek podle jednoduchého schématu



kde *Ox* a *Red* jsou oxidační a redukční stavy sloučenin, z nichž se vratnými reakcemi postupně tvoří meziprodukty. Stupeň vratnosti reakcí klesá, až se od určitého stupně stanou nevratnými. Tento princip platí i pro reakce *in vivo*, protože např. reakční produkty degradace askorbové kyseliny jsou do určitého stupně stálé fyziologicky aktivní (Deutsch 2000).

Konečnými produkty těchto reakcí mohou být i polymery, kopolymery, nebo naopak degradované složky. Tyto reakce mohou v systému probíhat v soustavě soutěživých simultánních reakcí, kdy jednot-

(Deutsch 1998). We assume that the aging of sugar reductone solutions behaves similarly.

These reactions are examples of systems, in which the presence of a strong antioxidant prevents the formation of undesirable products. There is an additional oxidant in the system, in this case continuously supplied air oxygen (*Fig. 4 a*). Due to hydrogen peroxide formation, the degree of browning at low concentrations of ascorbic acid (1%) was lower than at a higher concentration (*Fig. 4b*). Browning of the solution of ascorbic acid can significantly increase by its autoclaving (*Fig. 5*). Further increase of the concentration of hydrogen peroxide (over 3%) can resulted in bleaching solution (not shown).

Similar changes of color of ascorbic acid solutions could be caused by the addition of various oxidizing agents, which could be reduced by ethanol (Savel and Kosin 2011). In this case ethanol could be considered as an antioxidant.

Oxygen can oxidize ascorbic acid and the oxidation can continue even after its depletion. Ascorbic acid may be degraded in aerobic or anaerobic way, which can provide different products such as dike-toxulonic acid or furfural (Shi and Zhang 2007).

The degradation of sugar reductones during beer aging is similar to model degradation of ascorbic acid (Bravo and Herrera 2008). Sugar reductones can be formed during brewing process by the sugar cleaving in the brewhouse. It is difficult to determine the ratio between own reducing capacity of unsplitted sugar and sugar reductones.

The role of α -amino nitrogen in these reactions is not yet fully understood. Oxygen can be reduced to reactive oxygen species, which can directly oxidize the amino acids to aldehydes. The complexes of carbohydrates with amino acids can be oxidized again, even under the formation of hydrogen peroxide (Elgawish and Glomb 1996).

A possible mechanism is the Strecker oxidation of amino compounds by dicarbonyls or quinones. The rate of individual reactions is not known, and it cannot be explained only by one of these mechanisms (Suda and Yasuda 2007).

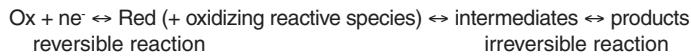
It is difficult to explain the acceleration of oxygen reduction by addition of 1,2-diaminobenzene (DAB) to beer or sugar reductones. The reaction can be visualized by the addition of another oxidizing agent such as methylene blue.

Reduced methylene blue is reoxidized by oxygen, but after the addition of DAB the reduction of methylene blue continues (Savel and Kosin 2009). One of the possible explanations is the amino acid catalysis of oxygen consumption, as it was demonstrated in the case of methionine (Pfeifer and Kroh 2010).

The composition of the reaction mixture varies due to the exchange of electrons between oxidizing and reducing agent, without reaching the final equilibrium composition. Oxygen enters into other compounds such as polyphenols or dicarbonyl compounds capable of reaction with reducing substances. The result is a non stable balance between reduced and oxidised polyphenols, shifting according to the resulting value of the redox potential.

An essential feature of this system is the coexistence of strong oxidizing and reducing agents, in a state far from equilibrium. Such systems are characterized by atypical kinetic behavior, such as oscillating reactions (Strizhak and Basylchuk 2000). The slow reactions will gradually reduce the oxidized forms. Aging of beer is spontaneous oxidation process, which can be partially slowed down or accelerated by the addition of other oxidizing or reducing agents.

The reaction scheme can be written as



where *Ox* and *Red* are the oxidation and reduction states of compounds in reversible reactions, which gradually produce intermediates. The degree of reversibility of the reaction decreases to a certain degree where the reaction is irreversible. This principle also applies to responses *in vivo*, because degradation products of ascorbic acid are to some degree still physiologically active (Deutsch 2000).

The final products of these reactions can be polymers, copolymers, or vice versa degraded components. These reactions can take place in the system of parallel competitive reactions, where the individual substances may act as antioxidants or prooxidants. The supplement of reducing substances to reversible reaction can for example slow down the aging of beer.

Slow spontaneous reaction can be accelerated by external interventions such as their initiation. Growth of the number and types of redox couples with different redox potentials may therefore increase

livé látky mohou působit jako prooxidanty i antioxidanty. U vratných reakcí může přídavek redukující látky stárnutí piva alespoň zpomalit.

Pomalé samovolné reakce se mohou urychlit vnějšími zásahy, např. jejich iniciací. Zvětšení počtu a druhů oxidačně redukčních páru s různými redox potenciály proto mohou zvyšovat, nebo snižovat reakční rychlosť. U chemických reakcí, např. při spalování vodíku, dochází v rychlém sledu v průběhu reakcí k prudkému nárůstu meziproduků, reaktivních druhů kyslíku a vodíku, aby pak jejich počet opět poklesl. Kromě těchto vlivů se reakční rovnováha posune také s vlivem teploty v roztočích také s hodnotou pH.

Stárnutí piva se hodnotí negativně, neboť je spojeno s nárůstem barvy, tvorbu nežádoucích oxidačních produktů a polymerních sloučenin. Nežádoucí sloučeniny se přitom mohou další oxidací degradovat, např. vznikajícím peroxidem vodíku.

Např. oxidaci lipidů vzniká senzoricky nežádoucí (2E)-non-2-enal, který se však může oxidovat až na senzoricky méně výrazný malonaldehyd. Hnědé produkty vznikající oxidaci cukrů lze považovat za vysoce nežádoucí meziprodukty, ale jejich intenzivní oxidací peroxidem vodíku lze vytvořit méně škodlivé, téměř bezbarvé konečné oxidační produkty.

Závisí na subjektivním vnímání jednotlivých produktů oxidačně redukčního řetězce, kdy např. zvýšená barva oxidovaných polyfenolů, nebo produkty Maillardovy reakce se může vnímat kladně nebo záporně. Např. vůně a chut vína se částečnou oxidací po stočení zlepšují (tvorba buketu), dlouhým skladováním se však dostavují nežádoucí změny.

Pojem antioxidantu a prooxidantu souvisí s látkami, které ovlivňují tvorbu látek s žádoucími, nebo nežádoucími účinky, a stává se proto subjektivním pojmem. Vhodnejší označení by patrně bylo látky s adversním nebo antiadversním účinkem (adversiva nebo antiadversiva), nebo ještě lépe broadversní a antiadversní podmínky reakce. Nedokonalé spalování organických látek, např. reduktonů za vzniku nežádoucích karbonylových látek, je nežádoucí, ale jejich následné dokonale spálení se může vnímat pozitivně.

Při tvorbě specifické chuti potravin se například mohou uplatnit látky podporující tvorbu benzaldehydu, žádoucího pro specifickou hořkomandlovou chut, nebo naopak látky jeho tvorbu potlačující, což je výhodné např. při stárnutí piva. Stejnou roli mohou hrát polyfenoly, jejichž hnědnutí je sice nežádoucí, ale současně mohou záchytit radikálů snižovat tvorbu cizí chuti.

Úloha těchto látek se může měnit podle stupně přeměny určité látky v reakci. Spalováním uhlíku za nedostatečného přístupu kyslíku se může tvořit meziprodukt oxid uhelnatý, který je ze zdravotního hlediska nežádoucí a jeho další oxidace je vítaná, protože vzniká méně škodlivý oxid uhličitý. Na druhé straně se spalováním uhlíku v organických sloučeninách může získat nejen využitelná energie, ale také malé množství tepla, které jsou pro život nutné. Naproti tomu velké množství tepla je užitečné při topení, ale škodlivé při požáru.

Klíčovou látkou v pivovarství je kyslík, kterému se po stočení piva přisuzuje jednoznačně nežádoucí účinek, protože oxidací se negativně mění chuť piva a další odstraňování nežádoucích látek další oxidací neprobíhá. Naproti tomu tvorbu nežádoucích produktů mohou přidané redukující látky potlačit posunutím vratné reakce směrem proti jejich vzniku.

Ze stejného důvodu se musí obsah kyslíku v obalu co nejvíce snížit, neboť poskytuje nejen reaktivní druhy kyslíku, které opět snižují redukční kapacitu piva. Zde se úloha k zvýšení stability piva zaměřuje na snížení jeho množství v naplněném obalu, rychlosti jeho přístupu do piva a reakce s ním (pohyb, teplota, záření). Při anaerobním stárnutí přebírájí úlohu kyslíku již zoxidované látky.

Stárnutí piva pokračuje i po vyčerpání kyslíku, přičemž klesá redox potenciál a redukční kapacita piva. Rychlosť spotřeby kyslíku, řízené jeho přechodem z hrudí láhvě do piva, ovlivňuje rozhodující způsobem stárnutí piva (Andre a Moll 1986).

the reaction rate. Chemical reaction, such as the burning of hydrogen, occurs in rapid succession of steps that lead to a sharp increase in intermediate reactive species of oxygen and hydrogen, which then decline again. In addition to these effects, the reaction equilibrium shifts with temperature and the solution pH value.

Aging of beer is perceived negatively, because it is associated with an increase of its color, undesirable oxidation products and polymer compounds formation. Hydrogen peroxide is further undesirable compound which can also act as another oxidation agent.

Sensory active compound with extremely low threshold value such as (2E)-non-2-enal can be formed by lipid oxidation but it can be oxidized to sensory nonactive malonaldehyde. Brown pigments from sugars can be regarded as highly undesirable intermediates, but their intense oxidation by hydrogen peroxide results in colorless final oxidation products.

It depends only on the subjective perception of individual products or changes, such as increased color as the result of polyphenol oxidation or Maillard reaction, whether they are perceived positively or negatively. For example the smell and taste of wine after partial oxidation improves (bouquet formation) its quality, but very long storage is associated with undesirable changes.

The term antioxidant and prooxidant is associated with compounds that affect the production of substances with desirable or undesirable effects, which are only subjective term. A more appropriate designation would probably be a substance with adverse or antiadverse effect (adversiva or antiadversiva), or more commonly broadversive or antiadversive reaction conditions. Incomplete combustion of organic substances can provide undesirable degradation products (smoke) but their subsequent complete combustion can be perceived positively.

For example creation of specific almond flavor by the support of the benzaldehyde formation is desired in some food, but inhibition of the same compound is advantageous in beer aging. The same role can be played by polyphenols, of which browning is undesirable, although it is also connected to radicals capture.

The role of these substances can vary according to the degree of conversion of a substance in the reaction. Combustion of carbon in low concentration of oxygen can form an intermediate carbon monoxide, which is undesirable from a health point of view and its further oxidation is welcome, because the carbon dioxide is less harmful. On the other hand, the combustion of carbon from organic compounds during life has to provide not only usable chemical energy, but also a small amount of heat necessary for life. In contrast, large amounts of heat, is useful for heating, but harmful in a fire.

Oxygen is a key substance in brewing, which is usually associated with its undesirable effect, because oxidation negatively influences the taste of beer. In contrast, the addition of reducing compounds inhibits the formation of undesirable products.

For the same reason, the minimization of oxygen content is required because oxygen provides the reactive oxygen species, which again reduces the reduction capacity of beer. The task to increase the beer stability focuses on reducing the ratio between headspace and beer volume, rate of oxygen transfer and reaction with beer (motion, temperature, radiation). Anaerobic aging assumes the presence of formerly oxidized material.

Aging beer continues after oxygen depletion, which decreases the redox potential and reducing capacity of beer. Rate of oxygen consumption, decisively influences the aging of beer (Andre and Moll 1986).

Literatura / References

- Andre, J., Moll, M., 1986: A new approach to the kinetics of beer oxidation: from physical chemistry to industrial brewing. *J. Am. Soc. Chem.* **44**(4): 151–157.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva. Vyd. VŠCHT Praha, 1. vyd. 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- Blockmans, C., Heilporn, M., Masschelein, C.A., 1987: Scope and limitations of enzymatic deoxygenating methods to improve flavor stability of beer. *J. Am. Soc. Chem.* **45**(3): 85–90.
- Bradshaw, M.P., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., 2001: Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* **49**(2): 934–939.
- Bravo, A., Herrera, J.C., Scherrera, J.C., Scherer, E., Ju-Nam, Y., Rübsam, H., Madrid, J., Zufall, C., Rangel-Aldao, 2008: Formation of dicarbonyl compounds in beer during storage of pilsner. *J. Agric. Food Chem.* **56**(11): 4134–4144.
- Callemien, D., Collin, S., 2007: Polyphenol and colour stability through beer aging: comparison of polyphenol quantification assays. *Eur. Brew. Conv.: Proc. 31st Congress, Venice 2007m CD ROM,*

- příspěvek 95, 853-859. Nürnberg Fachverlag Hans Carl. ISBN 978-90-70143-24-4.
- De Clerk, J., 1964: Lehrbuch der Brauerei. 2. vyd., Band 1, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, Berlin.
- Deutsch, J.C., 1998: Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **255**(1): 1–7.
- Deutsch, J. C., 2000: Review. Dehydroascorbic acid. *J. Chromatography* **881**(1-2): 299–307.
- Eigawish, A., Glomb, M., Friedlander, M., Monnier, V.M., 1996: Involvement of hydrogen peroxide in collagen Gross-linking by high glucose *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**(22), 12964–12971.
- Haliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000: Minireview. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* **486**(1): 10–13.
- Haliwell, B., 2008: Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.* **476**(2): 107–112.
- Jansson, P.J., Lindqvist, C., Nordström, T., 2005: Iron prevents ascorbic acid (vitamin C) induced hydrogen peroxide accumulation in copper contaminated drinking water. *Free Rad. Res.* **39**(11): 1233–1239.
- Juan, Jian-Ping, Chen, F., 1998: Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *J. Agric. Food. Chem.* **46**(12): 5078–5082.
- Jurkiewicz, B.A., Buettner, R.G., 1996: Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Rad. Res.* **145**(10): 532–542.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, D., 1990: Transition metals as catalysts of „autoxidation“ reactions. *Free Rad. Biol. Med.* **8**(1): 95–108, 95–108.
- Pfeifer, Y.V., Kroh, L.W., 2010: Investigation of reactive α -dicarbonyl compounds generated from the Maillard reactions of L-methionine with reducing sugars via their stable quinaxaline derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **58**(14): 8293–8299.
- Rahbar, S., Figarola, J.L., 2003: Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**(1): 63–79.
- Reddy, V.P., Beayz, A., 2006: Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug discovery today* **11**(13-14): 646–654.
- Savel, J., Kosin, P., Broz, A., 2009: New oxidation destructive analysis (NODA). *BrewingScience* **62**(9/10): 155–163.
- Šavel, J., Košin, P., Brož, A., 2011: Přímá spektroskopie piva a jeho destilátů. *Kvasny Prum.* **57**(6), 143–148.
- Shi, Y., Zhan, X., Ma, Lin, B., Li, L., Li, Ch., He, N., 2007: Compressed oxygen in drug stability experiments. *Chem. Pharm. Bull.* **55**(1): 87–91.
- Strizhak, P.E., Basylchuk, A.B., Demjanchyk, I., Fecher, F., Schneider, F.W., Münster, A.F., 2000: Oxidation of ascorbic acid by air oxygen catalyzed by copper(II) ions in batch and continuous flow stirred tank reactors: bistability, oscillation and stochastic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**(20): 4721–4727.
- Suda, T., Yasuda, Y., Imai, T., Ogawa, Y., 2007: Mechanisms for the development of Strecker aldehydes during beer aging. *Eur. Brew. Conv.: Proc. 31st Congress, Venice 2007 CD ROM*, příspěvek 103, 931–937. Nürnberg Fachverlag Hans Carl. ISBN 978-90-70143-24-4.
- Uchida, M., Ono, M., 1999: Determination of hydrogen peroxide in beer and its role in beer oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**(4): 145–150.
- Wan, P., Brousmiche, D.W., Chen, C.Z., Cole, J., Lukemen, M., Xu, M., 2001: Quinone methide intermediates in organic photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **73**(3), 529–534.
- Xanthis, A., Hatzitolios, A., Koliakos, G., Tatola, V.: Advanced glycation end products and nutrition – a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent. *J. Food Sci.* **72**(8): 125–129.
- Zamora, R., Hidalgo, F.J., 2005: Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**(1), 48–59.
- Zhu, Y., Lan, F., Wei, J., Chong, B., Chen, P., Huynh, L., Wong, N., Liu, Y., 2011: Influence of dietary advanced glycation end products on wound healing in nondiabetic mice. *J. Food Sci.* **76**(1): 5–10.
- Zufall, C., Tyrell, Th., 2008: The influence of heavy metals ions on beer flavour stability. *J. Inst. Brew.* **114**(2): 134–142.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 25. 6. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 14. 1. 2012



Senzorická zkouška

Nejbližší termín konání senzorické zkoušky,
kterou pořádá Pivovarský ústav Praha, VÚPS, a.s.,
je 31. května 2012.

Po úspěšném absolvování zkoušky obdrží účastník od VÚPS

Osvědčení posuzovatele o způsobilosti provádět senzorické hodnocení piva.

Způsob provedení zkoušky je v souladu s

- Normou ČSN ISO 8586 „Senzorická analýza – obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů“;
- Analytikou EBC, kapitola „Senzorická analýza – výběr a výcvik posuzovatelů“.

Podrobnější informace a přihlášku najdete na stránkách VÚPS, a.s., www.beerresearch.cz.

Dotazy můžete zasílat na adresu luznicka@beerresearch.cz.